



HAL
open science

Synthèse de dérivés cellulose photosensibles et développement d'hydrogels par fabrication additive pour la conception de dispositifs médicaux

Lénaïc Soullard

► **To cite this version:**

Lénaïc Soullard. Synthèse de dérivés cellulose photosensibles et développement d'hydrogels par fabrication additive pour la conception de dispositifs médicaux. Polymères. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV070 . tel-04432528

HAL Id: tel-04432528

<https://theses.hal.science/tel-04432528>

Submitted on 1 Feb 2024

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Sciences des Polymères

Unité de recherche : Centre de Recherche sur les MAcromolécules Végétales

Synthèse de dérivés cellulotiques photosensibles et développement d'hydrogels par fabrication additive pour la conception de dispositifs médicaux

Synthesis of photosensitive cellulose derivatives and development of hydrogels by additive manufacturing for the design of medical devices

Présentée par :

Lénaïc SOULLARD

Direction de thèse :

Bruno JEAN

Directeur de Recherche CERMAV-CNRS,
Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Sébastien ROLERE

Ingénieur chercheur CEA

Co-encadrant de thèse

Guillaume NONGLATON

Ingénieur chercheur, CEA

Co-encadrant de thèse

Isabelle TEXIER-NOGUES

Ingénieur chercheur, CEA

Co-encadrant de thèse

Rapporteurs :

Vincent LAPINTE

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université de Montpellier

Didier LE CERF

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Rouen Normandie

Thèse soutenue publiquement le 30 novembre 2023, devant le jury composé de :

Bruno JEAN

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CERMAV-CNRS Université
Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Vincent LAPINTE

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université de Montpellier

Rapporteur

Didier LE CERF

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Rouen Normandie

Rapporteur

Frédéric BOSSARD

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble-Alpes

Président

Etienne FLEURY

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, INSA Lyon

Examinateur

Anna SZARPAK

MAITRE DE CONFERENCES, Université Grenoble Alpes

Examinateur

Invités :

Sébastien ROLERE

INGENIEUR CHERCHEUR, CEA

Guillaume NONGLATON

INGENIEUR CHERCHEUR, CEA

Isabelle TEXIER-NOGUES

INGENIEUR CHERCHEUR, CEA



Résumé

Les polysaccharides sont de plus en plus fréquemment utilisés pour le développement de dispositifs médicaux. En effet, ces macromolécules biosourcées possèdent non seulement d'intéressantes propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité mais présentent également des caractéristiques bio-spécifiques particulières telles que la mucoadhésion, un caractère antibactérien ou une affinité biologique. En particulier, ces matériaux naturels peuvent être façonnés sous forme d'hydrogels dont les propriétés peuvent être modulées sur une large gamme afin de s'adapter, par exemple, aux propriétés mécaniques ou aux dimensions des tissus humains ou pour permettre l'encapsulation de principes actifs. Dans certains cas, la fabrication de structures 3D sophistiquées à base de ces matériaux est nécessaire. Dans ce contexte, les technologies de fabrication additive sont particulièrement adaptées pour répondre aux spécifications techniques des dispositifs biomédicaux. La méthode d'impression 3D de type « *vat photopolymerization* » permet notamment d'élaborer des objets solides de formes complexes par photo-polymérisation sous rayonnement ultraviolet (UV) de formulations préalablement sous forme liquide. Dans cette étude, nous avons exploré l'utilisation du 'digital light processing' (DLP) et de la polymérisation à deux-photons pour développer des hydrogels à base de carboxyméthylcellulose (CMC), un dérivé hydrophile de la cellulose. Ce travail a nécessité une approche multidisciplinaire de la chimie des polysaccharides à la compréhension des procédés d'impression 3D en passant par l'étude des propriétés physico-chimiques voire biologiques des matériaux conçus.

La CMC a en premier été modifiée avec de l'anhydride méthacrylique (AM) en milieu aqueux pour obtenir la carboxyméthylcellulose méthacrylate (mCMC), un polymère photo-réticulable. Différentes formulations aqueuses contenant des concentrations variables de mCMC avec des degrés de méthacrylation (DM) contrôlés sur une large gamme [0 ; 76 %] ont permis de former des hydrogels, puis des cryogels après lyophilisation. La modulation au sein de ces deux types de matériaux de la densité de méthacrylates réticulés, déterminée par RMN ¹³C du solide sur la gamme 4,3-13 μmol/cm³, entraîne une variété étendue de propriétés, notamment de gonflement (de 20 à 86), de viscoélasticité (avec une plage de module élastique G' de 1,4 à 16,7 kPa) et de structure. Des nanocristaux de cellulose (NCC), nanobâtonnets biosourcés préalablement fonctionnalisés par des groupements méthacrylate avec un DM de 0,83 % et non fonctionnalisés ont ensuite été ajoutés dans une formulation de mCMC afin de contrôler encore plus finement les propriétés des hydrogels et cryogels. Grâce à leur participation au réseau réticulé, l'introduction des mNCC a permis d'obtenir une cinétique de réticulation plus rapide, une meilleure résolution spatiale, des hydrogels plus stables et robustes après gonflement dans l'eau par rapport à la mCMC seule ou l'addition de NCC nus. Les matériaux développés se sont avérés non cytotoxiques et ont montré des propriétés compatibles avec une application telle que la réparation de tissus mous comme les reins ou les poumons. Cependant, la taille des pores des

structures tridimensionnelles, comprise entre 10 et 20 μm , ne permet pas la croissance des cellules de ces tissus. L'utilisation de la DLP pour la fabrication des hydrogels n'a pas permis de développer des structures matricielles tridimensionnelles avec une porosité suffisante (100 - 200 μm), mais cette caractéristique a été obtenue grâce à la P2P qui permet d'atteindre une résolution des parois de 10 μm . Par ailleurs, les hydrogels imprimés par DLP ont la particularité de ne pas gonfler dans un milieu physiologique (PBS, 37 °C) et de se dégrader en présence de cellulases.

Abstract

Innovative medical devices are increasingly based on the use of biomaterials, particularly polysaccharides, which display high biocompatibility, controlled biodegradability, and show specific advantageous biological properties, such as muco-adhesion, antimicrobial characteristics or bioaffinity. These natural macromolecules can be shaped into hydrogels with controllable properties to mimic the mechanical characteristics and dimensions of human tissues or for drug encapsulation purposes, for example. In some cases, sophisticated 3D structures based on these materials are required. In this regard, additive manufacturing technologies are well suited to meeting the technical specifications of biomedical devices. Specifically, 3D printing by "vat photopolymerization" enables complex forms to be fabricated from liquid resins using UV-induced photopolymerization. In this work, we explored digital light processing (DLP) and two-photon polymerization (2PP) to develop hydrogels made from carboxymethylcellulose (CMC), a hydrophilic derivative of cellulose. This work required a multidisciplinary approach, from the chemistry of polysaccharides to the understanding of 3D printing processes, via the study of the physico-chemical and even biological properties of the designed materials.

CMC was first chemically modified with methacrylic anhydride (MA) in aqueous medium to obtain carboxymethylcellulose methacrylate (mCMC), a photocrosslinkable polymer. Different aqueous formulations containing varying concentrations of mCMC with degrees of methacrylation (DM) controlled over a wide range [0; 76%] were used to form hydrogels, then cryogels after freeze-drying. The adjustment in these two materials of the density of cross-linked methacrylates, ranging from 4.3 to 13 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$, results in a wide variety of properties, including swelling (from 20 to 86), viscoelasticity (with a range of elastic modulus G' from 1.4 to 16.7 kPa) and structure. Cellulose nanocrystals (CNC), biosourced nanorods, either pre-functionalized with methacrylate groups with a DM = 0.83 % or non-functionalized CNCs were added to the formulations to further tailor the properties of photocrosslinked hydrogels and cryogels. Thanks to their participation in the reticulated network, the introduction of mNCCs resulted in faster cross-linking kinetics, better spatial resolution, and more stable and robust hydrogels after swelling in water than pure mCMC or NCC-containing formulations. The designed materials proved to be non-cytotoxic and showed properties compatible with an application such as the repair of soft tissues like kidneys or lungs. However, the pore size of the three-dimensional structures was in the range of 10-20 μm , which was not conducive to cell growth in these tissues. The manufacture of hydrogels by DLP did not provide matrices with sufficient porosity (100 to 200 μm), but this characteristic was achieved by 2PP, enabling a wall-thickness resolution of 10 μm . In addition, it was shown that DLP-printed hydrogels do not swell in physiological media (PBS, 37°C) and degrade in the presence of cellulases

Remerciements

Les remerciements c'est important. Fait y dont, faut pas y craindre qu'on m'a dit. Alors j'y fais.

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury, composé des examinateurs Étienne Fleury, Frédéric Bossard (président) et Anna Szarpak, ainsi que des rapporteurs Didier Le Cerf et Vincent Lapinte.

Merci à Bruno, Sébastien, Guillaume et Isabelle pour votre présence, votre aide et nos longues réunions qui auraient pu durer bien plus que 3 heures. Je vous remercie infiniment pour ces trois belles années que j'ai passées au CEA et au CERMAV sous votre encadrement. J'ai beaucoup appris et garde d'excellents souvenirs tant sur le plan scientifique que lors d'enrichissantes ou amusantes discussions que l'on a pu avoir sur d'autres sujets.

Je souhaite ensuite remercier Béatrice Labat et Angélique Schlepp pour leur contribution significative à l'obtention de certains résultats importants de ces travaux. Enfin, j'aimerais exprimer ma gratitude envers Sakthi pour son aide précieuse au début de ma thèse. Dans ce contexte, je tiens à saluer Flavie et Raphaël, deux individus exceptionnels, qui ont effectué leur stage de M1 et de M2, respectivement. Ils ont grandement apporté à la compréhension des résultats.

Cette thèse, réalisée au sein de trois labos (LFM au LITEN, L2CB au LETI et SPG au CERMAV) m'a permis de découvrir des personnes formidables, et la majorité du temps (99,9 %) on s'est bien marré. Je remercie donc toutes les personnes qui font partis de ces entités y compris celles du LMCM de m'avoir donné l'envie de me lever le matin en ayant hâte d'arriver au bureau. Les petites blagues de Stéphane ou de Jean à 7h45 du matin étaient plutôt sympatoches. Peu de temps après, le grand Jaco arrivait pour détendre les cervicales d'un thésard stressé par la rédaction. À ce propos, je tiens à remercier le fameux Xavier pour sa bonne humeur et d'avoir été, pendant un certain temps, mon bras droit aux côtés de Cécile. Il paraît que se fracturer un bras n'est pas recommandé pour manipuler.

Ensuite, je remercie le H1, restaurant 1 du CEA. C'est en mangeant bien que l'on vit bien. 4,5 € le plateau comprenant une entrée, deux plats, un fromage et un dessert. Croyez-moi qu'avec Thomas, on s'est fait plaisir. Parlant de Thomas, je le décris comme 1m85 (je crois) de conneries sans limite tant que la règle n°1 est respectée. Commenant sa journée en consultant C2C et la météo à la recherche du RTT condi et du sommet idéal, il m'a transmis sa passion pour le relief, m'initiant ainsi aux pratiques de la montagne. Amateur de chansons françaises, le karaoké était monnaie courante dans le bureau, avec en prime le fameux beatbox d'Antoine. Antoine, homme au rythme parfait et aux phrases culte telles que "bah tiens", "on est là", "c'est ta thèse" ou "moi je suis moi", est aussi un compagnon de montagne. La seule limite à nos délires, grimaces et sons ambigus était la ligne de poussière formée par nos pieds sous le bureau rarement lavé, ce qui provoquait souvent des éternuements chez Marie (je ne suis pas sûr que ce soit le cas, mais c'est une bonne transition). Marie, toujours avec un mot à la bouche " ", mais aussi avec un arsenal de bonnes blagues, mérite

la première place dans mon classement des personnes les plus. Sa spontanéité et sa sensibilité font d'elle une personne entière avec qui j'ai adoré discuter longuement et déconner. Elle restera toujours la fille que je préfère du bureau. N'oublions pas Aziz ou Zizou, le petit dernier du bureau, toujours en quête de progrès et d'affinement linguistique. Scientifique hors pair maniant aussi bien les équations que les quiproquos, son humour décalé a toujours été apprécié. Avec Antoine, Marie, Thomas et Aziz, nous formions un bureau éclectique qui restera inégalé dans la catégorie des bureaux de travail où les collègues sont devenus des amis. Je tiens à souligner qu'Antho, Doche et Lucas ont rejoint notre groupe pour une partie de la dernière année, apportant une ambiance dans la continuité de l'ancienne, malheureusement trop éphémère. Le panier offert par Ulrich était un élément central de notre décontraction.

J'aimerais ensuite remercier Baillard avec qui j'ai partagé une coloc durant ces trois années de thèse. Nous avons non seulement beaucoup ri et vécu des moments forts, mais il m'a également apporté un soutien précieux dans les moments plus délicats.

Un grand merci à l'ensemble de mes amis, qu'ils soient d'enfance, d'école ou de Grenoble, pour les moments de détente partagés. Mes sincères remerciements vont également à mes parents et à ma famille pour leur présence. Enfin, un grand merci au p'tit bout qui m'a supporté et aidé dans les moments difficiles.

Ce que je retiens c'est que c'était toujours beaucoup mieux que si c'était moins bien.

Liste des abréviations

3D	tridimensionnelle
AFM	<i>atomic force microscopy</i> - microscopie à force atomique
AH	acide hyaluronique
AM	anhydride méthacrylique
ATG	analyse thermogravimétrique
BAPO	oxyde de phénylbis(2,4,6-triméthylbenzoyl)phosphine
BAPO – OH	acide bismésitoylphosphinique
CMC	carboxyméthylcellulose
CP-MAS	<i>cross-polarization magic-angle spinning</i> - polarisation croisée et rotation à l'angle magique
D₂O	<i>deuterium oxide</i> – oxyde de deutérium
DEG	2,2'-(éthylènedioxy)diéthanethiol
DLS	<i>dynamic light scattering</i> - diffusion dynamique de la lumière
DLP	digital light processing
DM	degré de méthacrylation
DMF	diméthylformamide
DM_{surf}	degré de méthacrylation surfacique
DMSO-d₆	diméthylsulfoxyde deutéré
DN	degré de norbornénisation
DNP	<i>dynamic nuclear polarization</i> - polarisation nucléaire dynamique
DP	degré de polymérisation
DRX	diffraction des rayons X
DS	degré de substitution
DS_{surf}	degré de substitution surfacique
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i> - calorimétrie différentielle à balayage
DTT	dithiothreitol
EDC	1-éthyl-3-carbodiimide hydrochloride
FT-IR	<i>fourier transformed infrared</i> - infrarouge à transformée de Fourier
HEMA	hydroxyéthyl methacrylate
I2959	Irgacure 2959 [®]
Irgacure 2959[®]	1-Hydroxy-4'-(2-hydroxyéthoxy)-2-méthylpropiophénone

LAP	lithium phényl-2,4,6-triméthylbenzoylphosphinate
mCMC	carboxyméthylcellulose méthacrylate
MEB	microscopie électronique à balayage
MEC	matrice extracellulaire
MET	microscopie électronique en transmission
NCC	nanocristaux de cellulose
N_{eq} AM/OH_{CMC}	nombre d'équivalents en anhydride méthacrylique par groupe hydroxyle de la CMC
N_{eq} AM/OH_{surf}	nombre d'équivalents en anhydride méthacrylique par groupe hydroxyle en surface
NFC	nanofibrilles de cellulose
NHS	N-hydroxysuccinimide
NIPA	N-isopropylacrylamide
NQS	<i>non quaternary suppression</i> - suppression non quaternaire
P2CK	diylidene-bis(méthanylylidène) bis(4,1phénylène)-bis(méthylazanediy) dipropanoate
P2P	polymérisation à deux-photons
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> – tampon phosphate salin
PDI	polydispersité
PEG	poly éthylène glycol
PEGDA	poly éthylène glycol diacrylate
PLA	polylactide
PTFE	polytétrafluoroéthylène
RMN	résonance magnétique nucléaire
SLA	stéréolithographie
STL	<i>standard triangle language</i> – fichier de stéréolithographie
TC	taux de cristallinité
TCM	taux de conversion des méthacrylates
TGO	taux de gonflement
TPM	3-(triméthoxysilyl) propyl méthacrylate
UV	ultraviolet
VA-086	2,2'-azobis[2-méthyl-N-(2-hydroxyéthyl)propionamide]

Tables des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I. NOTIONS ET ÉTAT DE L'ART.....	7
I.1. INTRODUCTION	9
I.2. LES POLYSACCHARIDES	9
I.3. LA CELLULOSE.....	10
I.3.1. Structure de la cellulose.....	10
I.3.2. La carboxyméthylcellulose (CMC)	12
I.3.2.1. Structure de la carboxyméthylcellulose.....	12
I.3.2.2. Synthèse	13
I.3.2.3. Propriétés	14
I.3.1. Les nanocristaux de cellulose (NCC)	16
I.3.1.1. Synthèse et propriétés.....	16
I.3.1.2. Modification surfacique des NCC.....	17
I.4. HYDROGELS : DES MATÉRIAUX PARTICULIÈREMENT ADAPTÉS AUX APPLICATIONS MÉDICALES	19
I.4.1. Définition et structure des gels et des hydrogels	19
I.4.1.1. Qu'est-ce qu'un gel ?.....	19
I.4.1.2. Qu'est-ce qu'un hydrogel ?	21
I.4.2. Applications des hydrogels utilisés dans le domaine biomédical.....	22
I.4.2.1. Scaffold pour la réparation de tissus biologiques.....	23
I.4.2.2. Délivrance de principes actifs.....	24
I.4.2.3. Cicatrisation de plaies	24
I.4.2.4. Biocapteurs.....	25
I.4.3. Propriétés importantes des hydrogels destinés à des applications biomédicales... 25	
I.4.3.1. Taux de gonflement	26
I.4.3.2. Propriétés viscoélastiques.....	26
I.4.3.3. Rigidité et capacité de déformation	27
I.4.3.4. Biocompatibilité et biodégradabilité.....	28
I.4.3.5. Porosité.....	29
I.4.4. Transformation des hydrogels en cryogels	30
I.5. FABRICATION ADDITIVE D'HYDROGELS PAR PHOTO-RÉTICULATION UV	32
I.5.1. Présentation des techniques de type « vat photopolymerization »	33
I.5.2. Mécanismes réactionnels	35
I.5.2.1. Polymérisation radicalaire	35
I.5.2.2. Photo-amorceurs pour la photo-polymérisation radicalaire.....	36
I.5.2.3. Comparaison des différentes voies de réticulation UV.....	40
I.5.3. Impression 3D d'hydrogels à partir de formulations de polysaccharides photo-réticulables	43
I.6. LES HYDROGELS DE CMC.....	50
I.6.1. Hydrogels de CMC norbornène (NorCMC)	50
I.6.2. Méthacrylation de la CMC	53

I.6.3. Propriétés des hydrogels et cryogels de mCMC.....	57
I.6.4. Hydrogels composites de mCMC.....	61
I.6.4.1. Exemple de l'ajout d'un agent réticulant	61
I.6.4.2. Ajout de nanocristaux de cellulose	61
I.6.4.3. Ajout de nanocristaux de cellulose méthacrylate	63
I.6.5. Fabrication additive d'hydrogels de mCMC	65
I.7. CONCLUSIONS	68
RÉFÉRENCES.....	69

CHAPITRE II. PARTIE EXPÉRIMENTALE 85

II.1. INTRODUCTION	87
II.2. MATIÈRES PREMIÈRES.....	87
II.3. SYNTHÈSES, FORMULATIONS ET MISE EN FORME D'HYDROGELS ET DE CRYOGELS . 88	
II.3.1. Synthèses	88
II.3.1.1. Méthacrylation de la carboxyméthylcellulose.....	88
II.3.1.2. Préparation des nanocristaux de cellulose	89
II.3.1.3. Méthacrylation des nanocristaux de cellulose	90
II.3.2. Formulations.....	91
II.3.2.1. Formulations aqueuses de carboxyméthylcellulose méthacrylate	91
II.3.2.2. Formulations cellulosiques à base de mCMC contenant des NCC/mNCC.....	91
II.3.3. Préparation des hydrogels et des cryogels pour les chapitres III et IV	92
II.3.4. Formation des hydrogels dans le chapitre V	93
II.3.4.1. Digital light processing et paramètres d'impression des hydrogels	93
II.3.4.2. Polymérisation à 2-photons et paramètres d'impression des hydrogels.....	94
II.3.5. Etude de l'épaisseur de couche réticulée en fonction du temps	95
II.4. CARACTÉRISATIONS	97
II.4.1. Spectroscopie et microscopie	97
II.4.1.1. Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)	97
II.4.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR).....	98
II.4.1.3. Spectroscopie UV-visible	98
II.4.1.4. Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	99
II.4.1.5. Microscopie électronique à balayage (MEB).....	99
II.4.1.6. Microscopie électronique en transmission (MET)	100
II.4.2. Diffraction des rayons X (DRX)	100
II.4.3. Analyse thermique des matériaux	101
II.4.4. Dosage conductimétrique	102
II.4.5. Tests de gonflement et dégradation enzymatique	103
II.4.5.1. Taux de gonflement	103
II.4.5.2. Théorie de Flory-Rehner.....	104
II.4.5.3. Tests de dégradation enzymatique.....	105
II.4.6. Rhéologie	105
II.4.6.1. Mesures de viscosité.....	106
II.4.6.2. Rhéologie en temps réel	106
II.4.6.3. Mesures d'oscillation en fréquence.....	108
RÉFÉRENCES	110

CHAPITRE III. SYNTHÈSE ET MISE EN FORME DE FORMULATIONS AQUEUSES DE CARBOXYMÉTHYLCELLULOSE MÉTHACRYLATE..... 113

III.1. INTRODUCTION	115
III.2. SYNTHÈSE DE LA CARBOXYMÉTHYLCELLULOSE MÉTHACRYLATE.....	116
III.2.1. Détermination du degré de méthacrylation.....	116
III.2.2. Influence des paramètres du protocole sur le DM	120
III.2.2.1. Effet de la température et du nombre d'équivalents en AM/OHCMC	120
III.2.2.2. Effet du pH.....	121
III.2.2.3. Effet de la concentration initiale en CMC	122
III.2.2.4. Effet de la vitesse et du type d'agitation	123
III.2.3. Influence des paramètres du protocole sur les cinétiques de méthacrylation ...	125
III.2.3.1. Effet de la concentration en soude	126
III.2.3.2. Effet de la vitesse et du type d'agitation	126
III.2.4. Conclusions intermédiaires	128
III.3. CARACTÉRISATIONS AVANCÉES DES CMC ET MCMC	130
III.4. FORMULATIONS ET MISE EN FORME D'HYDROGELS ET DE CRYOGELS.....	133
III.4.2. Choix des formulations et des paramètres de mise en forme.....	133
III.4.3. Viscosité des formulations de mCMC	134
III.4.4. Influence de la durée d'insolation sur le taux de conversion des méthacrylates	135
III.5. PROPRIÉTÉS DES HYDROGELS ET DES CRYOGELS	138
III.5.1 Microstructure.....	138
III.5.1.1. Densité de méthacrylates réticulés et porosité.....	138
III.5.2.2. Taux de gonflement.....	141
III.5.2. Propriétés viscoélastiques	144
III.6. CONCLUSIONS	149
RÉFÉRENCES.....	151

CHAPITRE IV. RENFORCEMENT D'HYDROGELS DE MCMC PAR L'AJOUT DE NANOCRISTAUX DE CELLULOSE AVEC ET SANS MÉTHACRYLATES..... 155

IV.1. INTRODUCTION	157
IV.2. MÉTHACRYLATION DES NCC	158
IV.2.1. Détermination du degré de méthacrylation.....	158
IV.2.3. Taux de cristallinité	161
IV.2.4. Evolution du DS	163
IV.2.5. Cinétique de méthacrylation	164
IV.3. DISPERSIONS DES NCC ET MNCC	166
IV.3.1. Dispersion des nanocristaux dans l'eau	166
IV.3.2. Dispersion des NCC dans une solution de mCMC.....	169
IV.3.3. Formulations de mCMC avec NCC ou mNCC	172
IV.4. PROPRIÉTÉS DES HYDROGELS ET CRYOGELS DE MCMC / (M)CNC	175

IV.4.1. Microstructure.....	175
IV.4.1.1. Densité de méthacrylates réticulés et porosité.....	175
IV.4.1.2. Taux de gonflement.....	179
IV.4.2. Propriétés viscoélastiques.....	183
IV.4.3. Cytocompatibilité.....	187
IV.5. IMPRIMABILITÉ DES FORMULATIONS.....	188
IV.5.1. Etude du temps de gélification.....	188
IV.5.2. Résolution spatiale des hydrogels.....	189
IV.6. CONCLUSIONS.....	192
RÉFÉRENCES.....	193

CHAPITRE V. FABRICATION ADDITIVE D’HYDROGELS À PARTIR DE FORMULATIONS CELLULOSIQUES PHOTOSENSIBLES 199

V.1. INTRODUCTION.....	201
V.2. ETUDE DE L’INFLUENCE DU PHOTO-AMORCEUR ET DE LA LONGUEUR D’ONDE DU RAYONNEMENT UV.....	202
V.2.1. Influence de la nature du photo-amorceur sur les cinétiques de photo-réticulation.....	202
V.2.1.1. Evolution des temps de gélification mesurés par rhéologie en temps réel.....	203
V.2.1.2. Imprimabilité des résines.....	204
V.2.1.3. Temps de conversion maximale des méthacrylates.....	205
V.2.2. Influence du photo-amorceur sur les propriétés des hydrogels.....	208
V.2.2.1. Propriétés viscoélastiques.....	208
V.2.2.2. Taux de gonflement.....	209
V.3. IMPRESSION D’HYDROGELS PAR DLP.....	211
V.3.1. Résolution dans les directions X et Y.....	212
V.3.2. Résolution dans la direction Z.....	217
V.4. PROPRIÉTÉS D’HYDROGELS IMPRIMÉS PAR DLP.....	219
V.4.1. Propriétés viscoélastiques et effet du post-traitement UV.....	219
V.4.2. Propriétés en milieu physiologique.....	221
V.4.2.1. Taux de gonflement et propriétés viscoélastiques.....	221
V.4.2.2. Dégradation enzymatique.....	224
V.5. IMPRESSION D’HYDROGELS DE MCMC PAR P2P.....	227
V.6. CONCLUSIONS.....	232
RÉFÉRENCES.....	233

CONCLUSION GÉNÉRALE 237

ANNEXES..... 245

Introduction générale

Socrate a écrit « Existe-t-il pour l'Homme un bien plus précieux que la santé ? ». Depuis des millénaires, l'homme tente de comprendre, de détecter et de soigner les maladies et les infections du corps. La médecine actuelle offre une multitude de solutions pour préserver la santé humaine et a considérablement amélioré la qualité de vie d'innombrables personnes. Cependant, les solutions actuelles demeurent imparfaites et les recherches dans ce domaine continuent d'évoluer afin de les améliorer. En particulier, les traitements médicamenteux, les dispositifs implantables « passifs » (prothèses, implants, etc.) et « actifs » (pacemakers, neurostimulants, etc.) ou encore les méthodes de restauration de la peau souffrent de certaines limitations. En effet, l'efficacité de ces solutions biomédicales dépend majoritairement de leur capacité à répondre à des contraintes spécifiques liées à leur domaine d'utilisation. Ainsi, les médicaments doivent être capables de pénétrer dans l'organisme de manière contrôlée et ciblée pour atteindre la zone affectée et exercer leur effet thérapeutique sans causer d'effets secondaires indésirables. Les dispositifs implantables doivent quant à eux être biocompatibles à long terme. Ils peuvent également être biorésorbables à court ou moyen terme. D'autre part, la médecine régénératrice de tissus a souvent recours à la greffe, pouvant engendrer des risques de transmission de maladies infectieuses, des coûts élevés et souffre de la disponibilité limitée des organes et tissus. Également, la cicatrisation des plaies ne permet pas de restaurer la totalité des fonctions de la peau, et s'accompagne souvent de la formation de tissus cicatriciels.

Pour répondre à ces enjeux de santé, une partie des travaux scientifiques actuels s'appuient sur le développement de nouveaux biomatériaux sous la forme d'hydrogels. Ces structures tridimensionnelles sont biocompatibles, capables d'absorber et de retenir une grande quantité de fluide. D'autre part, certains hydrogels possèdent des similitudes mécaniques avec les tissus biologiques [1,2]. Les polysaccharides sont de plus en plus étudiés dans la littérature pour la conception d'hydrogels en raison de certaines de leurs caractéristiques: biocompatibilité, biodégradabilité, abondance naturelle et capacité à être modifiés chimiquement pour moduler leurs propriétés et leurs fonctionnalités vis-à-vis d'applications spécifiques [3,4]. Dans cette famille, la carboxyméthylcellulose (CMC), dérivé hydrophile de la cellulose, est un candidat idéal pour le développement d'hydrogels innovants pour le domaine biomédical [5].

En parallèle, la médecine tend à s'appuyer de plus en plus sur la fabrication additive, couramment appelée impression 3D, en raison de sa capacité à produire des dispositifs personnalisés (prothèses, implants, orthèses, etc.) et des modèles anatomiques précis à partir de données de scanners médicaux [6]. Dans un environnement où les décisions matérielles sont de plus en plus basées sur les coûts, l'impression 3D permet de produire rapidement des dispositifs médicaux, en faible volume, voire à l'unité. Dans le domaine des hydrogels, la fabrication additive est envisagée pour la production de structures 3D complexes qui peuvent

être utilisées pour créer des tissus artificiels et adaptées aux besoins spécifiques du patient, améliorant ainsi l'efficacité des traitements médicaux [7]. Cependant, l'impression des hydrogels reste encore source de difficultés techniques afin d'obtenir des matériaux avec une résolution adaptée à l'application et mécaniquement stable tout en conservant une forte quantité d'eau [8,9].

Ce travail de thèse, mené dans le cadre d'une collaboration entre le CEA-Liten, le CEA-Leti et le CERMAV, financée par le PTC Matériaux et Procédés du CEA (projet Cellulo'Med), se concentre sur la synthèse de dérivés cellulosiques photosensibles pour la fabrication additive d'hydrogels à visées biomédicales. Dans cette étude, la CMC a été chimiquement modifiée et mise en forme par le digital light processing (DLP) et par photo-polymérisation à deux photons (P2P). Les propriétés des hydrogels ainsi obtenus ont été caractérisées afin de déterminer leurs applications potentielles, telles que la libération de principes actifs ou la réparation de tissus biologiques.

Le premier chapitre de cette thèse présente un état de l'art sur la composition, la mise en forme et les propriétés requises d'hydrogels dédiés à diverses applications biomédicales. Une attention particulière est portée sur la formation de ces matériaux par photo-polymérisation sous rayonnement UV, ainsi que sur les méthodes d'impression 3D utilisant ce principe. La fonctionnalisation de la CMC pour ce type d'impression, ainsi que les propriétés des hydrogels imprimés, seront examinées en détail. Le deuxième chapitre de cette thèse décrit le matériel expérimental utilisé et les méthodes mises en œuvre dans le cadre de ces travaux de recherche.

Les trois chapitres suivants présentent les résultats obtenus au cours de ces trois années. Ainsi, le troisième chapitre décrit d'abord la méthacrylation de la CMC pour obtenir la CMC méthacrylate (mCMC), ensuite utilisée pour former des hydrogels et des cryogels à partir de différentes formulations. Les propriétés des matériaux sont caractérisées et comparées à celles rapportées dans la littérature. Le quatrième chapitre explique l'influence de l'ajout de nanocristaux de cellulose (NCC) et de NCC fonctionnalisés avec des groupements méthacrylates sur les propriétés des hydrogels et des cryogels de mCMC. Enfin, le cinquième et dernier chapitre développe la fabrication additive d'hydrogels par DLP et P2P, à partir de formulations de mCMC. En définitive, les résultats exposés dans ce manuscrit ouvrent la voie à diverses applications biomédicales concrètes pour les hydrogels de mCMC imprimés, notamment la réparation de tissus biologiques, la création de biocapteurs ou l'administration de principes actifs.

1. Chai, Q.; Jiao, Y.; Yu, X. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels* **2017**, *3*, 6, doi:10.3390/gels3010006.
2. Chamkouri, H. A Review of Hydrogels, Their Properties and Applications in Medicine. *AJBSR* **2021**, *11*, 485–493, doi:10.34297/AJBSR.2021.11.001682.
3. *Hydrogels: Biological Properties and Applications*; Barbucci, R., Ed.; Springer: Milan ; New York, 2009; ISBN 978-88-470-1103-8.
4. Kirschning, A.; Dibbert, N.; Dräger, G. Chemical Functionalization of Polysaccharides-Towards Biocompatible Hydrogels for Biomedical Applications. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 1231–1240, doi:10.1002/chem.201701906.
5. Rahman, Md.S.; Hasan, Md.S.; Nitai, A.S.; Nam, S.; Karmakar, A.K.; Ahsan, Md.S.; Shiddiky, M.J.A.; Ahmed, M.B. Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose. *Polymers* **2021**, *13*, 1345, doi:10.3390/polym13081345.
6. Giannatsis, J.; Dedoussis, V. Additive Fabrication Technologies Applied to Medicine and Health Care: A Review. *Int J Adv Manuf Technol* **2009**, *40*, 116–127, doi:10.1007/s00170-007-1308-1.
7. Naranda, J.; Bračić, M.; Vogrin, M.; Maver, U. Recent Advancements in 3D Printing of Polysaccharide Hydrogels in Cartilage Tissue Engineering. *Materials* **2021**, *14*, 3977, doi:10.3390/ma14143977.
8. Bom, S.; Ribeiro, R.; Ribeiro, H.M.; Santos, C.; Marto, J. On the Progress of Hydrogel-Based 3D Printing: Correlating Rheological Properties with Printing Behaviour. *International Journal of Pharmaceutics* **2022**, *615*, 121506, doi:10.1016/j.ijpharm.2022.121506.
9. Li, J.; Wu, C.; Chu, P.K.; Gelinsky, M. 3D Printing of Hydrogels: Rational Design Strategies and Emerging Biomedical Applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2020**, *140*, 100543, doi:10.1016/j.mser.2020.100543.

Ces travaux ont donné lieu à différentes productions et valorisations scientifiques :

Conférences

- ❖ Lénaïc Soullard, Sébastien Rolere, Guillaume Nonglaton, Isabelle Texier-Nogues et Bruno Jean, *Chemical modification of carboxymethylcellulose (CMC) with photocrosslinkable groups for the manufacturing of medical devices by stereolithography (SLA)*, au 7th European polysaccharide network of excellence (EPNOE), 2021, Nantes, France. Présentation d'un poster.

- ❖ Lénaïc Soullard, Sébastien Rolere, Guillaume Nonglaton, Isabelle Texier-Nogues et Bruno Jean, *Conception d'hydrogels et de cryogels à porosité contrôlée par réticulation de carboxyméthylcellulose pour des applications biomédicales*, au GdR durabilité des matériaux biosourcés (DUMBIO), 2022, Grenoble, France. Présentation orale.

- ❖ Lénaïc Soullard, Sébastien Rolere, Guillaume Nonglaton, Isabelle Texier-Nogues et Bruno Jean, *Synthesis of methacrylated carboxymethylcellulose for the design of hydrogels dedicated to biomedical applications*, au 5th European polysaccharide network of excellence Junior (EPNOE junior), 2022, Aveiro, Portugal. Présentation d'un poster. Organisation d'un symposium et chairperson.

- ❖ Lénaïc Soullard, Angélique Schlepp, Beatrice Labat Sébastien Rolere, Guillaume Nonglaton, Isabelle Texier-Nogues et Bruno Jean, *3D printing of high-resolution hydrogels based on photosensitive cellulosic formulation dedicated to biomedical applications*, au 33rd European society of biomaterials (ESB), 2023, Davos, Suisse. Présentation d'un poster

Publications

- ❖ Lénaïc Soullard, Pierre-Alain Bayle, Christine Lancelon-Pin, Sébastien Rolere, Isabelle Texier, Bruno Jean and Guillaume Nonglaton, *Optimization of the methacrylation of carboxymethylcellulose and use for the design of hydrogels and cryogels with controlled structure and properties*. *Cellulose*, 30, pages 6203–6217 (2023). DOI:[10.1007/s10570-023-05266-w](https://doi.org/10.1007/s10570-023-05266-w).

- ❖ Lénaïc Soullard, Flavie Pradalié, Béatrice Labat, Christine Lancelon-Pin, Guillaume Nonglaton, Sébastien Rolere, Isabelle Texier and Bruno Jean, *Methacrylated cellulose nanocrystals as fillers for the development of photo-crosslinkable cytocompatible biosourced formulations targeting 3D printing*. *Biomacromolecules*, 12, pages 6009 – 6024 (2023). DOI: [10.1021/acs.biomac.3c01090](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c01090)

- ❖ Lénéïc Soullard, Angélique Schlepp, Raphaël Buret, Guillaume Nonglaton, Isabelle Texier, Bruno Jean and Sébastien Rolere, Titre à voir. *3D printing of hydrogels by vat-photopolymerization techniques of methacrylated carboxymethylcellulose aqueous formulations*. En cours de rédaction.

Encadrements

- ❖ Stagiaire de M1, Flavie Pradalié, d'avril à juillet 2022, *Modification chimique de dérivés cellulosiques pour la fabrication de cryogels à forte tenue mécanique*.
- ❖ Stagiaire de M2, Raphaël Buret, de février à août 2023, *Amélioration de la biodégradabilité en milieu biologique d'hydrogels biosourcés imprimables en 3D, pour le développement de dispositifs médicaux implantables*.
- ❖ Encadrement de 25 h de TP/TD en chimie générale (BUT mesures physique, UGA, Grenoble)

Autres

- ❖ Mise en place d'un partenariat avec Béatrice Labat, Université de Rouen Normandie sur les tests de cytotoxicité.
- ❖ Mise en place d'un partenariat avec la startup Microlight3D sur l'impression par polymérisation à 2-photons. Tests réalisés par Angélique Schlepp.
- ❖ Finaliste ma thèse en 180 secondes (MT180), Académie de Grenoble.

CHAPITRE I.

Notions et état de l’art

I.1. INTRODUCTION

L'objectif de ce chapitre est de présenter et de définir la composition et les propriétés des hydrogels dédiés aux applications médicales. Grâce à leur structure réticulée, leur capacité d'absorption d'eau, leur biocompatibilité et leur biodégradabilité, ces hydrogels présentent un potentiel considérable pour la régénération tissulaire et la libération contrôlée de médicaments, par exemple. Afin de les façonner pour répondre à ces applications, il est possible de les modifier chimiquement et de les mettre en forme par fabrication additive. Dans ce contexte, diverses techniques ont été développées, mais les techniques de stéréolithographie (SLA) offrent les meilleures résolutions en utilisant la photo-polymérisation d'un polymère en milieu liquide. Ce chapitre abordera les fonctions chimiques et les paramètres nécessaires pour obtenir des propriétés physiques et chimiques des hydrogels adaptées (taux de gonflement, viscoélastique, porosité, etc.). L'accent sera principalement mis sur les hydrogels de polysaccharides, notamment la carboxyméthylcellulose (CMC), en raison de sa biocompatibilité, son abondance naturelle et sa solubilité dans l'eau.

I.2. LES POLYSACCHARIDES

Les polysaccharides sont les polymères naturels les plus abondants. Ils sont retrouvés dans diverses sources renouvelables telles que les algues, les plantes et les microorganismes comme les champignons et les bactéries. Ces macromolécules sont composées de la répétition d'un ou plusieurs sucres élémentaires liés entre eux par des liaisons osidiques. Leur structure varie en fonction des types de liaisons (α ou β), de la séquence des monosaccharides qui les composent (**Figure I-1a**) [1]. Il existe différents types de polysaccharides, tels que l'amidon, la cellulose, le chitosane, l'acide hyaluronique (AH), le pullulane, le dextrane, etc. (**Figure I-1b**). Chacun de ces polysaccharides possède une structure, des propriétés et des fonctions spécifiques. Ils jouent un rôle crucial dans la nature, car ils constituent l'une des principales sources de stockage et de fourniture d'énergie pour les êtres vivants et sont également essentiels pour la structure et la fonction des cellules et des tissus [1]. La diversité des sources pouvant produire des polysaccharides en font des substances de choix comme matériaux de départ pouvant être modifiés chimiquement et utilisés dans différents domaines tels que l'alimentaire, l'énergie, le papier, les textiles, etc. [1]. Enfin, les polysaccharides sont largement utilisés dans les applications biomédicales en raison de leur biocompatibilité et leur biodégradabilité et également de leurs propriétés bio-spécifiques particulières (e.g. mucoadhésion, caractère antibactérien, affinité biologique) [1–3].

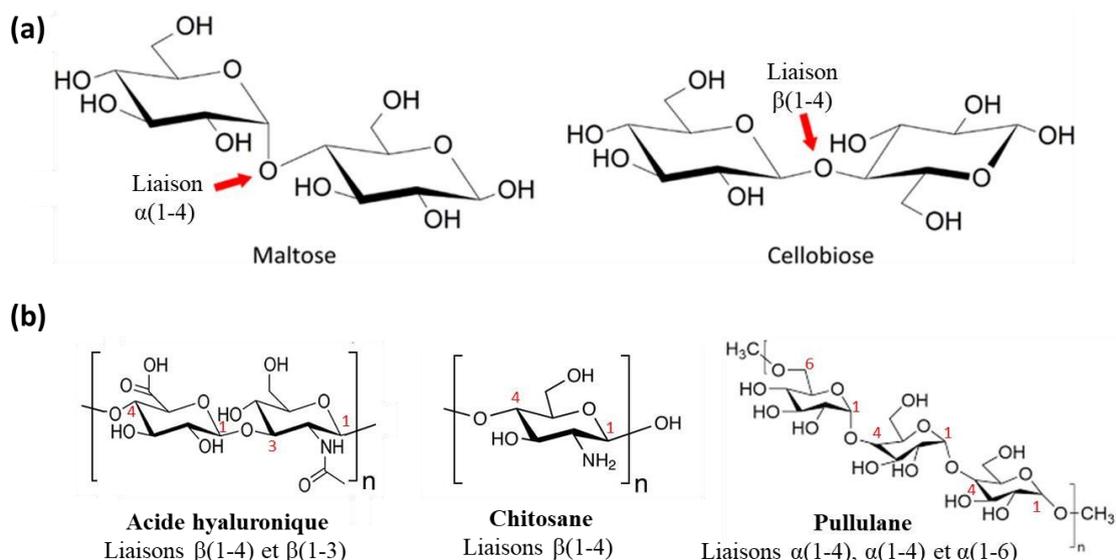


Figure I-1 : (a) Représentation schématique des liaisons glycosidiques α et β à partir de molécules de D-glucose et formant la maltose par des liaisons $\alpha(1-4)$ et la cellobiose par des liaisons $\beta(1-4)$, respectivement. (b) Exemples de polysaccharides [4,5].

I.3. LA CELLULOSE

I.3.1. STRUCTURE DE LA CELLULOSE

Découverte en 1838 par le chimiste français Anselme Payen, la cellulose est le polysaccharide le plus abondant dans la nature [6]. Elle est le principal constituant des parois des cellules des végétaux (40 - 50 %m) avec l'hémicellulose (25 - 30 %m) et la lignine (15 - 20 %m) et peut être extraite de différentes manières par des procédés mécaniques et/ou chimiques [7]. Certaines bactéries (e.g. *Sarcina ventriculi*, *Agrobacterium tumefaciens*) et algues (*Chlorophyta*, *Phaeophyta*) sont aussi composées de cellulose. Utilisée depuis des temps immémoriaux, en particulier pour la création de papier, la cellulose a acquis une nouvelle dimension au 21^e siècle. Son abondance et ses propriétés en font un matériau largement exploré dans la recherche contemporaine.

La formule chimique de la cellulose, $C_6H_{10}O_5$, a été établie par Willstätter en 1913 [8]. Sa structure moléculaire (β -(1 \rightarrow 4)-D-Glucose) a été déterminée par Hermann Staudinger en 1920 [9]. Son degré de polymérisation moyen exprimé en nombre d'unités anhydroglucose (AGU) varie de 1 000 à 27 000 selon la source de cellulose. Il est par exemple de 1 500 unités pour la cellulose de pâte de bois, 20 000 pour la cellulose de la paroi secondaire du coton et 27 000 pour l'algue *Valonia* [10]. Une rotation de 180° est observée d'un monomère à l'autre le long de l'axe de la chaîne polymère [11]. La cellulose présente deux groupements terminaux différents, résultant du processus de biosynthèse (Figure I-2a). Le premier groupement terminal est composé d'un groupe hydroxyle pendant non réducteur. La seconde extrémité est

constituée d'un groupe réducteur avec un équilibre entre un hémiacétal libre et un groupe aldéhyde (**Figure I-2b**). Chaque unité d'anhydroglucose possède trois groupes hydroxyles : un alcool primaire sur le carbone C6 et deux alcools secondaires sur les carbones C2 et C3 (**Figure I-2a**). Les chaînes de cellulose sont assemblées dans une structure cristalline formée par un réseau de liaisons hydrogène inter et intra-moléculaires (**Figure I-2c**). Cette organisation est à l'origine des propriétés mécaniques du bois et rend la cellulose insoluble dans la plupart des solvants [12].

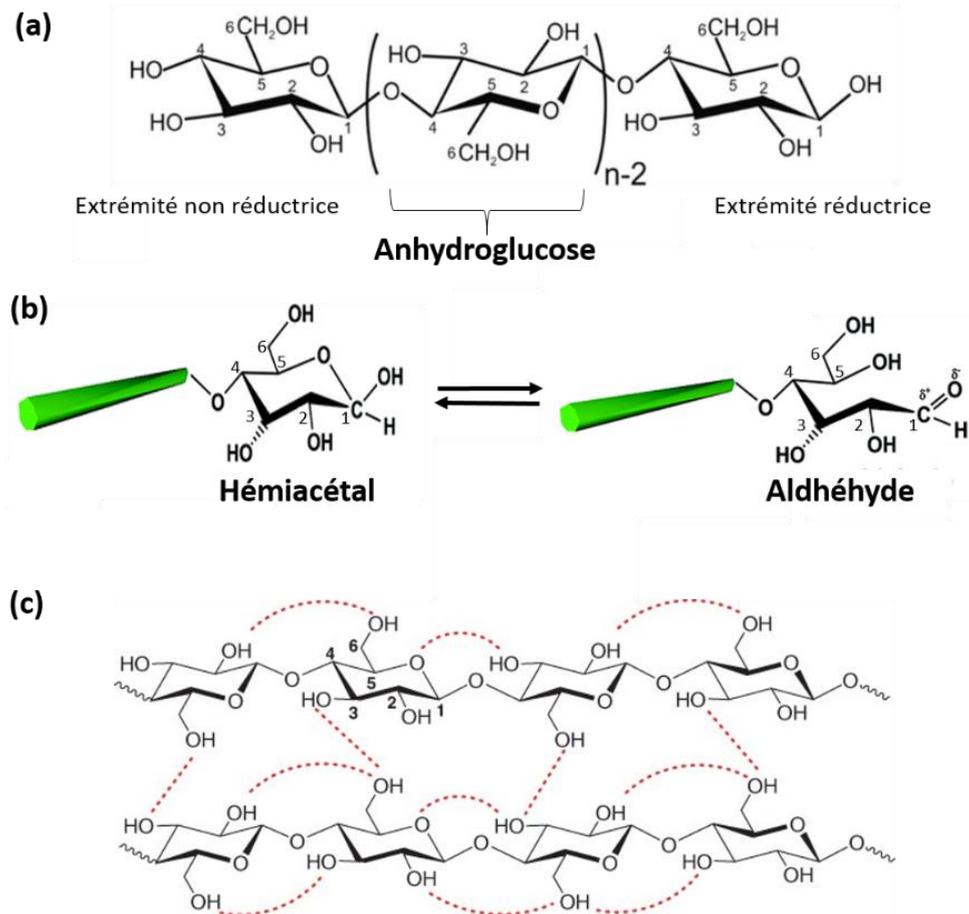


Figure I-2 : (a) Structure moléculaire de la cellulose, (b) équilibre réversible entre les groupes hémiacétal et aldéhyde à l'extrémité réductrice de la cellulose, (c) organisation des liaisons hydrogène inter et intramoléculaires de la cellulose. Illustrations modifiées de [13,14].

La formation des chaînes de cellulose se fait dans les parois des cellules des végétaux par la cellulose synthase qui catalyse la polymérisation des molécules de glucose pour former la cellulose. Ensuite, des complexes enzymatiques appelés complexes terminaux (*terminal complex*, TC) regroupent des chaînes cellulosiques produites pour former les fibrilles de cellulose (**Figure I-3b**). Les TC sont constitués de sous-unités identiques dont chacune possède des sites catalytiques formant une fibrille de cellulose. La structure des TC et le nombre de sites catalytiques dans les sous-unités varient selon la source de la cellulose. Ces paramètres influent

sur l’organisation et l’orientation des chaînes entre elles, le degré de cristallisation et de polymérisation. Ensuite, les fibrilles formées par les TC s’organisent en microfibrilles (**Figure I-3c**). Elles sont constituées de chaînes de cellulose organisées en structures cristallines reliées par des régions désordonnées (**Figure I-3d**). Une fois formées, les microfibrilles de cellulose s’assemblent pour former le réseau tridimensionnel qui constitue la paroi cellulaire [15].

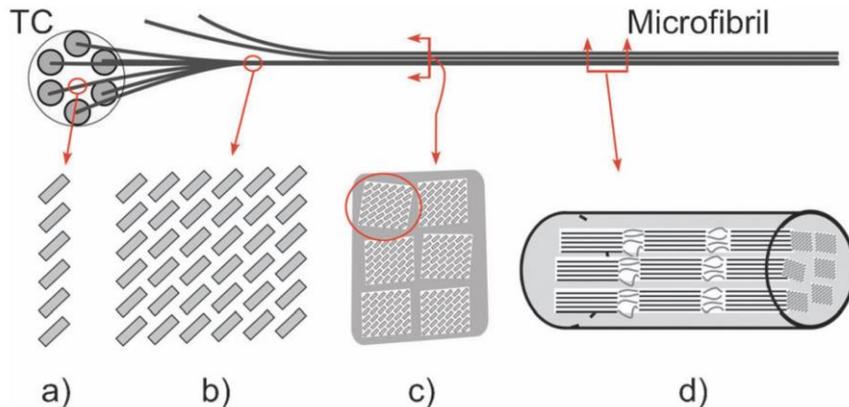


Figure I-3 : Schéma des différents niveaux de formation d'une microfibrille de bois, (a) coupe transversale d'un feuillet de chaînes de celluloses supposé se former à partir d'une seule sous-unité de la Terminal complex (TC), dans laquelle les forces de van der Waals maintiennent les chaînes de cellulose ensemble. Chaque rectangle gris représente une chaîne de cellulose avec l'axe de la chaîne perpendiculaire au plan de l'image, (b) coupe transversale d'une fibrille élémentaire, assemblage de 36 chaînes de cellulose dans un réseau cristallin. La consolidation de plusieurs fibrilles élémentaires forme une microfibrille, (c) coupe transversale d'une microfibrille composée de 6 fibrilles élémentaires, (d) coupe latérale d'une microfibrille montrant la configuration en série des régions cristallines et amorphes [15].

I.3.2. LA CARBOXYMÉTHYLCELLULOSE (CMC)

I.3.2.1. Structure de la carboxyméthylcellulose

Grâce aux groupements hydroxyles de la cellulose, plusieurs réactions chimiques sont envisageables afin de lui conférer d'autres propriétés (mécaniques, physiques, etc). Cette modification chimique peut également permettre d'isoler les chaînes pour obtenir des dérivés cellulosiques tels que la méthylcellulose, l'acétate de cellulose, l'hydroxyéthylcellulose ou encore la carboxyméthylcellulose [16].

La carboxyméthylcellulose (CMC), souvent présente sous forme de sel de sodium, de formule brute $C_6H_7O_2(OH)_{3-x}(OCH_2COONa)_x$, est un dérivé cellulosique (**Figure I-4**) dont la production augmente continuellement [17]. Elle a été obtenue pour la première fois en 1918 et commercialisée en 1920 par l'entreprise allemande IG Farbenindustrie AG [18]. Tout comme la cellulose, les recherches liées à la CMC augmentent avec le temps et particulièrement depuis

le début du 21^{ème} siècle. En effet, 198 nouveaux articles scientifiques ont été publiés en 2000, contre 984 en 2022 (base de données Scopus).

Sa popularité provient de son faible coût de production, de sa biocompatibilité et, contrairement à la cellulose, de sa solubilité dans l’eau grâce à ses groupements carboxylates (**Figure I-4**). Les propriétés physico-chimiques de la CMC varient à la fois avec sa masse molaire et le degré de substitution (nombre de fonctions carboxyméthyles par unité). En conséquence, la CMC trouve une large gamme d’applications dans des secteurs diversifiés tels que le textile, la construction, les cosmétiques, les plastiques et plus récemment le biomédical. En effet, la CMC possède des propriétés d’adhésion cellulaire, est cytocompatible et permet la croissance cellulaire [19].

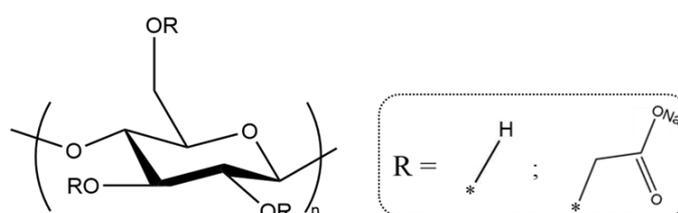


Figure I-4 : Structure moléculaire de la carboxyméthylcellulose sous forme de sel de sodium. Le degré de substitution (*DS*), représente le nombre moyen de groupes $\text{CH}_2\text{CO}_2^-\text{Na}^+$ par AGU. Modifiée de [20].

I.3.2.2. Synthèse

La CMC est un polysaccharide ionique dérivé de la cellulose, obtenu par greffage d’une fonction carboxylate sur les hydroxyles de l’anhydroglucose. Celle-ci se fait préférentiellement sur l’hydroxyle primaire du carbone C6, puis sur les hydroxyles secondaires des carbones C2 et C3. La synthèse est réalisée en deux étapes. La première étape consiste à merceriser la cellulose puis à déprotoner le groupement hydroxyle avec l’ajout d’un excès de soude (NaOH) pendant 30 min à 1h30 à 25 - 30 °C. La deuxième étape est la réaction d’estérification entre l’alcool déprotoné et l’acide monochloroacétique (ClCH_2COOH) [21–25]. Cette dernière étape est réalisée pendant 1 à 4 h entre 50 et 60 °C, dans l’éthanol, utilisé en tant que diluant et agent de gonflement pour faciliter l’accès du réactif chloré dans la structure de la cellulose. Après ces deux étapes, une suspension est obtenue. Elle est centrifugée, filtrée, neutralisée, lavée à l’alcool et enfin séchée.

Lors de ces deux étapes, il est important de contrôler les quantités de réactifs, la température et le temps de réaction afin d’obtenir le DS souhaité [19,24]. Ce dernier dépend aussi de la source de la cellulose utilisée [19]. Le DS a une importance majeure sur les différentes propriétés de la CMC. Le DS est compris dans la gamme [0-3] [18,25]. Il peut être déterminé par RMN ^{13}C CP-MAS, par chromatographie liquide après dépolymérisation de la

CMC [18] ou par dosage de la fonction acide par conductimétrie, pH-métrie et colorimétrie [26]. La masse molaire moyenne en masse de la CMC peut varier entre 40 000 et 700 000 g/mol.

I.3.2.3. Propriétés

A l’état solide, la CMC est une poudre jaunâtre hygroscopique [27]. Dans cet état, le DS a une grande influence sur sa capacité à adsorber des molécules d’eau ; plus il est important plus le nombre de molécules d’eau retenues est grand. La cristallinité des CMC est également liée au DS, elle diminue avec l’augmentation de ce dernier. Ce phénomène peut être dû à la rupture des liaisons hydrogène par la substitution carboxyméthyle sur les groupes hydroxyles de la cellulose impliquant l’élargissement de l’espace entre les chaînes [19,28].

Les CMC sont le plus souvent utilisées en milieu aqueux dans une gamme de concentration comprise entre 1 et 5 %m mais qui peut aller jusqu’à 8 %m [29]. La solubilité de ce polysaccharide dépend majoritairement de son DS et de sa masse molaire moyenne en masse. On distingue trois classes de CMC selon leurs masse molaire moyenne en masse (M_w) : faible (90 000 g/mol), moyenne (250 000 g/mol) et haute viscosité (700 000 g/mol). Plus la M_w est élevée, moins la CMC est soluble. Lorsque le DS est inférieur à 0,4, la NaCMC est insoluble dans l’eau mais peut gonfler. Elle est totalement soluble au-dessus de ce DS limite [19].

La viscosité des solutions de NaCMC évolue avec le pH. En dessous de pH = 2, la CMC précipite, la viscosité augmente ensuite jusqu’à pH = 7 puis reste stable entre 7 et 10. Au-dessus de pH = 10, la viscosité diminue rapidement [30]. L’augmentation de la température fait diminuer la viscosité d’une solution de CMC mais a moins d’influence lorsque le DS est supérieur à 1,2 [31]. La CMC est un polyélectrolyte, la viscosité des solutions diminue donc avec l’ajout d’un sel comme NaCl ou KCl [32].

Les études de contrainte à la déformation ont montré qu’en dessous d’une concentration de 1 %m, la NaCMC possède la propriété d’un fluide newtonien. Au-delà de cette concentration, la NaCMC se comporte comme un fluide non newtonien rhéofluidifiant, ce qui correspond à un phénomène de diminution de la viscosité lors d’une augmentation du taux de cisaillement appliqué (**Figure I-5**) [29,33].

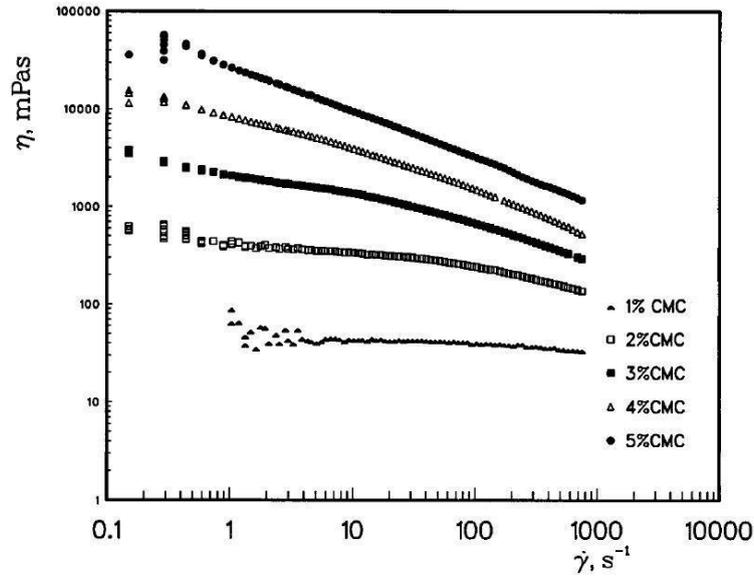


Figure I-5 : Evolution de la viscosité en fonction du taux de cisaillement ($0,1 - 1000 \text{ s}^{-1}$) à 23 °C , de solutions de NaCMC à des concentrations de 1 à 5 %m dans l'eau. La CMC utilisée a une masse molaire moyenne en masse de 250 kg/mol et un DS de 0,7.

La NaCMC possède un comportement viscoélastique représentant la propriété d'un matériau à présenter les deux comportements visqueux et élastiques lorsqu'il est soumis à une contrainte de déformation. Les propriétés visqueuses correspondent à une déformation progressive et irréversible sous la contrainte et celles élastiques représentent la capacité partielle du matériau à revenir à sa forme d'origine. En dessous de 2,5 - 3 %m, la CMC se comporte comme un fluide visqueux. Au-dessus de 3 %m, la NaCMC se comporte comme un solide élastique [19,33,34]. De plus, la NaCMC possède un comportement thixotrope au-dessus de 3 %m. La thixotropie est la propriété d'un matériau rhéofluidifiant à revenir à sa viscosité initiale après un certain temps lorsque la contrainte est supprimée. La thixotropie de la NaCMC s'accélère avec la concentration CMC [19,33].

La CMC peut être utilisée comme agent viscosifiant ou pour apporter d'autres propriétés rhéologiques utiles à certaines applications comme la peinture, les cosmétiques, les encres pour le textile ou le traitement des eaux [19]. Dans le domaine biomédical, la CMC peut être utilisée dans une large gamme de pratiques comme la réparation de tissus biologiques, la cicatrisation de plaies, la délivrance de principes actifs ou le développement de biocapteurs. Il est important de choisir la masse molaire, le DS et la température de travail selon le comportement souhaité de la solution correspondant aux diverses applications [19].

I.3.1. Les nanocristaux de cellulose (NCC)

I.3.1.1. Synthèse et propriétés

L’isolement des parties cristallines des microfibrilles permet l’obtention des nanocristaux de cellulose (NCC). Ils ont été isolés pour la première fois en 1947 par Nickerson et Habrle par dégradation de la cellulose dans une solution d’acide chlorhydrique et de chlorure de fer(III) [35]. L’obtention d’une suspension stable de NCC a été réalisée en 1951 par Rånby via l’introduction de charges négatives en remplaçant l’acide chlorhydrique par l’acide sulfurique [35–37]. Aujourd’hui, l’extraction de NCC se fait par hydrolyse acide des zones amorphes de micro- et microfibrilles, dans des conditions contrôlées de concentrations en acide et en cellulose, de température et de durée de réaction (**Figure I-6**) [38]. L’acide sulfurique est généralement utilisé comme agent hydrolysant car il confère des charges négatives sous la forme d’esters de sulfate en surface des NCC. Ces charges négatives assurent ainsi la stabilité colloïdale dans les milieux aqueux grâce aux interactions électrostatiques répulsives [39]. La concentration en esters de sulfate est généralement comprise entre 100 et 350 mmol.kg⁻¹ de NCC, soit environ 0,3 à 1 charge par AGU en surface [40].

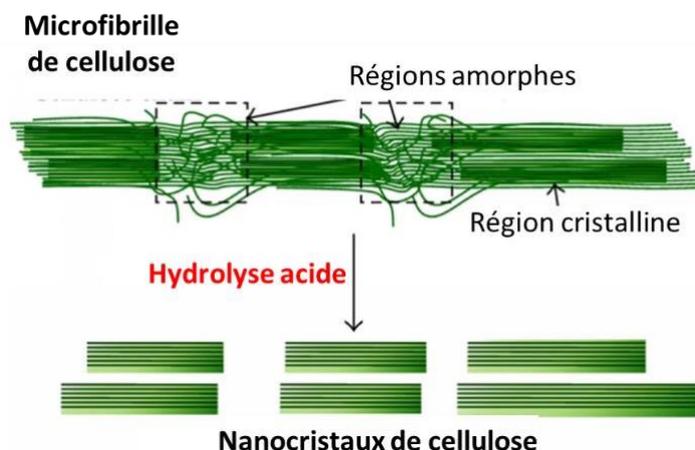


Figure I-6 : Extraction des nanocristaux de cellulose par hydrolyse acide de microfibrilles. Modifiée de [41].

Les NCC sont des bâtonnets cristallins de dimensions nanométriques qui peuvent être mesurées par une combinaison de techniques (microscopie électronique en transmission, microscopie à force atomique, diffusion des rayons X ou des neutrons aux petits angles) (**Figure I-7**). Les dimensions des NCC dépendent en premier lieu de la source de cellulose utilisée mais également des conditions d’hydrolyse et varient de 25 à 3 000 nm pour la longueur et de 3 à 70 nm pour la section [11,42].

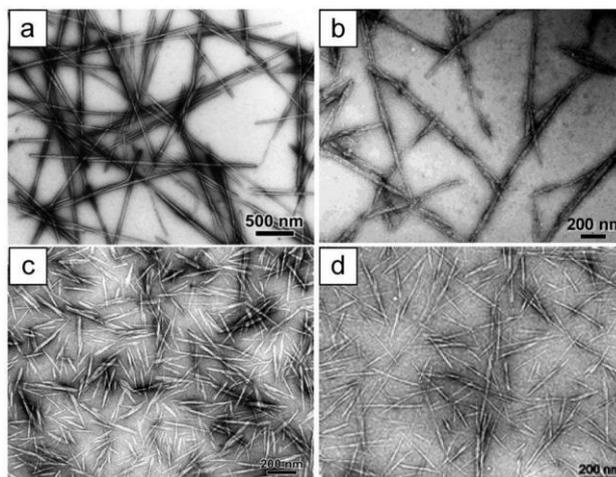


Figure I-7 : Images TEM de nanocristaux de cellulose dérivés de (a) tunicier, (b) bactéries, (c) ramie et (d) sisal [43].

Les propriétés des NCC sont dues à leur structure cristalline unique, leur facteur de forme élevé et modulable et leur grande surface spécifique. La structure cristalline et le taux de cristallinité des NCC sont majoritairement déterminés par diffraction des rayons X (DRX) [44] ou par résonance magnétique nucléaire (RMN) solide du carbone, par la méthode de polarisation croisée et rotation à l’angle magique (CP-MAS) [45,46]. Selon la source, le taux de cristallinité est compris entre 54 % et 100 %. Les NCC sont constitués de cellulose native qui existe sous la forme de l’allomorphe I α (triclinique) ou de l’allomorphe I β (monoclinique) ou d’un mélange des deux [15,47,48]. Les NCC ont une surface spécifique très élevée ce qui les rend très réactifs et capables d’interagir avec leur environnement [49]. Ils sont également très rigides et mécaniquement résistants (module élastique axiale $E_A = 130 - 160$ GPa) [15,50] malgré leur faible densité ($1,6 \text{ kg.m}^{-3}$) [15,51,52].

En raison de leurs propriétés mécaniques, barrières, optiques et de leur biocompatibilité, les NCC ont un large éventail d’applications réelles et potentielles dans de nombreux domaines, notamment dans la biotechnologie, la médecine, l’électronique, l’ingénierie des matériaux et l’environnement. Les NCC peuvent par exemple être utilisés pour fabriquer des matériaux composites plus légers, plus résistants et plus durables [15,52], ainsi que pour développer des technologies de pointe comme des dispositifs médicaux innovants [11,15,37,38,53,54].

I.3.1.2. Modification surfacique des NCC

La présence de groupes hydroxyles en surface des NCC en fait un système réactif qui permet une modification chimique pour les fonctionnaliser et/ou améliorer la compatibilité avec la matrice retenue. La modification chimique des NCC peut être réalisée par différentes

méthodes telles que l'oxydation, l'acylation, l'estérfication, l'amidation, l'étherification, la carbamation, etc. (**Figure I-8**) [50,55–57].

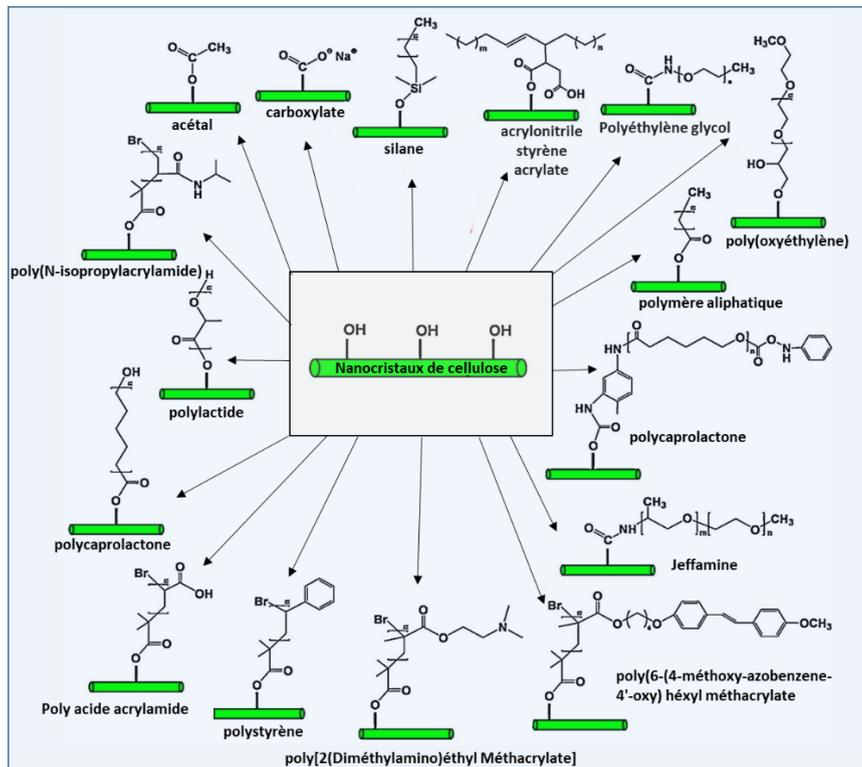


Figure I-8 : Exemples de modifications covalentes en surface des NCC reportées dans la littérature [50].

Un des paramètres essentiels de la modification des NCC est le degré de substitution (DS), c'est-à-dire le nombre moyen de greffons par unité anhydroglucose, dont la détermination est détaillée dans la revue de Samuel Eyley et Wim Thielemans [55]. Le nombre de groupements hydroxyles accessibles en surface des NCC dépend de la taille des cristaux et plus exactement de leur rapport surface/volume qui est régi par la biosynthèse et varie selon l'origine biologique de la cellulose. La liaison β -(1 \rightarrow 4) impose que seule la moitié des groupements hydroxyles sur les chaînes de surface soit accessible. Le degré de substitution surfacique (DS_{surf}) est défini comme le nombre de groupements hydroxyles substitués sur une unité en surface. Sa valeur ne peut donc pas être supérieure à 1,5 car deux unités de surface consécutives exposent un hydroxyle primaire pour l'une et deux hydroxyles secondaires pour l'autre. Le degré de substitution est relié au degré de substitution surfacique par l'**Equation I-1**.

$$DS = N_{\text{surf}} \times DS_{\text{surf}} \quad (\text{Equation I-1})$$

où N_{surf} est le nombre de chaînes en surface des NCC. Certaines techniques de caractérisations comme la RMN ^{13}C CP-MAS, la spectroscopie infrarouge et Raman ou l'analyse élémentaire ont été développées pour déterminer le DS des NCC [58–61].

I.4. HYDROGELS : DES MATÉRIAUX PARTICULIÈREMENT ADAPTÉS AUX APPLICATIONS MÉDICALES

I.4.1. DÉFINITION ET STRUCTURE DES GELS ET DES HYDROGELS

I.4.1.1. Qu’est-ce qu’un gel ?

Dans la science des polymères, un **gel** est un matériau constitué d'un réseau tridimensionnel de polymères gonflé dans un solvant. Ce réseau est issu d'une réticulation chimique ou physique des chaînes polymères (**Figure I-9**) [62]. Dans le cas d'un réseau réticulé chimiquement, les précurseurs polymères contiennent des groupes réactifs et potentiellement un agent réticulant approprié. Après application d'un stimulus (chimique, lumineux, température, etc.), la réaction entre les chaînes polymères est amorcée. Le réseau réticulé physiquement est induit par des interactions physiques réversibles, telles que des liaisons hydrogène ou des interactions de van der Waals. Les polymères comportant des groupes fonctionnels appropriés s'associent grâce à ces interactions pour former un type de réseau (micelle, micro-cristallite, fractal, hélices, etc.) temporaire qui peut se défaire et se reformer en réponse à des stimuli externes. Les gels peuvent aussi être formés à partir d'un mélange de plusieurs polymères [63].

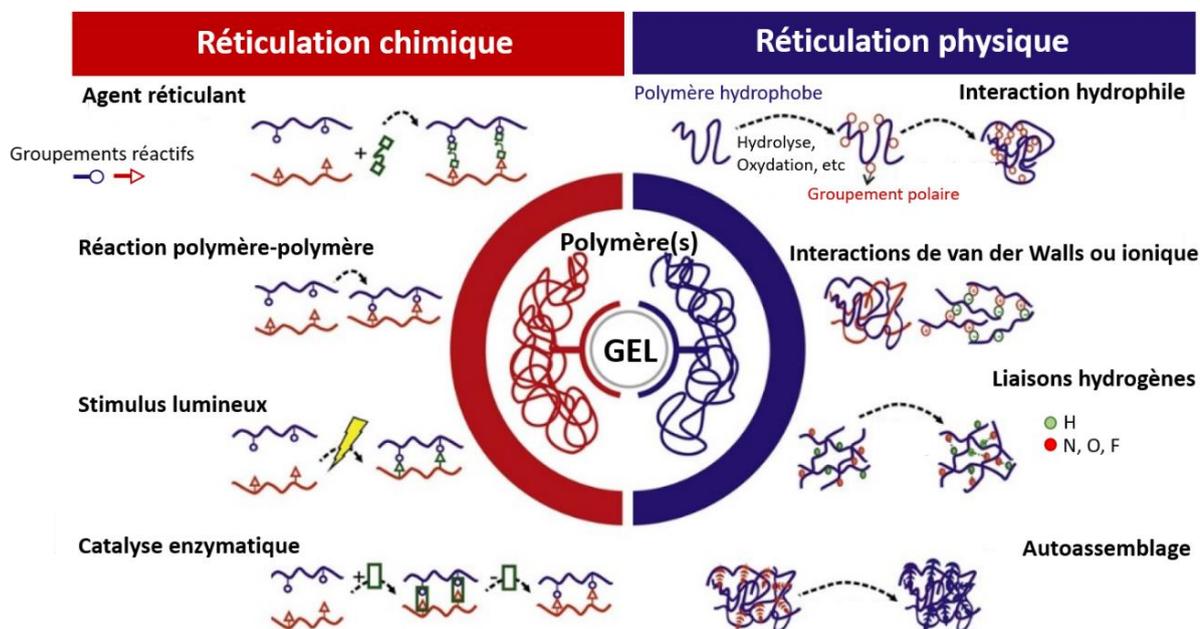


Figure I-9 : Représentation schématique des différents types de réticulation physique et chimique pour la formation de gels. Les polymères et les groupements réactifs représentés en bleu ou en rouge peuvent être les mêmes ou différents. Modifiée de [63].

La caractéristique principale d'un gel est sa capacité à absorber et à retenir une quantité significative de liquide tout en conservant une structure solide cohérente. Lorsque le gel est en contact avec un liquide, les molécules du milieu pénètrent dans les interstices du réseau polymère, provoquant un gonflement du gel. Ce gonflement est réversible, ce qui signifie que le gel peut retrouver sa forme initiale lorsque le liquide est retiré. À l'échelle moléculaire, les paramètres les plus importantes pour définir la structure d'un gel réticulé sont la taille moyenne de la maille ξ , et la masse molaire M_c du polymère entre deux points de réticulation (**Figure I-10**) [64].

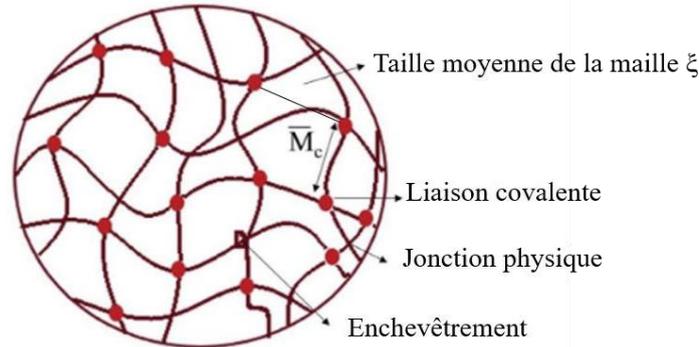


Figure I-10 : Représentation schématique de la structure d'un gel réticulé chimiquement. Modifiée de [64].

Les gels présentent un comportement viscoélastique et sont caractérisés par leurs propriétés rhéologiques particulières définies par les modules élastique (ou de conservation), G' , et visqueux (ou de perte), G'' . La condition pour qu'un matériau soit considéré comme un gel est qu'il présente un comportement élastique prédominant avec $G' > G''$. Lorsque $G'' > G'$, le matériau est un liquide visqueux et non un gel. Selon le type de gel, ces deux modules évoluent différemment en fonction de la fréquence de la déformation appliquée. Les gels réticulés montrent un comportement élastique plus prononcé que les gels enchevêtrés, ce qui leur permet de retrouver leur forme d'origine après déformation plus aisément. De plus, ils présentent une faible dépendance à la fréquence de déformation en raison de leur temps de relaxation infini (**Figure I-11a**). À l'inverse, le comportement des gels enchevêtrés peut varier davantage avec la fréquence de déformation en raison des mouvements aléatoires des chaînes polymères (phénomène de reptation). À faible fréquence de déformation, ils possèdent un comportement liquide visqueux car la déformation est plus rapide que le temps de relaxation des chaînes (**Figure I-11b**). À haute fréquence, ils possèdent un comportement solide élastique. Les gels enchevêtrés présentent un seuil de déformation, nécessitant une certaine contrainte ou fréquence pour commencer à se déformer, généralement à l'intersection de G' et G'' . Dans le cas des gels réticulés physiquement, le comportement rhéologique exact ne peut pas être défini car la présence de réticulations non covalentes complexifie toute description physique des propriétés du réseau. En effet, leur nombre et/ou leur position peut fluctuer avec le temps et la température et la nature même de ces dernières ne peut être clairement connue. En effet,

différentes forces d’interactions sont souvent impliquées, telles que les interactions coulombiennes, dipôle-dipôle, de van der Waals, de transfert de charge, hydrophobes et les liaisons hydrogène [62,65].

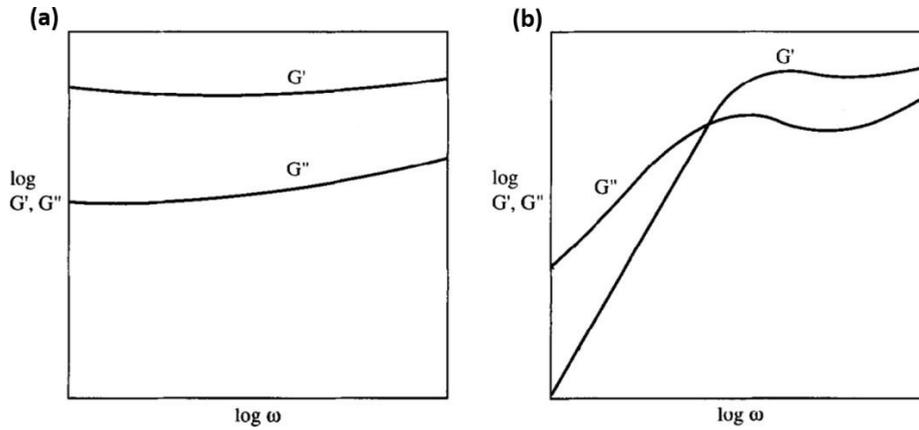


Figure I-11 : Evolutions des modules élastique G' et visqueux G'' attendus en fonction de la fréquence ($\omega = 2\pi f$) pour les gels réticulés de manière covalente (a) et pour les gels enchevêtrés (b) [65].

En somme, par rapport à la réticulation physique, la réticulation chimique des gels, permet un contrôle plus précis des propriétés telles que la viscoélasticité. De plus, le réseau tridimensionnel obtenu est plus stable dans le temps permettant la conservation de sa forme et de ses propriétés. Les gels formés par enchevêtrement ne seront pas discutés dans la suite.

I.4.1.2. Qu’est-ce qu’un hydrogel ?

Les **hydrogels** sont composés de chaînes de polymères réticulées formant un gel dans lequel l’agent gonflant est un liquide aqueux. Les polymères utilisés peuvent être de synthèse ou naturels. Dans le premier cas, on retrouve la polycaprolactone, la poly(vinyl pyrrolidone), l’acide polylactique (PLA), le poly(éthylène glycol) (PEG), etc. Dans le second, on retrouve les polysaccharides (dérivés cellulosiques, le dextrane, l’acide hyaluronique, l’alginate, le chitosane etc.), les polypeptides (collagène, gélatine) et les protéines (lysozymes) [64,66]. Au sein d’un hydrogel, les polymères forment un réseau tridimensionnel capable de retenir un large volume d’eau et gonflent sans dissolution des chaînes du polymère. Les propriétés physiques et chimiques des hydrogels dépendent de leur composition, de leur structure et de leur taux de gonflement. Empiriquement, le gonflement des hydrogels est défini par la théorie de Flory-Rehner reposant sur l’équilibre entre les forces élastiques du réseau et les forces d’attraction entre le polymère et l’eau (**Equation I-2**) [67–69].

$$-\left[\ln(1 - v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi_1 v_{2,s}^2\right] = \frac{v_1}{\bar{v}M_c} \left(1 - \frac{2M_c}{M_w}\right) \left(v_{2,s}^{\frac{1}{3}} - \frac{v_{2,s}}{2}\right) \quad \text{(Equation I-2)}$$

où V_1 est le volume molaire du polymère, $v_{2,s}$ est la fraction volumique du polymère à l'état gonflé, représentant la quantité d'eau maximale que le système peut retenir, et enfin χ_1 le paramètre d'interaction polymère-eau. Selon cette théorie, le gonflement des hydrogels est influencé, d'une part, par la contribution entropique des interactions entre les chaînes de polymères et les molécules d'eau, et, d'autre part, par les forces élastiques présentes dans le réseau polymère. Lorsque l'hydrogel est exposé à une solution aqueuse, les molécules d'eau pénètrent dans le réseau polymère et interagissent avec les chaînes de polymères. La théorie de Flory-Rehner considère que le milieu est une solution idéale. C'est à dire que les interactions entre les molécules de polymère et les molécules d'eau peuvent être représentées par des interactions identiques. De plus, elle suppose que le polymère est un réseau homogène et isotrope et que les interactions entre les unités répétitives du polymère sont uniformes. Enfin, les forces élastiques dans le réseau polymère jouent un rôle important dans la résistance du réseau à la déformation et à l'expansion lors du gonflement. Ces forces élastiques s'opposent à l'expansion du réseau, créant ainsi une résistance mécanique au gonflement de l'hydrogel [68-70].

Ce travail de thèse s'est concentré sur la formation d'hydrogels par réticulation covalente, ce qui permet d'obtenir des hydrogels plus stables dans le temps, notamment dans des conditions physiologiques [70–72]. La réticulation covalente peut être effectuée grâce à un stimulus tel que la lumière, la température ou une catalyse enzymatique qui fait réagir les groupements fonctionnels réactifs du polymère [63,64,73].

I.4.2. APPLICATIONS DES HYDROGELS UTILISÉS DANS LE DOMAINE BIOMÉDICAL

Pour être utilisés dans des applications médicales, les hydrogels se doivent d'être biocompatibles et potentiellement biodégradables en milieu physiologique. La biocompatibilité est l'aptitude des matériaux à remplir une fonction donnée sans avoir d'effets indésirables dans l'environnement biologique (dégradations, interférences...) dans lequel le matériau est utilisé [74]. La biodégradabilité est la décomposition naturelle des matériaux par des organismes vivants [75]. De plus, les hydrogels, grâce à leur forte teneur en eau, présentent des similitudes avec les tissus biologiques et peuvent présenter une affinité avec les cellules environnantes. Ainsi, ils peuvent être utilisés comme dispositifs médicaux pour la réparation des tissus biologiques et la libération de principes actifs, parmi d'autres applications [76]. Cette partie sera consacrée aux applications les plus courantes des hydrogels utilisés dans le domaine biomédical.

1.4.2.1. *Scaffold* pour la réparation de tissus biologiques

Les hydrogels peuvent servir de supports à la culture cellulaire tridimensionnelle pour la réparation de tissus biologiques, tels que le cerveau, les poumons, les os, etc. Ils sont alors appelés « *scaffolds* » (échafaudages en français). Implanté dans la zone de tissu à régénérer, l’hydrogel utilisé comme *scaffold* sert ainsi à l’adhésion, l’organisation et la croissance cellulaire, et permet également d’assurer la diffusion des nutriments tout en conservant l’intégrité mécanique des tissus à reconstruire (**Figure I-12**).

Tout d’abord, l’hydrogel doit jouer le rôle de matrice extracellulaire (MEC). C’est un réseau complexe de macromolécules qui entoure et soutient les cellules dans les tissus vivants. Dans le corps, elle est constituée de protéines, de glycoprotéines et de polysaccharides qui forment une structure tridimensionnelle dans laquelle les cellules peuvent se développer. La MEC a de nombreuses fonctions, telles que la migration, la prolifération, la différenciation et la signalisation cellulaire [77–79]. De plus, les hydrogels utilisés comme échafaudages doivent fournir un soutien mécanique stable pour favoriser la régénération tissulaire. Ils doivent également être capables d’interagir avec les cellules et les facteurs de croissance pour stimuler la régénération des tissus. Pour faciliter l’adhérence et la prolifération cellulaire, ces hydrogels peuvent par exemple être fonctionnalisés avec des motifs bioactifs (ex. tripeptides RGD) [77]. Idéalement, les hydrogels utilisés pour la réparation tissulaire doivent également présenter des cinétiques de biodégradabilité permettant leur décomposition simultanée lors de la croissance cellulaire [79].

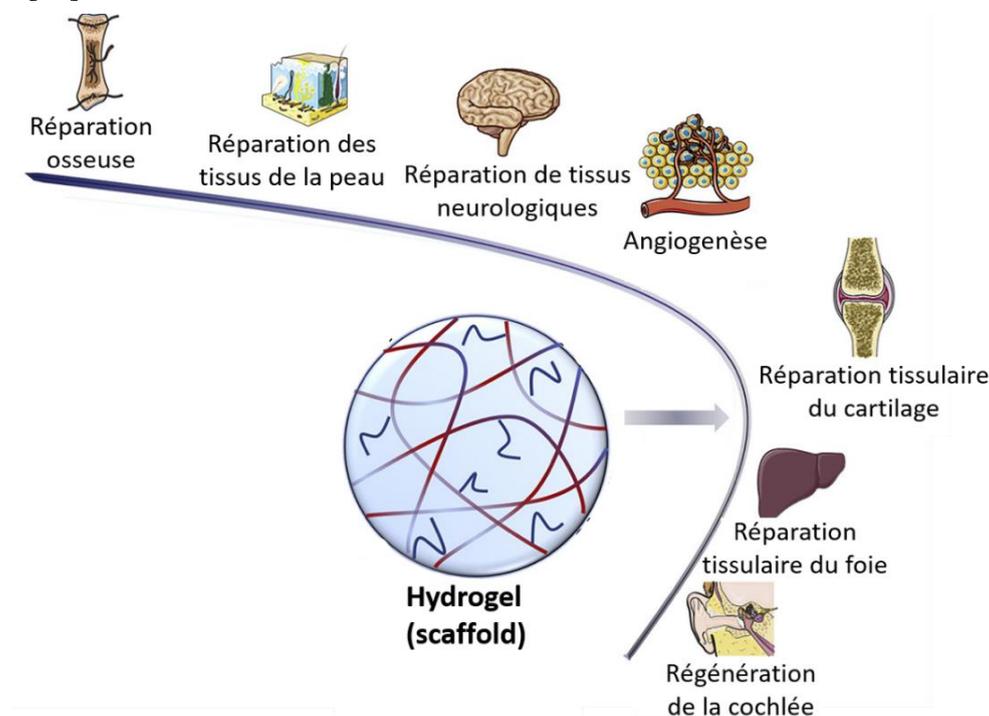


Figure I-12 : Hydrogels pour la réparation de tissus biologiques. Modifiée de [80].

1.4.2.2. Délivrance de principes actifs

La délivrance de principes actifs consiste à libérer de manière contrôlée et ciblée une substance active comme un médicament dans un environnement donné, tel que l'organisme humain. L'objectif souhaité est d'optimiser l'efficacité du principe actif tout en contrôlant la dose délivrée et ainsi réduire les effets secondaires.

Les principes actifs sont souvent encapsulés dans un « vecteur », qui est un support permettant de transporter et de libérer de manière contrôlée les différentes substances. Les vecteurs peuvent prendre différentes formes comme des gélules ou des nanoparticules et se présentent couramment sous la forme d'hydrogels. La porosité de ces derniers permet aux molécules actives d'être encapsulées et stockées, et le gonflement de l'hydrogel permis ou imposé dans une zone définie du corps humain permet leur libération. De plus, certains hydrogels peuvent être sensibles à des stimuli spécifiques tels que le pH, la température, la pression et la présence d'enzymes ou de certaines molécules [81–83]. La stimulation de ces hydrogels permet ainsi de déclencher la libération des principes actifs (**Figure I-13**). Enfin, les hydrogels peuvent être modifiés afin d'optimiser les cinétiques de libération contrôlée en fonction des applications. Cela peut être réalisé en ajustant la taille des pores de l'hydrogel, la densité de noeuds de réticulation et les propriétés de surface de la matrice.

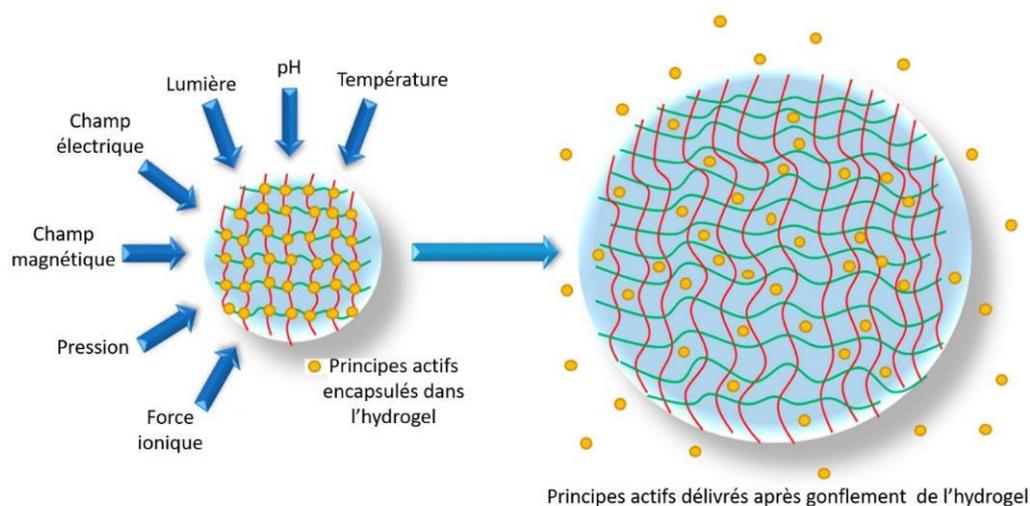


Figure I-13 : Libération de principes actifs encapsulés dans un hydrogel déclenchée par une modification du taux de gonflement, sous l'action d'un stimulus externe. Modifiée de [84].

1.4.2.3. Cicatrisation de plaies

La cicatrisation est le processus naturel par lequel le corps guérit une blessure en réparant les tissus endommagés, notamment la peau. C'est un processus complexe et multi-étapes (inflammation, prolifération des cellules, maturation des tissus), pouvant durer plusieurs

semaines, voire plusieurs mois [85]. Par ailleurs, la cicatrisation peut être accélérée par diverses méthodes, telles que l'utilisation de sutures, de crèmes cicatrisantes, et de plus en plus par l'utilisation d'hydrogels. Ces derniers sont particulièrement intéressants car ils sont capables de maintenir un environnement humide autour de la plaie, favorisant la cicatrisation. Ils peuvent également aider à prévenir les infections en créant une barrière physique contre les bactéries et les autres agents pathogènes [85–87]. La délivrance de principes actifs tels que des agents antimicrobiens (antibiotiques, antiviraux, antifongiques ou les antiparasitaires) initialement encapsulés dans l'hydrogel peut également permettre de lutter contre les infections existantes [85–87]. De plus, d'un point de vue pratique, les hydrogels peuvent être conçus pour être flexibles, doux et non adhésifs, ce qui les rend plus confortables à porter et à retirer, en comparaison avec les pansements conventionnels. A l'inverse, ils peuvent également être conçus pour adhérer à la plaie sans endommager les tissus environnants.

I.4.2.4. Biocapteurs

Les hydrogels jouent un rôle essentiel dans le domaine des biocapteurs en offrant un substrat polyvalent pour la détection et la surveillance de diverses espèces biologiques telles que les protéines, les enzymes et les cellules [88]. Leur capacité d'encapsulation permet de retenir des biomolécules et des cellules au sein de leur structure tridimensionnelle. Les propriétés de perméation des hydrogels peuvent être modulées pour permettre la diffusion sélective des espèces cibles tout en empêchant le passage de molécules indésirables. Ainsi, ils créent des microenvironnements contrôlés qui favorisent une interaction spécifique entre les analytes cibles et les éléments de détection [88,89]. De plus, en fonctionnalisant les hydrogels avec des groupes chimiques spécifiques, il est possible de concevoir des hydrogels sur mesure adaptés à des applications spécifiques de biocapteurs. Les hydrogels fonctionnalisés peuvent également être utilisés pour permettre des réactions enzymatiques spécifiques ou pour la culture de cellules dans des dispositifs de biocapteurs [88].

I.4.3. PROPRIÉTÉS IMPORTANTES DES HYDROGELS DESTINÉS À DES APPLICATIONS BIOMÉDICALES

Pour toutes les applications présentées, les hydrogels formés doivent posséder certaines propriétés essentielles pour remplir leur rôle (taux de gonflement, propriétés mécaniques, porosité, biocompatibilité et cinétiques de biodégradation) [13]. **Ces dernières dépendent de la composition de l'hydrogel, des conditions de réticulation, du taux de réticulation, de la température et des propriétés de la phase aqueuse (pH, salinité, viscosité).** Pour évaluer ces différentes propriétés, plusieurs méthodes de caractérisation sont mises en œuvre.

1.4.3.1. Taux de gonflement

Les hydrogels ont une capacité de gonflement élevée qui leur permet de retenir une grande quantité d'eau ou de liquide biologique. Le taux de gonflement (Q_m) est le rapport entre la masse humide à l'instant t , m_h , et la masse initiale de l'hydrogel sec, m_s , obtenu après lyophilisation (cryogel) ou par séchage à l'étuve ou encore par séchage en milieu CO_2 supercritique (aérogel) (**Equation I-3**).

$$Q_m(t) = \frac{m_h(t)}{m_s} \quad \text{(Equation I-3)}$$

Le gonflement est une propriété importante pour la libération de médicaments, car il permet une libération contrôlée et prolongée de ces derniers [90–93]. Un Q_m élevé est aussi bénéfique pour la cicatrisation de plaies [94,95]. En revanche, pour la réparation de tissus et notamment les tissus osseux, un léger gonflement voire un non-gonflement est préférable [96]. Plusieurs paramètres permettent de moduler la capacité d'absorption en eau [97]. En effet, la composition chimique de l'hydrogel est un des principaux paramètres ayant une influence sur cette propriété [98]. L'augmentation du degré de réticulation de l'hydrogel permet une diminution des capacités de gonflement car il limite le mouvement des chaînes polymères [99]. Le pH du milieu dans lequel l'hydrogel est immergé peut modifier son gonflement en affectant la charge électrique des groupements fonctionnels dans la structure de l'hydrogel [100,101]. De plus, la concentration d'ions dans le milieu environnant peut altérer les interactions électrostatiques au sein de l'hydrogel, affectant ainsi son gonflement [102,103]. Certains hydrogels sont aussi thermoréversibles et gonflent ou se dégonflent en réponse à des changements de température [104]. Enfin, la taille et la forme de l'hydrogel peuvent également jouer un rôle dans son gonflement, car ils déterminent la quantité d'eau qui peut être absorbée.

1.4.3.2. Propriétés viscoélastiques

Les hydrogels présentent l'intérêt d'avoir des propriétés viscoélastiques similaires à celles des tissus biologiques. Cette caractéristique est importante pour la régénération tissulaire car elle permet l'adhérence entre les hydrogels et les tissus environnants et permet la croissance cellulaire [78,92]. Les propriétés viscoélastiques d'un matériau sont obtenues par une mesure rhéologique à une amplitude de cisaillement donnée qui peut être réalisée en oscillation sur une certaine gamme de fréquences (typiquement de 0,1 à 100 Hz).

Selon la nature des tissus à réparer, les hydrogels utilisés peuvent présenter une large gamme de propriétés viscoélastiques. Par exemple, pour des tissus mous, un module élastique en cisaillement très faible est attendu ($G' < 100$ kPa, voire < 1 kPa à 1 Hz dans le cas des constituants des MEC). En revanche, un hydrogel destiné à la réparation osseuse dont les

propriétés mécaniques sont les plus élevées des tissus du corps doit avoir un module élastique proche de 10 GPa (**Figure I-14**) [78].

Les propriétés viscoélastiques des hydrogels peuvent être influencées par divers paramètres. La composition chimique du polymère et les agents de réticulation utilisés jouent un rôle fondamental sur cette propriété car ils déterminent la nature des interactions moléculaires et la densité des liaisons entre les chaînes polymères [63]. La température et le pH du milieu environnant sont également des facteurs importants, car ils peuvent induire des transitions de phase et des changements de charge électrique dans les groupements fonctionnels ionisables, influençant ainsi les propriétés viscoélastiques [63,105].

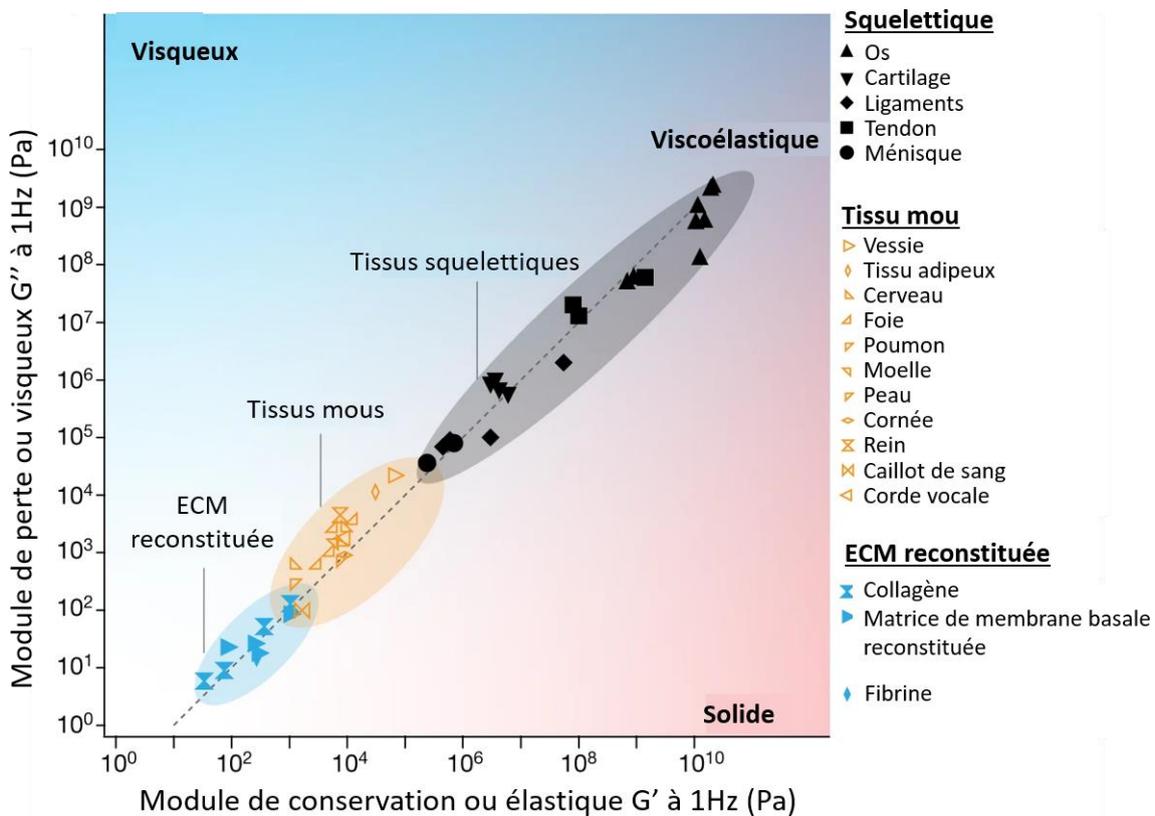


Figure I-14 : Propriétés viscoélastiques des différents tissus biologiques. Modifiée de [78].

1.4.3.3. Rigidité et capacité de déformation

En complément des propriétés viscoélastiques, des valeurs de rigidité et de capacité de déformation données des hydrogels peuvent être nécessaires pour assurer une compatibilité mécanique avec les tissus environnants et minimiser les réactions inflammatoires indésirables. Par exemple, des hydrogels plus rigides peuvent être utilisés pour des applications où une résistance mécanique élevée est requise, comme pour la fabrication de matrices pour la régénération tissulaire [106,107]. Les valeurs importantes de ces propriétés sont le module de compression, E , et le module de résistance à la rupture, σ_f . E représente la constante qui relie la

contrainte au taux de déformation d'un matériau isotrope soumis à une compression isostatique. σ_f est la contrainte de traction mécanique maximale avec laquelle le matériau sous forme d'éprouvette peut être chargé jusqu'à sa rupture. Plus ces valeurs sont élevées, plus l'hydrogel est considéré rigide et résistant [77,108]. Ces valeurs sont très dépendantes de la structure de l'hydrogel et de son taux de gonflement à l'équilibre (**Figure I-15**) [109]. Enfin, il est possible de relier les modules E et G' en fonction du coefficient de Poisson, ν , du matériau (**Equation I-4**) [77].

$$E = 2G'(1 + \nu) \quad \text{(Equation I-4)}$$

La plupart des hydrogels sont supposés avoir un coefficient de Poisson d'environ 0,45 - 0,5, ce qui signifie que $E \approx 3G$.

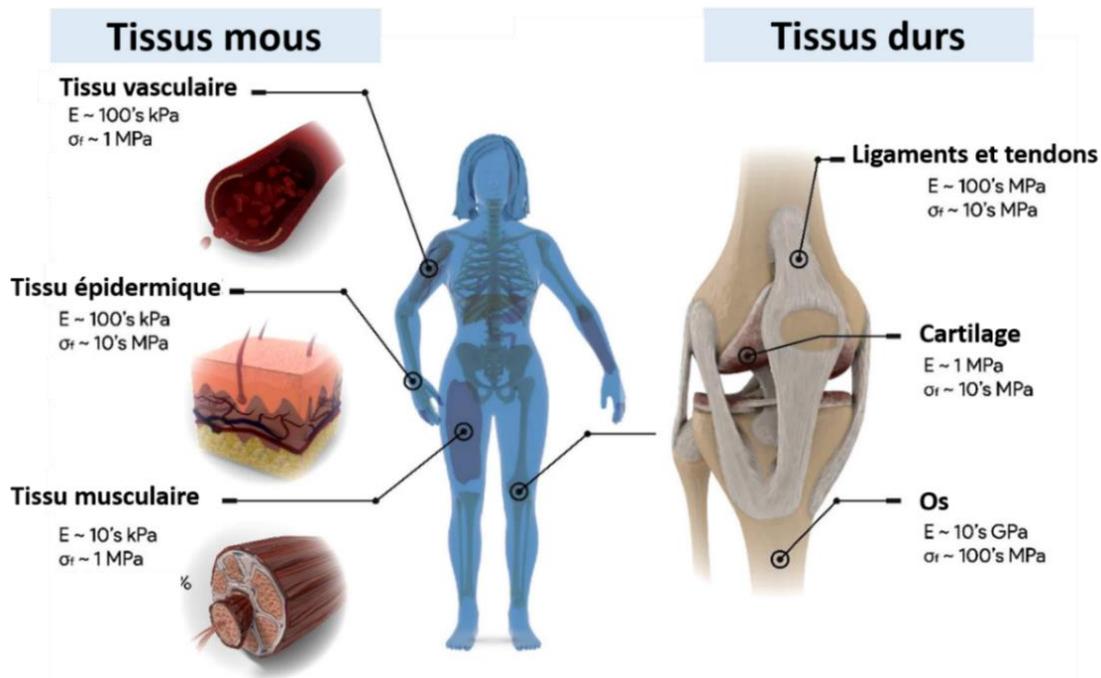


Figure I-15 : Propriétés mécaniques nécessaires des hydrogels pour la réparation de tissus biologiques, caractérisées par la résistance à la rupture (σ_f) et le module de compression (E). Modifiée de [109].

1.4.3.4. Biocompatibilité et biodégradabilité

La **biocompatibilité** des hydrogels est une propriété importante pour les applications médicales, car elle garantit que le matériau ne causera pas de dommage ni de toxicité aux tissus environnants. Elle est évaluée par la mesure des propriétés d'immunocompatibilité, de réponse à l'inflammation, de cicatrisation, d'adhésion et de viabilité cellulaire [74]. Ces deux dernières peuvent être obtenues par des tests de cytotoxicité aigüe ou prolongée [92,110,111]. Les normes d'évaluation biologique des dispositifs médicaux (ISO:10993) ont été publiées par l'Organisation internationale de normalisation (ISO). Seulement, elles ne prennent pas en

compte des facteurs influençant les propriétés de biocompatibilité dépendantes du patient à soigner (âge, sexe, génétique, etc.). Par conséquent, il est difficile d'obtenir une approche standardisée sur la biocompatibilité de dispositifs médicaux [74].

Les hydrogels réticulés par des liaisons covalentes peuvent être conçus pour être stables dans l'environnement biologique pendant une période prolongée, ce qui permet une utilisation à long terme pour les applications médicales. Cependant, dans ces conditions, la **biodégradation** peut-être difficile et longue [111–113]. Elle peut être apportée par la présence de groupements hydrolysables (esters, carbonates, peptidiques, etc.) [114]. De même, celle-ci peut être obtenue par l’apport d’une enzyme ou d’une molécule connue pour la biodégradation du polymère constitutif de l’hydrogel [115,116]. Par exemple, dans le cas de la cellulose, les cellulases permettent la dégradation alors que pour le dextrane, l’enzyme pouvant le dégrader est la dextranase [117,118].

1.4.3.5. Porosité

La porosité des hydrogels est un paramètre essentiel à caractériser pour comprendre les propriétés décrites précédemment (viscoélastique, rigidité, gonflement, etc.) [119]. Les pores sont classifiés en fonction de leur taille [120] ; les **micropores** ont une taille de pore plus petite que 2 nm. Les **mésopores** ont une taille de pore comprise entre 2 et 50 nm. Les **macropores** ont une taille de pore supérieure à 50 nm.

La porosité des hydrogels dépend de la densité de noeuds de réticulation qui elle-même dépend de la quantité d’agent réticulant, de la concentration du polymère, de sa masse molaire et des conditions de réticulation [91,92,121]. Selon leur taille, les pores peuvent affecter la perméabilité des fluides, la diffusion des nutriments et des médicaments, ainsi que la prolifération et la migration des cellules [119,122]. En effet, la porosité peut permettre aux cellules de s’implanter et de se développer à l’intérieur de l’hydrogel, propriétés indispensables pour les applications de régénération tissulaire. De plus, la porosité permet l’accès aux nutriments, à l’oxygène et l’élimination des déchets cellulaires [123,124]. De plus, la taille et la forme des pores influent sur les propriétés mécaniques de l’hydrogel et sa capacité à résister à la déformation ou à la rupture, caractéristiques importantes des *scaffolds* [125]. Enfin, la porosité peut également jouer un rôle sur la libération de médicaments, ce qui peut être crucial pour les applications de délivrance contrôlée [81].

I.4.4. TRANSFORMATION DES HYDROGELS EN CRYOGELS

Afin de garantir la stabilité des hydrogels dans le temps, ces derniers peuvent séchés et être transformés en cryogels par lyophilisation ou en aérogels par séchage en milieu CO₂ supercritique. Le procédé de lyophilisation consiste à congeler l'hydrogel puis à sublimer l'eau dans un environnement à basse température et sous vide. Le séchage par voie CO₂ supercritique présente l'avantage de nécessiter des conditions de pression et de température douces (7,29 MPa et 31,1°C, respectivement) [126].

Les deux techniques présentent différents avantages et inconvénients. La lyophilisation est une méthode simple et efficace pour produire des structures poreuses à partir d'hydrogels. La taille et la morphologie des pores peuvent être ajustées en jouant sur les paramètres de congélation avant la sublimation. Deux types de congélation existent : la congélation homogène (dans toutes les directions de l'espace) et la congélation unidirectionnelle [126]. Selon le type de congélation, l'orientation des chaînes polymères, la croissance des cristaux ainsi que la morphologie des pores sont différents. La lyophilisation homogène décrit une étape de congélation avec une température uniforme dans l'ensemble de l'échantillon produisant des tailles de pores réglables et homogènes. Une congélation unidirectionnelle peut être réalisée afin d'orienter les pores dans une direction spécifique et d'obtenir des structures lamellaires. Au lieu d'introduire l'hydrogel dans un bain liquide à basse température (comme l'azote liquide à -195 °C), la congélation est induite à partir de la base l'hydrogel, puis un gradient de température est établi jusqu'à son sommet. Dans tous les cas, plus la température de congélation est élevée et la vitesse de congélation lente et plus les cristaux formés sont de grande taille, impliquant une taille de pore plus grande. En particulier, l'obtention de parois denses résulte de la croissance de cristaux de glace qui repoussent les chaînes de polymères les unes vers les autres [126,127].

Le grand intérêt du procédé de séchage par CO₂ supercritique réside dans les surfaces spécifiques très élevées obtenues. L'absence de tension superficielle du dioxyde de carbone à l'état supercritique réduit les risques d'agrégation des pores [126]. Ce procédé permet de conserver les dimensions et la forme des pores de l'hydrogel initial. Les aérogels présentent une surface élevée et sont moins fragiles que les cryogels qui peuvent présenter des fissures. Cependant, ce processus nécessite souvent des étapes d'échange de solvants qui prennent du temps et nécessitent des équipements à haute pression coûteux. En effet, l'eau et le CO₂ n'étant pas miscibles, la première étape de la préparation des aérogels consiste à échanger le solvant contre un solvant organique miscible avec le CO₂ supercritique comme l'alcool tert-butyle. Ces inconvénients font de la formation d'aérogels par séchage par CO₂ supercritique une technique plus contraignante que la formation de cryogels par lyophilisation, pouvant résulter en un impact environnemental plus conséquent. **La formation de cryogels a donc été choisie dans la suite de la thèse.**

Les cryogels sont plus stables et robustes que les hydrogels [126,128–130]. Cette amélioration est due au changement de la structure poreuse des cryogels qui leur confère une meilleure résistance à la compression et à la traction. En modifiant les conditions de fabrication des cryogels, il est possible de contrôler la porosité du matériau obtenu. Cela permet de créer des matériaux spongieux pouvant absorber une importante quantité de solvant grâce à leur porosité généreuse, ce qui est intéressant pour le transport de nutriments ou de cellules à travers les *scaffold* ou la délivrance de principes actifs [131–133]. De plus, leur robustesse est également utile pour la régénération des tissus durs [132]. Enfin, ils offrent une plus longue durée de vie et sont moins susceptibles de se dégrader sous l'effet de facteurs environnementaux tels que la température et l'humidité [127,132]. Comme pour les hydrogels, les caractérisations sur les cryogels sont les tests de gonflements, les tests de compression, tests de cytotoxicité, de dégradation et la mesure de la porosité [132,134].

I.5. FABRICATION ADDITIVE D’HYDROGELS PAR PHOTO-RÉTICULATION UV

Comme discuté dans la partie I.4.1 il est préférable de former des hydrogels par réticulation covalente car les propriétés peuvent être variées tout en conservant une certaine résistance et une stabilité nécessaire pour différentes applications. Ils sont souvent obtenus par réaction chimique de type condensation ou addition. Cette méthode peut nécessiter l'utilisation d'un catalyseur ou d'un agent de réticulation pour faciliter la formation de la liaison covalente. Cependant, la polymérisation est parfois longue et il peut être difficile de façonner et de contrôler la structure des hydrogels [135]. Pour s'affranchir de ces contraintes, il est possible de s'orienter vers la réticulation par insolation sous rayonnement ultraviolet (UV), plus rapide et plus efficace [73]. Cette technique offre un haut degré de contrôle sur les propriétés du réseau macromoléculaire formé. En ajustant les conditions de polymérisation telles que la durée d'exposition et l'intensité du rayonnement UV, il est possible de réguler la densité du réseau de polymère, la taille et la forme des pores et d'autres propriétés clés de l'hydrogel [136,137]. Cela permet de concevoir des hydrogels sur mesure pour des applications biomédicales spécifiques [138]. La difficulté majeure lors de la production d'hydrogels dédiés aux applications médicales survient au moment de leur mise en forme, de par la nécessité de s'apparenter au mieux à la complexité de l'environnement et des tissus humains (e.g. morphologie d'une plaie pour la cicatrisation) [94]. Pour cela, la fabrication additive permet de créer des structures complexes en couches successives à partir de modèles numériques. Dans la littérature, cette technique a été appliquée avec succès à la fabrication d'hydrogels pour des applications médicales, telles que la création de *scaffolds* [139,140], la fabrication de systèmes de biocapteurs [141] et la création de modèles de tumeurs pour les tests de médicaments [142]. L'impression 3D d'hydrogels est donc prometteuse pour la fabrication d'hydrogels de géométries complexes pour les applications biomédicales [135,143].

L'impression 3D a été proposée pour la première fois par Hull en 1986 [144]. À l'heure actuelle, diverses méthodes de fabrication additive ont été exploitées pour mettre en forme les hydrogels et peuvent être divisées en deux catégories. La première catégorie comprend les technologies d'impression par extrusion [145] et par jet d'encre [146]. Ces techniques nécessitent des propriétés spécifiques (e.g. viscosité) des encres hydrogels et de disposer d'une tête d'impression contrôlée par un robot. L'autre type d'impression 3D repose sur le contrôle de la trajectoire d'impression par la lumière, et comprend les techniques de **stéréolithographie** (SLA) [147], de **digital light processing** (DLP) [148] et la **polymérisation à deux-photons** (P2P) [149] qui seront donc développées par la suite dans ces travaux de thèse.

I.5.1. PRÉSENTATION DES TECHNIQUES DE TYPE « VAT PHOTOPOLYMERIZATION »

Cette partie sera consacrée aux méthodes SLA, DLP, et P2P, permettant d'obtenir les meilleures résolutions et possédant le même principe général de fabrication (« vat photopolymerization »). Ces méthodes d'impression 3D utilisent en effet une résine liquide photosensible qui réticule lorsqu'elle est exposée à une source de lumière UV. Le processus d'impression 3D commence par la création d'un modèle 3D numérique qui est ensuite importé dans un logiciel de découpage pour être divisé en couches. La machine d'impression 3D est équipée d'un réservoir de résine liquide, également appelé cuve (« vat »), dans laquelle une plateforme est abaissée (ou remontée selon la configuration) pour que la première couche du modèle soit imprimée. Une source de lumière UV est ensuite dirigée vers la cuve, ce qui entraîne la réticulation (partielle) de la première couche de l'objet à imprimer. La plateforme est alors abaissée à nouveau pour permettre l'impression de la couche suivante. Ce processus est répété couche par couche jusqu'à ce que le modèle soit complètement imprimé. Plusieurs avantages sont reconnus à cette technique : une bonne résolution (0,1 – 50 μm), une utilisation possible d'une grande variété de résines et une durée du processus de fabrication réduite avec des couches insolées de l'ordre de la seconde. En revanche, elle peut être coûteuse et la taille de la pièce est limitée par celles de la cuve et du plateau [146,150].

La **SLA** fonctionne par balayage d'un faisceau laser UV sur une couche d'épaisseur prédéfinie de résine liquide (généralement jusqu'à 25 μm minimum), ce qui la réticule et permet de créer des formes complexes, couche par couche (**Figure I-16a**). La résolution horizontale (XY) de la technique est liée au diamètre du faisceau laser au point de réticulation (de 30 à 150 μm). Contrairement à la SLA, le **DLP** fonctionne en projetant un masque UV correspondant à l'image de la couche à imprimer sur une résine liquide (**Figure I-16b**). La précision de la pièce imprimée dépend de la qualité de l'image projetée et donc de la taille des pixels dont le projecteur est composé. La résolution de l'objet peut atteindre 50 μm et l'épaisseur de couche conventionnelle est comprise entre 25 et 50 μm [135,146,150]. L'impression des objets est possible par dessous la cuve (**Figure I-16 a et b**). L'objet se forme sur le dessous du plateau. Il existe aussi l'orientation inverse, où la source UV est positionnée au-dessus de la cuve et la pièce se fabrique sur le plateau. Dans tous les cas, le plateau se déplace dans la cuve de manière à laisser un volume de résine équivalent à l'épaisseur d'une couche à imprimer. La première orientation est préférable, elle permet d'éviter le contact avec l'air qui peut diminuer la vitesse de polymérisation. De plus, elle ne nécessite pas de racle pour homogénéiser le volume de la couche à imprimer, ce qui est le cas lorsque la pièce se forme à l'interface résine/air. Le **P2P** est une technique permettant la création de structures 3D de haute résolution avec une précision submicronique pouvant atteindre 100 nm. Contrairement à la SLA ou à la DLP, la P2P utilise un faisceau laser à faibles impulsions (femtoseconde) et de faible énergie ($\lambda = 500 - 1000 \text{ nm}$) focaliser en un point (voxel) pour amorcer la photo-réticulation de la résine

[142,151]. Cela permet d’obtenir des détails très fins étant donné que cette longueur d’onde n’entraîne pas la polymérisation sur le chemin optique d’un photon (**Figure I-16c**). Au point focal, l’énergie reçue par la résine est équivalente à deux fois celle du faisceau, et correspond donc à une longueur d’onde entre 250 et 500 nm. La réticulation n’ayant lieu qu’au point focal, cela permet de polymériser librement dans l’espace la résine dans la cuve, éliminant la nécessité de déposer le matériau couche par couche [135,146,150].

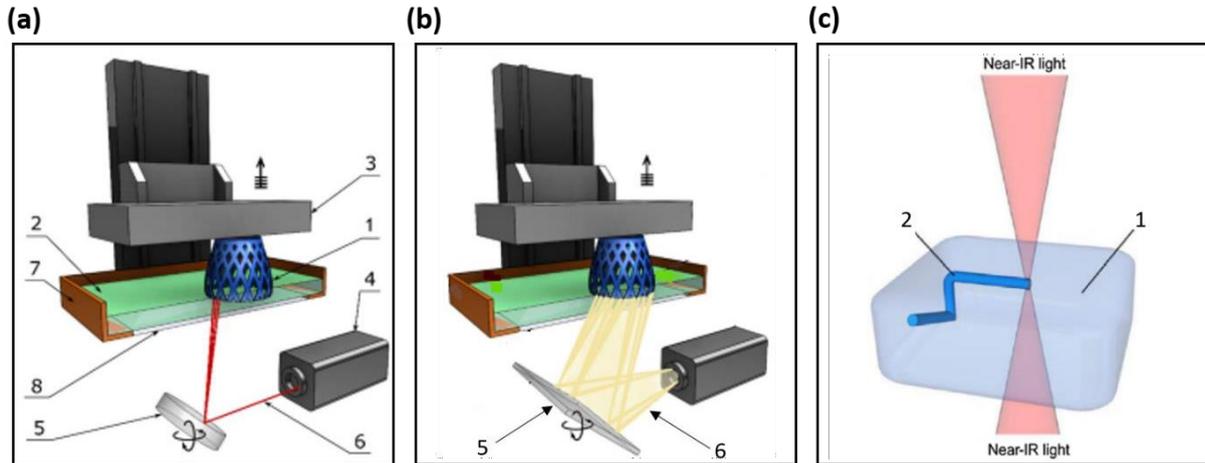


Figure I-16 : Techniques de « vat photopolymerization » : (a) **stéréolithographie (SLA)**, 1 – objet en cours d’impression, 2 - résine photo-réticulable, 3 – plateau de construction, 4 – source UV, 5 – miroir, 6 – faisceau UV, 7 – cuve, 8 – vitre transparente, (b) **Digital light processing (DLP)**, même constitution, 5 – projecteur et 6 – masque UV et (c) **polymérisation à 2 photons (P2P)**, 1 – résine photo-réticulable, 2 – objet en cours d’impression, la réticulation a lieu au point focal des deux faisceaux de longueur d’onde située entre 500 et 1000 nm. Modifiées de [135,150].

Quelle que soit la technologie de fabrication additive considérée, la résolution des pièces finales dépend fortement du contrôle de l’épaisseur des couches imprimées. Celle-ci dépend de la puissance, de la durée d’exposition et de la longueur d’onde du rayonnement UV, mais aussi de la température et de la formulation. En effet, la résine photo-réticulable est composée :

- d’un (ou plusieurs) photo-amorceur(s), qui génère(nt) les espèces actives après absorption de la lumière UV,
- d’un (ou plusieurs) monomère(s) ou polymère(s) contenant des groupes fonctionnels réactifs,
- d’un (ou plusieurs) potentiel(s) solvant(s)/diluant(s) pouvant être réactif(s) permettant de gérer la viscosité de la résine,
- d’un (ou plusieurs) éventuel(s) photo-absorbeur(s) pour diminuer la profondeur de pénétration du faisceau,
- de potentiels additifs.

Dans le cas de l’impression 3D d’hydrogels pour des applications médicales, tous les composants d’une résine photo-réticulable doivent être biocompatibles. Le procédé de photo-réticulation a lieu en milieu aqueux, ce qui impose que les différents éléments chimiques soient solubles ou dispersables dans l’eau.

I.5.2. MÉCANISMES RÉACTIONNELS

I.5.2.1. Polymérisation radicalaire

La polymérisation radicalaire est un processus classique dans la synthèse de polymères. Il s'agit d'une réaction chimique au cours de laquelle des **monomères (M)** insaturés tels que des acrylates, vinyles ou acides méthacryliques réagissent entre eux pour former des chaînes polymères. Ce processus est initié par des **espèces radiaires (R[•])** issues de la dégradation d'un **amorçeur (A)** ayant réagi à un stimulus comme la température ou la lumière, par exemple (**Figure I-17**). Les radicaux libres sont des molécules instables qui ont un électron non apparié et sont très réactifs. Ils sont capables de réagir avec les doubles liaisons des monomères pour générer des radicaux **RM[•]**. Ces radicaux vont ensuite réagir avec d'autres monomères, amorçant ainsi une réaction en chaîne **M_n[•]**. La **propagation** de cette réaction en chaîne se poursuit jusqu'à ce que la plupart des monomères soient consommés ou que la réaction soit arrêtée par des mécanismes de terminaison, tels que la **recombinaison** des radicaux ou la **dismutation**. La recombinaison consiste en deux macro-radicaux qui réagissent pour former une macromolécule stable. La dismutation correspond à une réaction de transfert d'hydrogène entre deux macro-radicaux. Dans ce cas, deux macromolécules stables sont obtenues. Enfin, le transfert de chaîne est un mécanisme qui intervient pendant la réaction en chaîne de polymérisation. Il se produit lorsque le radical actif d'une chaîne polymère réagit avec une autre espèce chimique telle que le solvant, l'amorçeur ou un monomère, transférant ainsi le radical à cette espèce.

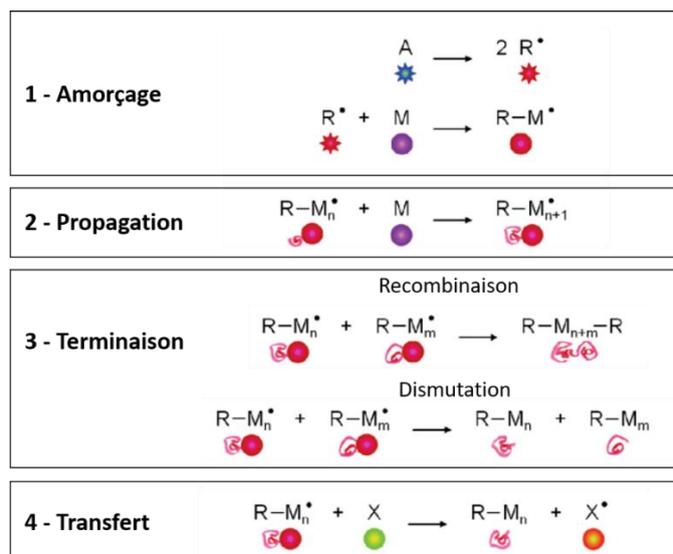


Figure I-17 : Etapes successives d’amorçage par un amorceur (A) (1), de propagation (2) de terminaison (3) et (4) de transfert de chaîne en jeu lors de la polymérisation radicalaire d’un monomère (M). Modifiée de [152].

I.5.2.2. Photo-amorceurs pour la photo-polymérisation radicalaire

Un photo-amorceur est une molécule capable de générer des espèces réactives telles que des radicaux, des cations ou des anions lorsqu’il est exposé à un rayonnement lumineux. La voie radicalaire est la plus utilisée pour la photo-réticulation d’hydrogels à visée biomédicale [153] et sera donc développée dans la suite de ce paragraphe.

Dans ce contexte, les photo-amorceurs utilisés sont ceux générant des radicaux libres. Ces molécules absorbent dans une gamme de longueur d’ondes ($\Delta\lambda$) et présentent un ou plusieurs pics d’absorption caractéristiques. Lorsqu’un photo-amorceur est exposé à une longueur d’onde située dans cette gamme, la dégradation de cette molécule photosensible génère deux radicaux. Il existe deux types de photo-amorceurs (I et II) présentant des mécanismes réactionnels différents (**Figure I-18**). Un photo-amorceur de type I est un composé capable d’initier une réaction de polymérisation par lui-même lorsqu’il est exposé à une source de lumière appropriée. Les photo-amorceurs de type I ont une absorption élevée dans le spectre UV, ce qui les rend efficaces pour initier la photo-polymérisation. Cependant, ils ont également tendance à subir des réactions secondaires indésirables, telles que la dégradation ou la réaction avec d’autres composants présents dans le système. A l’inverse, les photo-amorceurs de type II ne sont pas capables d’initier une réaction de polymérisation par eux-mêmes. Ils nécessitent la présence d’un donneur d’électrons, tel que des composés présentant des groupements amines, pour fonctionner. Lorsque le photo-amorceur de type II est exposé à une source de lumière appropriée, il interagit avec le donneur d’électrons pour générer des espèces radicalaires capables d’initier la polymérisation [154]. Ce mécanisme est généralement plus lent et moins

efficace en raison de la présence de réactions compétitives lors de l'excitation du photo-initiateur, entre la réticulation du polymère, le co-initiateur et l'oxygène atmosphérique. En ce sens, **les photo-amorceurs de type I sont les plus utilisés et sont ceux retenus dans ce projet.**

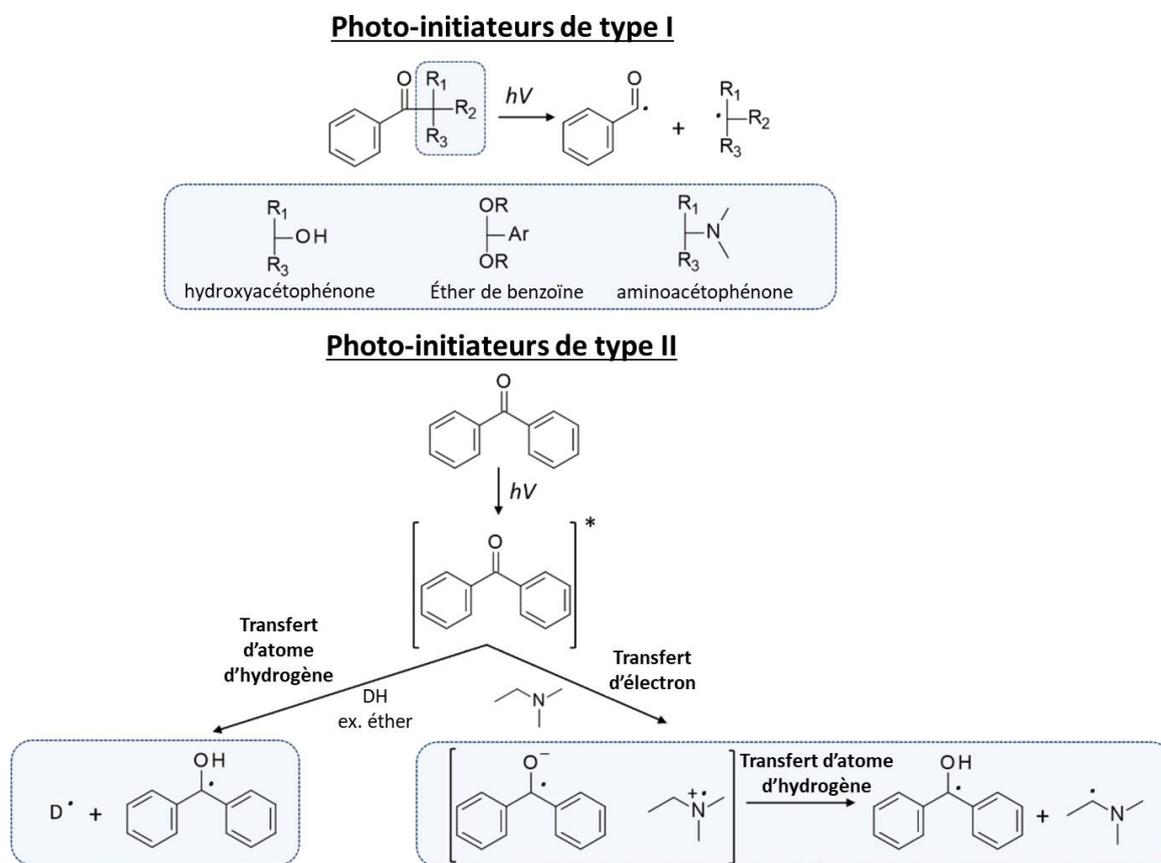


Figure I-18 : Mécanismes de formation de radicaux libres à partir de dérivés d'hydroxyacétophénone, d'aminoacétophénone et d'éther de benzoïne (photo-amorceurs de type I) et de benzophénone (photo-initiateur de type II). Modifiée de [154].

Dans le cas de la photo-réticulation d'hydrogels dédiés aux applications médicales, il est préférable d'utiliser des photo-amorceurs biocompatibles et solubles dans l'eau (**Tableau I-1**). Parmi ces photo-amorceurs, l'Irgacure 2959[®] (I2959) et le phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate de lithium (LAP) sont les plus utilisés. Malgré son prix plus abordable, l'I2959 est moins réactif que le LAP et nécessite donc des durées d'insolation plus importantes [155,156]. Il est aussi moins soluble dans l'eau (0,5 %m). Le photo-amorceur VA-086 est également biocompatible mais est moins utilisé car il libère du diazote lors de sa décomposition [154]. La formation des bulles lors de la photo-réticulation d'un hydrogel est à éviter car celui-ci peut perdre en propriétés mécaniques. Enfin, plus récemment, les formes ionisées de l'oxyde de phenylbis(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine (BAPO-OH) (BAPO-O⁻,Li⁺ et BAPO-O⁻,Na⁺) sont de plus en plus étudiées car elles sont très réactives, biocompatibles et présentent une solubilité plus importante dans l'eau que le LAP

(**Tableau I-1**) [154,157]. Cependant, elles ne sont pas commercialement disponibles et doivent être synthétisées à partir du BAPO [157,158].

Enfin, les photo-amorceurs présentés sont destinés à pour être utilisés dans la gamme de longueur d’onde où ils absorbent. Dans le cas de l’impression P2P, ils peuvent présenter certaines limites. En effet, pour cette technique les photo-amorceurs nécessitent l’absorption simultanée de deux photons de basse énergie pour déclencher la réaction de polymérisation. Les composés avec des structures électroniques appropriées pour l’absorption à deux photons présentent généralement des orbitales π délocalisées et une distribution d’électrons favorisant cet état excité [159]. Les initiateurs qui subissent une décomposition homolytique lors de l’irradiation, tels que le LAP ou le VA-098 présenté précédemment, se caractérisent par une conjugaison relativement localisée du système π entraînant une faible absorption à deux photons et sont donc moins efficaces dans les processus utilisant un laser comme source d’irradiation [154]. L’initiateur le plus utilisé en P2P est l’I2959, mais il convient uniquement à la polymérisation à deux photons autour de 530 nm [154]. Pour cette raison, des initiateurs spécifiquement conçus pour l’absorption à deux photons, avec des structures moléculaires optimisées pour cette propriété ont été développés [154,159]. Certains, comme le P2CK, ont été synthétisés pour être solubles dans l’eau et biocompatibles (**Tableau I-1**) [154,160–162]. Cependant, ces types de photo-amorceurs ne sont toujours pas commercialisés.

En conséquence, l’I2959 et le LAP ont été sélectionnés dans ces travaux de thèse.

Tableau I-1 : Caractéristiques et prix des photo-amorceurs de type I hydrosolubles et biocompatibles [154,157,158,160,163].

Nom	Nom complet	Structure moléculaire	$\lambda_{\text{max}} / \lambda_{\text{utilisation}}$ (nm)	Solubilité dans l'eau (%m)	Prix (€)
I2959	2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyéthoxy)-2-methylpropiophénone		273 / (200 – 365)	0,5	72,30 € les 10 g (Sigma-Aldrich)
LAP	Lithium phényl-2,4,6-triméthylbenzoylphosphinate		375 / (320 – 405)	4,7	675 € les 5 g (Sigma-Aldrich)
BAPO-OLi	Lithium phénylbis(2,4,6-triméthylbenzoyl)phosphine acide		375 / (320 – 420)	5,4	A synthétiser à partir du PABO (103 € les 10 g)
BAPO-ONa	Sodium phénylbis(2,4,6-triméthylbenzoyl)phosphine acide		375 / (320 – 420)	6,0	A synthétiser à partir du PABO (103 € les 10 g)
VA-086	2,2'-azobis[2-méthyl-N-(2-hydroxyéthyl)propionamide]		365 / (365 – 385)	2,4	55 USD les 25 g (Fujifilm)
P2CK	3,3'-((((1E,1'E)-(2-oxocyclopentane-1,3-diylidene)bis(methanylylidene))bis(4,1-phenylene))bis(methylazanediy)) dipropanoate		350 - 600	n.d.	A synthétiser

I.5.2.3. Comparaison des différentes voies de réticulation UV

Les groupements fonctionnels couramment utilisés pour la photo-réticulation d'hydrogels par voie radicalaire sont les **acrylates** et les **méthacrylates**. Les avantages de ces groupements sont leur grande disponibilité commerciale à bas coûts et des conditions relativement douces de réticulation en température et pression [73]. Dans le cas d'hydrogels à visée biomédicale, l'utilisation des méthacrylates offre plusieurs avantages. La présence des groupements méthyl dans les méthacrylates confère une plus grande stabilité au réseau polymère formé et donc à l'hydrogel. Par ailleurs, les méthacrylates libres non polymérisés sont moins réactifs et donc moins toxiques que les acrylates [164]. Dans les deux cas, la polymérisation des monomères (méth)acrylates est amorcée par les radicaux formés par photo-dégradation du photo-amorceur. La polymérisation se passe comme décrit dans la **Figure I-17**.

Une autre méthode de photo-réticulation en milieu aqueux connue et utilisée pour la formation d'hydrogels est la **chimie click thiol-ène** [165]. Cette méthode implique une réaction entre un groupement vinylique (C=C) présent sur des monomères tels que les (méth)acrylates ou les acrylamides, et un composé contenant un ou plusieurs groupements **thiol (-SH)**, pour former une liaison thioéther (C-S-C). Lorsque ces deux réactifs sont en présence des radicaux, ils réagissent rapidement pour former une molécule réactive. Cette réaction est qualifiée de "click" car elle est rapide et sélective. La réactivité de de cette chimie dépend fortement des molécules insaturées utilisées (**Figure I-19**) [166]. La réaction de chimie click thiol-ène de plus en plus étudiée, est la réaction **thiol-norbornène** qui très réactive (**Figure I-19**) [153,166]. De plus, la structure résultant de l'hydrogel après réticulation thiol-norbornène est plus homogène et plus résistante qu'un hydrogel formé par une réaction click thiol-ène classique [167].

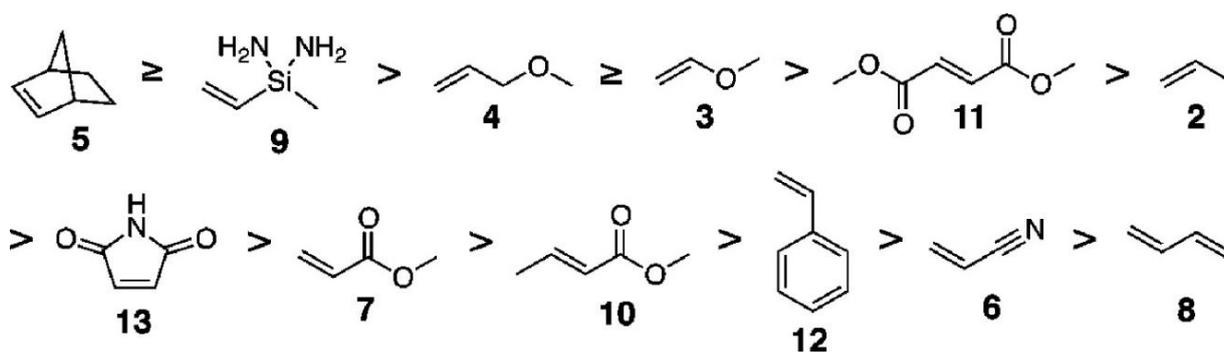


Figure I-19 : Ordre prédit de réactivité des alcènes de différentes molécules (2-13) avec le méthylmercaptan 1 (H_3C-SH) : norbornène (5) \geq silane vinylique (9) > éther allylique (4) \geq éther vinylique (3) > fumarate (11) > propène (2) > maléimide (13) > méthacrylate (7) > crotonate (10) > styrène (12) > acrylonitrile (6) > butadiène (8) [166].

L'utilisation de la chimie click thiol-ène pour la fabrication d'hydrogels en utilisant la photo-polymérisation UV, permet de produire des matériaux avec une résolution spatiale élevée

et une excellente uniformité [153,165]. En effet, la réaction thiol-norbornène combine les avantages de la polymérisation par étapes médiée par les radicaux et d'une réaction click **bio-orthogonale** [168]. La réticulation orthogonale est la capacité de deux réactions chimiques différentes à se produire de manière sélective et simultanée, sans interférence l'une avec l'autre. Dans le contexte de la chimie click thiol-ène, la réticulation orthogonale se réfère à la possibilité de réaliser deux réactions click thiol-ène différentes en même temps sans qu'elles interfèrent l'une avec l'autre [169]. Cela permet de réaliser une réticulation sélective, contrôlée et simultanée des deux réseaux polymères, formant ainsi une structure complexe et bien définie. L'avantage de la réaction click **bio-orthogonale** thiol-ène réside dans sa capacité à se produire de manière spécifique et réactive dans des environnements biologiques, tels que des milieux aqueux et des conditions physiologiques, sans interférer avec d'autres processus biochimiques [165,168,169].

Dans les deux types de polymérisation présentés ((méth)acrylates et thiol-ène), les matériaux constitutifs des hydrogels sont fonctionnalisés avec ces groupements pour permettre la photo-réticulation. Lors de la réaction, les groupements d'intérêt réagissent de manière covalente, formant un réseau polymère tridimensionnel (**Figure I-20**).

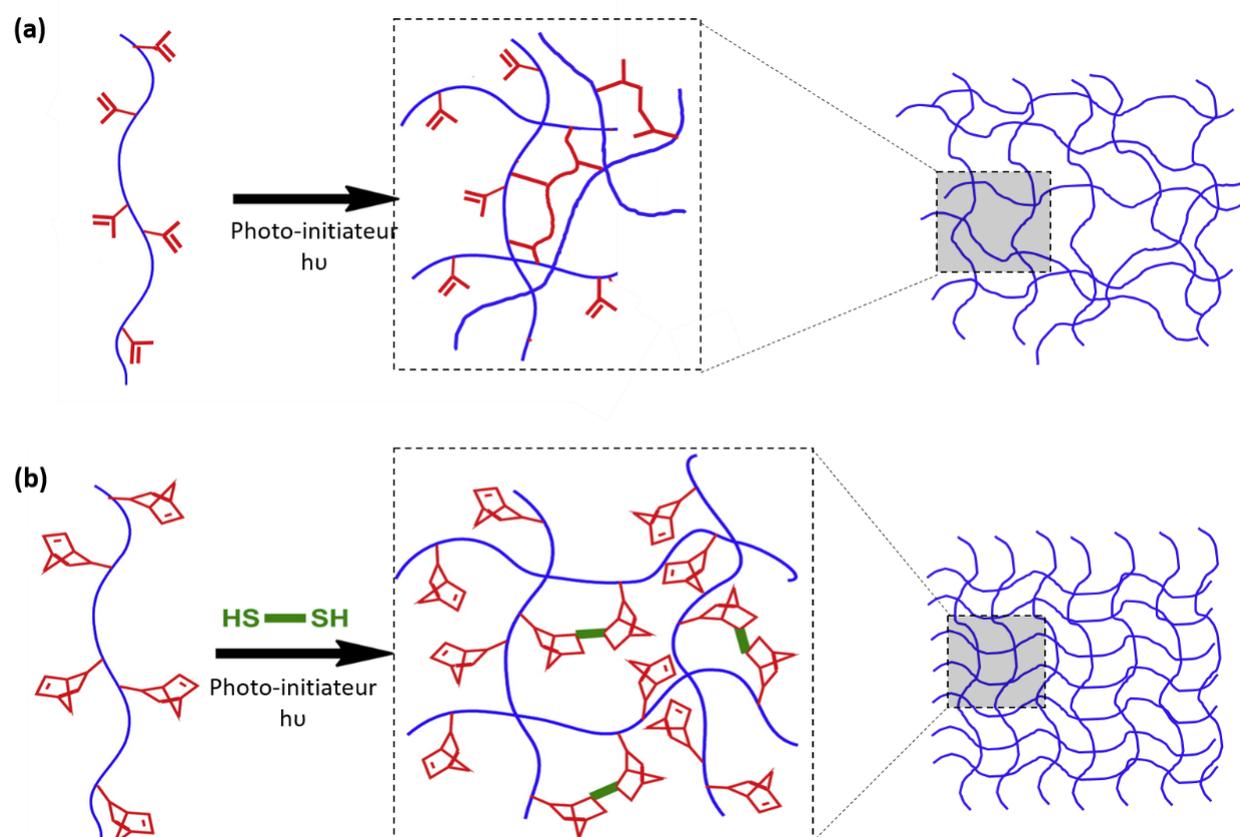


Figure I-20 : Photo-réticulation et structure du réseau d'un polymère (en bleu) (a) fonctionnalisé par des méthacrylates (rouge) ou (b) des norbornènes (rouge), pour la réaction click avec un dithiol (vert). Modifiée de [170].

Les deux méthodes de photo-réticulation présentent chacune leurs avantages et leurs inconvénients qui sont résumés dans le **Tableau I-2**. La voie de réticulation des méthacrylates se révèle plus pratique, car elle nécessite un réactif de moins. De plus, les méthacrylates sont des monomères facilement disponibles et peu onéreux. En revanche, la chimie click avec des thiol-ène offre l’avantage d’une plus grande spécificité de la réaction de couplage avec le choix des thiols, car il faut un composé de plus que pour la polymérisation des méthacrylates.

Généralement, la réticulation thiol-ène est très efficace car elle subit moins l’inhibition des radicaux par l’oxygène que les groupements méthacrylates [169]. Cependant, dans les deux cas, plusieurs paramètres influencent les cinétiques de polymérisation. Plus le monomère est réactif plus la polymérisation est rapide. La vitesse de polymérisation augmente avec l’augmentation de la température. Une augmentation de la concentration en monomères peut accélérer la vitesse de polymérisation, car le nombre de monomères disponibles pour réagir est plus important. Le choix du photo-amorceur peut avoir un impact significatif sur la vitesse de polymérisation en fonction de la longueur d’onde d’initiation notamment. Par exemple, le LAP possède une meilleure absorbance à 385 nm que l’I2959. A cette longueur d’onde d’initiation, la décomposition du LAP sera plus rapide tout comme la polymérisation qui s’en suivra [154]. Enfin, une augmentation de la viscosité peut ralentir la réaction de polymérisation en diminuant la mobilité des molécules [171–173].

Le réseau polymère issu d’une réaction thiol-ène est plus organisé et homogène que celui réalisé avec les méthacrylates (**Figure I-20**) [165]. Cependant, dans les deux cas, les propriétés des hydrogels formés peuvent être modulés. Dans le cas des méthacrylates, il est possible de faire varier le degré de fonctionnalisation et la concentration du biopolymère fonctionnalisé. Dans le cas de la chimie click, il est possible de faire varier la quantité du thiolet son ratio par rapport au norbornène [138].

Le réseau polymère réalisé par les méthacrylates est difficilement dégradé par hydrolyse, la dégradation doit se faire en apportant une enzyme pouvant dégrader le polymère [138]. La dégradation des hydrogels réticulés par chimie-click thiol-ène est moins étudiée mais certains travaux montrent qu’elle est possible par hydrolyse de la liaison covalente entre le polymère et le greffon norbornène par exemple, ce qui témoigne d’une stabilité moins importante dans l’eau que le réseau méthacrylate [165,174]. Les monomères utilisés, comme l’anhydride méthacrylique ou l’anhydride carbique, qui sont les plus employés pour la méthacrylation et le greffage de norbornène, respectivement, sont généralement toxiques [169,175]. La toxicité des thiols dépend de leur structure chimique et ils présentent une odeur nauséabonde. Enfin, la formation d’hydrogels par réticulation thiol-ène est plus coûteuse car le nombre de réactifs est plus important.

Dans chacun des cas, les hydrogels formés ne présentent pas de toxicité [155,156,176]. Les hydrogels obtenus par photo-réticulation à partir des deux chimies peuvent donc être envisagés pour les MEC, la délivrance de principe actif ou la régénération de tissus [138]. De plus, que ce soit en utilisant les vinyles des méthacrylates ou les thiols restants en surface, une fonctionnalisation par une enzyme pour induire une dégradation de l’hydrogel est envisageable [177].

Pour former des hydrogels s’adaptant à la morphologie de tissus, il est possible de les mettre en forme par fabrication additive de type « *vat photopolymerization* » [138]. Cependant, il existe une plus grande complexité pour la mise en œuvre d’hydrogels par ce type d’impression 3D avec les thiol-ène. Ces impressions sont moins développées et moins maîtrisées qu’avec les méthacrylates [169,177]. Dans tous les cas, les propriétés de l’hydrogel imprimés vont dépendre du choix du groupement photosensible, du photo-amorceur, de leur concentration, et des paramètres d’impression.

Au cours de cette thèse, en privilégiant une maîtrise préétablie, l’accent a été mis sur les groupements méthacrylates pour la réticulation, plutôt que sur les liaisons thiol-ène, lors de l’impression 3D de résines liquides photosensibles.

Tableau I-2 : Résumé des avantages et des inconvénients de la formation d’hydrogels par photo-réticulation UV avec des méthacrylates et des thiol-ènes.

Voie de photo-réticulation	Avantages	Inconvénients
Méthacrylate	<ul style="list-style-type: none"> - Coût des réactifs - Peu de réactifs - Conditions douces - Réticulation rapide - Stabilité du réseau 3D - Hydrogels biocompatibles - Fabrication additive facile 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition par l’oxygène - Faible organisation du réseau réticulé - Toxicité des réactifs
Thiol-ène	<ul style="list-style-type: none"> - Réticulation rapide - Sélectivité, bio-orthogonalité - Plusieurs possibilités de couplage - Réseau réticulé organisé - Hydrogels biocompatibles 	<ul style="list-style-type: none"> - Coût des réactifs - Plusieurs réactifs, complexité de formulation - Odeur des réactifs - Toxicité des réactifs - Stabilité du réseau 3D - Fabrication additive difficile

I.5.3. IMPRESSION 3D D’HYDROGELS À PARTIR DE FORMULATIONS DE POLYSACCHARIDES PHOTO-RÉTICULABLES

Les technologies de fabrication additive ont révolutionné la production d’objets 3D dans de nombreux domaines, y compris la santé [178]. En particulier, celles basées sur la photo-réticulation de résines liquides (SLA, DLP, P2P, etc.) permettent de créer des objets sur mesure

pour chaque patient avec une grande précision, ce qui améliore la faisabilité des interventions chirurgicales. Les résines utilisées pour la formation de *scaffolds* solides sont généralement constituées de polymères tels que la polycaprolactone (PCL), l’acide polylactique (PLA) ou l’alcool polyvinylique (PVA) [139,179]. Dans le cas des hydrogels imprimés pour des applications médicales, les polymères les plus étudiés sont la gélatine (matériau protéique) ou le polyéthylène glycol (PEG). Ces polymères sont, dans ce cas, fonctionnalisés par des groupements photosensibles [135,147,148,180,181].

La suite de ce paragraphe sera consacrée aux hydrogels imprimés à partir de formulations pour lesquelles le polymère utilisé est un **polysaccharide** photo-réticulable. Ces polymères naturels sont encore peu utilisés pour ces techniques de fabrication additive [153]. L’acide hyaluronique (AH), le chitosane, le pullulane et la carboxyméthylcellulose (CMC) sont les seuls polysaccharides à avoir été imprimés sous la forme d’un hydrogel par DLP ou P2P pour des applications médicales (**Tableau I-3** ; **Figure I-21** ; **Figure I-22**). Aucun des polysaccharides n’a été imprimé par SLA en étant le seul polymère constitutif. Les formulations et les hydrogels discutés dans ce paragraphe sont ceux ayant été imprimés avec succès. Tous les hydrogels imprimés ont subi un post-traitement sous insolation UV pour terminer la réticulation.

Seuls l’AH et le chitosane ont été imprimés en tant que composant unique par P2P. Kufelt *et al.* ont fonctionnalisé ces deux polysaccharides avec des groupements **méthacrylates** pour la fabrication d’hydrogels destinés à la réparation de tissus biologiques (**Figure I-21a,b**) [182,183]. L’AH utilisé avait un degré de méthacrylation (DM), correspondant au nombre de fonction méthacrylate pour cent unités répétitives, de 60 %. Le chitosane avait un DM de 100 %. Des concentrations de 2,5 %m et de 10 %m ont été choisies pour le chitosane [183] et l’AH [182], respectivement. L’I2959 a été ajouté en tant que photo-amorceur avec une concentration de 1,8 %m par rapport celle du polysaccharide. Ces formulations ont permis d’imprimer des hydrogels avec une résolution dans les directions X et Y comprise entre 5 et 10 μm . Les hydrogels photo-réticulés issus des mêmes formulations possèdent des modules élastiques G' de 8 et 3,5 kPa pour l’AH et le chitosane, respectivement (**Tableau I-3**).

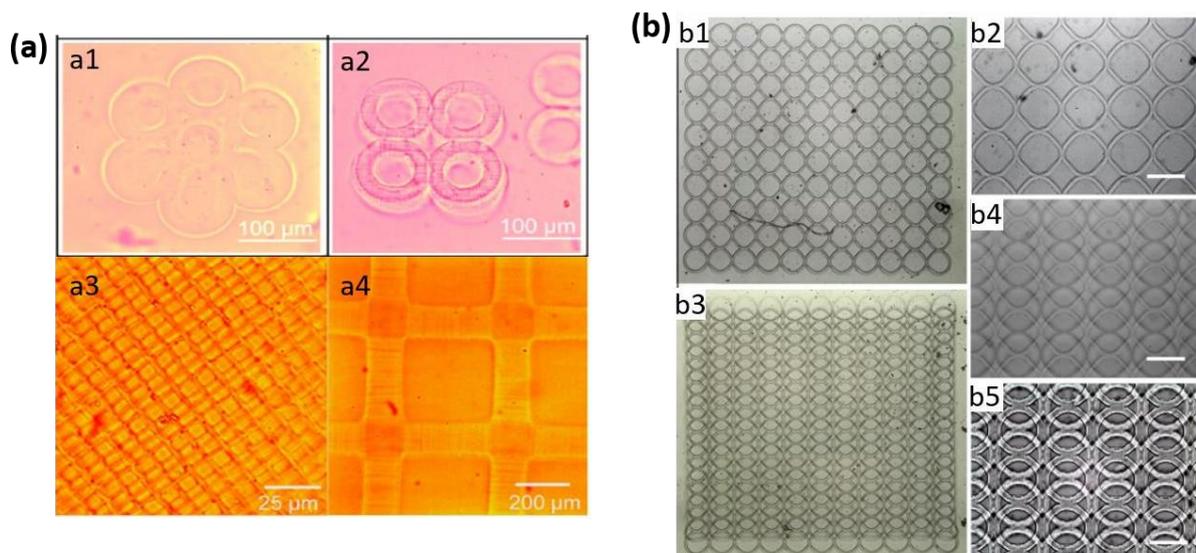


Figure I-21 : Hydrogels imprimés par P2P :

	Formulation	Paramètres d'impression	Forme/dimensions de l'hydrogel	Réf
a	Acide hyaluronique méthacrylate	5 mW 520 nm 300 µm/s	a1 et a2 : anneaux a3 : grilles (pores de 7 et 325 µm)	[182]
b	Chitosane méthacrylate	35 mW 520 nm 3 mm/s	b1 : objet (2x2 mm), épaisseur (10 µm), pores (200 µm) b2 : pareil que b1 (zoom x2) b3 : deux couches empilées de b1 b4 : deux couches empilées de b1 (zoom x2) b5 : épaisseur (30 µm), pores (180 µm) (Barres d'échelle = 200 µm)	[183]

L’AH, le pullulane, le chitosane et la carboxyméthylcellulose ont été imprimés par DLP en tant que seul polymère constitutif du réseau. Tout d’abord, Galarraga *et al.* ont fonctionnalisé l’AH avec un groupement norbornène (NorAH) pour la formation d’hydrogels par chimie click thiol-norbornène en utilisant du dithiothréitol (DTT) comme agent réticulant (**Figure I-22a, Tableau I-3**) [184]. Les hydrogels étaient destinés à servir de *scaffolds* biodégradables. L’AH utilisé avait un degré de norbornénisation (DN) de 40 %. Les formulations aqueuses imprimées par DLP contenaient 5 %m de NorHA, 24 mM de DTT, 17 mM de LAP et 1 mM de tartrazine utilisé comme photo-absorbeur. La résolution des hydrogels de NorAH dans les directions X et Y était de 100 µm en imprimant avec des couches de 100 µm insolées 3 secondes. Cependant, aucun hydrogel n’a été imprimé sans la présence de tartrazine. Ces hydrogels possèdent un module élastique G’ de 8 kPa et un taux de gonflement de 22,5. Il est cependant difficile de comparer les hydrogels d’AH méthacrylate et norbornène car les photo-amorceurs utilisés, les concentrations, ainsi que les DM et DN sont différents.

Feng *et al.* ont aussi synthétisés du pullulane par des norbornènes (NorPul) pour l'impression par DLP d'hydrogels destinés à la réparation de tissus biologiques (**Figure I-22c, Tableau I-3**) [185]. Les formulations étaient composées de 10 %m de NorPul (DN = 30 %), de 0,1 %m de LAP et le DTT a été ajouté en quantité équimolaire par rapport aux groupements norbornènes. Malheureusement, aucune résolution des hydrogels imprimés est mentionnée et il n'est pas possible de la déterminer à partir des photographies des hydrogels car la légende n'est pas indiquée (**Figure I-22c**). Par ailleurs, il est possible de comparer les hydrogels de NorPul et de NorAH car les DN sont assez proches (40 % et 30 %, respectivement). Le LAP a été utilisé en tant que photo-amorceur et le DTT en tant qu'agent réticulant. Les hydrogels de NorPul possèdent un module élastique G' de 0,5 kPa et un taux de gonflement de 130, alors que ceux de NorAH possèdent un module élastique G' de 8 kPa et un taux de gonflement de 22,5. Or, la concentration en NorPul est de 10 %m et celle en NorAH est de 5 %m. Cette différence devrait permettre d'obtenir une meilleure résistance du réseau de NorPul. Ainsi, il semblerait que ces disparités de propriétés soient attribuables aux caractéristiques intrinsèques des polysaccharides et/ou à la quantité de dithiol ajoutée. Enfin, il est possible de définir une corrélation entre la résistance mécanique des matériaux et leur capacité à gonfler. Plus le module élastique G' est élevé, plus le réseau est résistant à la déformation et moins l'hydrogel peut gonfler.

Shen *et al.* ont développé une formulation à base de chitosane méthacrylate (mCHI) pour la formation d'hydrogels pour la réparation de tissus biologiques (**Figure I-22b, Tableau I-3**) [186]. Le degré de méthacrylation du mCHI utilisé était de 34 %. Il a été ajouté à 1,0 %m dans de l'eau contenant 0,20 %m de LAP. La résolution dans les directions X et Y des hydrogels obtenus est de l'ordre de 50 μm , ce qui est deux fois moins que pour les hydrogels obtenus avec le NorAH. Ce résultat peut être expliqué par la résistance mécanique des hydrogels de mCHI qui possèdent un module élastique de 325 kPa, plus élevé que celui des hydrogels de NorAH qui est de 80 kPa. En effet, la résolution des hydrogels imprimés est étroitement liée aux propriétés mécaniques de ces matériaux, car leur capacité à maintenir leur forme et à conserver des détails fins dépend de leur résistance mécanique [187,188]. Cette différence de propriétés mécaniques peut être expliquée par les propriétés intrinsèques des polysaccharides [189] mais aussi par le réseau formé par la réticulation des méthacrylates ou par la réticulation thiol-norbornène.

Enfin, le groupe de recherche du Dr. Chiappone a imprimé des hydrogels de CMC à partir d'une formulation de CMC méthacrylate (mCMC) (**Figure I-22d, Tableau I-3**) [190]. Une mCMC avec un DM de 60 % a été solubilisée à 2 %m dans de l'eau et du LAP a été ajouté avec une concentration de 0,04 %m. Les hydrogels imprimés présentent une mauvaise résolution qui est difficile à déterminer (**Figure I-22d1**). Pour l'améliorer, l'eau a été remplacée par un milieu de culture cellulaire (DNEM) servant de photo-absorbeur. Dans ces conditions, des objets avec une résolution proche de 500 μm en XY ont été obtenus, ce qui est 5 à 10 fois

supérieur à ce qui a été obtenu avec le chitosane (**Figure I-22d2, Tableau I-3**) [184,186]. Les paramètres d'impression jouent également un rôle essentiel dans ce contexte. Par exemple, les hydrogels de mCHI ont été imprimés avec une épaisseur de couche de 150 μm , tandis que ceux de mCMC avaient une épaisseur de 50 μm . Ces différences d'épaisseur peuvent influencer les propriétés mécaniques et, par conséquent, la résolution des hydrogels. Les propriétés mécaniques peuvent aussi avoir un impact significatif sur la résolution. Or, il n'est pas possible d'expliquer cette différence par les propriétés rhéologiques car elles n'ont pas été mesurées sur les hydrogels de mCMC imprimés. Cependant, l'étude de la composition des hydrogels offre des pistes intéressantes. Par exemple, les hydrogels de mCMC sont concentrés à 2 %m en polymère avec un DM de 60 %, soit deux fois plus que les hydrogels de mCHI (1 %m et DM = 34 %). Ces différences se traduisent par un module élastique en compression de 32 kPa pour les hydrogels de mCMC dans l'eau, tandis qu'il est de 325 kPa pour ceux de mCHI. En conséquence, la résolution obtenue est de 50 μm pour les hydrogels de mCHI, tandis qu'elle dépasse 1 mm pour ceux de mCMC. Il apparaît clairement que les propriétés mécaniques des hydrogels jouent un rôle déterminant dans la résolution. Ces propriétés sont étroitement liées à la composition des hydrogels. Cependant, dans cette étude, il n'a pas été possible de comparer l'effet du DM/DN et de la concentration sur la résolution des hydrogels imprimés pour un même polysaccharide. Cette question reste donc un aspect important à explorer dans de futures recherches.

La CMC est moins coûteuse et plus disponible que certains autres polysaccharides plus rares. Cela en fait un choix économique pour certaines applications médicales où la disponibilité et le coût sont des considérations importantes. De plus, sa solubilité dans l'eau et la présence de groupes hydroxyles favorisent la modification chimique en milieu aqueux [19]. En ce sens, il est intéressant d'étudier l'influence du taux de fonctionnalisation et de la concentration en CMC modifiés sur les propriétés des hydrogels et de les corrélérer avec la résolution des hydrogels imprimés.

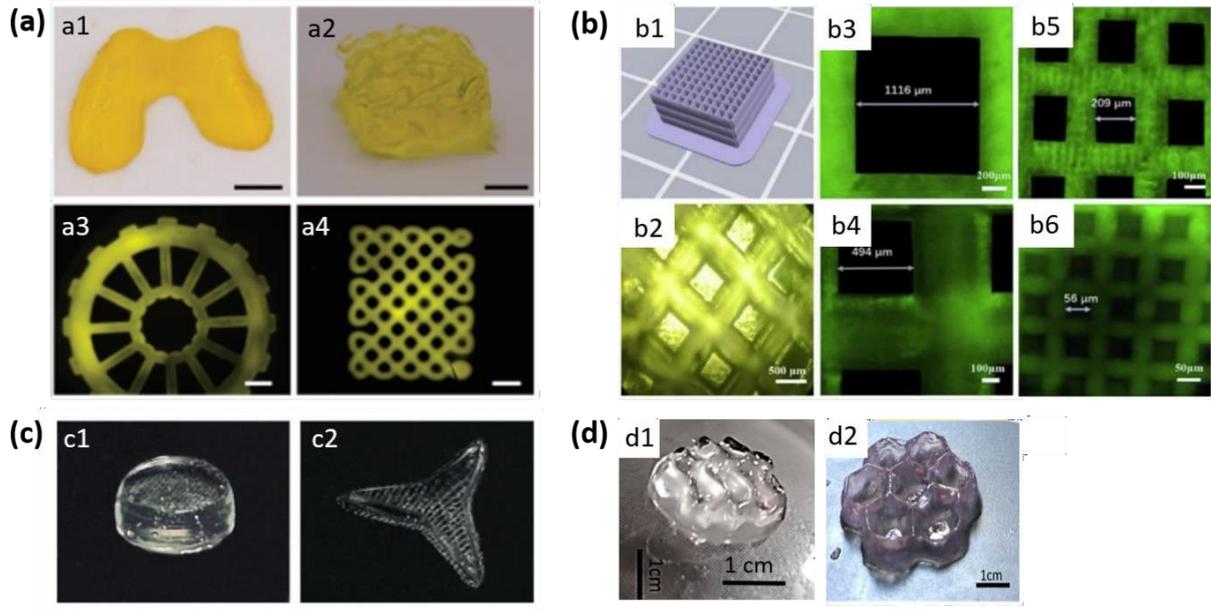


Figure I-22 : Hydrogels imprimés par DLP :

	Formulation	Paramètres d'impression	Forme/dimensions de l'hydrogel	Réf
a	Acide hyaluronique norbornène	15 mW/cm ² 405 nm 100 μm/couche 3 s/couche	a1 : condyle fémoral (échelle 5 mm) a2 : gyroïde (échelle 5 mm) a3 : roue (échelle 2 mm) a4 : motif noué (échelle 2 mm)	[184]
b	Chitosane méthacrylate	15 mW/cm ² 405 nm 150 μm/couche 15 s/couche	b1 : modèle 3D de la structure en treillis (SolidWorks) b2 : treillis (pores 500 μm, parois 500 μm) b3 : treillis (pores 1,1 mm) b4 : treillis (pores 500 μm, parois 400 μm) b5 : treillis (pores 200 μm, parois 150 μm) b6 : treillis (pores 50 μm, parois 50 μm)	[186]
c	Pullulane norbornène	2 mW/cm ² 1 mm/couche 40 s/couche	sans informations supplémentaires fournies	[185]
d	Carboxyméthylcellulose méthacrylate	30 mW/cm ² 385 nm 50 μm/couche	d1 : nid d'abeille d2 : nid d'abeille (avec photo-absorbeur) d3 : cube creux (avec photo-absorbeur)	[190]

Tableau I-3 : Composition et propriétés des hydrogels photo-réticulés correspondant à ceux **imprimés** par SLA, DLP ou P2P, à partir de différents polysaccharides fonctionnalisés. Tous les hydrogels ont subi un post-traitement aux UV pour terminer la réticulation.

Polysaccharide / Groupement photosensible	Concentration (%m) / DM ou DN (%) (a)	Photo-amorceur /concentration (%m)	Imprimante	Résolution estimée (µm)	Q _m (%) (b)	G' (kPa) à 1 Hz (c)	Module de compression (kPa)	Application	Réf
Acide hyaluronique méthacrylate	10 / 60	I2959 / 0,18	P2P	5	2250	8,0	n.d.	Réparation de tissus biologiques	[182]
Acide hyaluronique thiol-norbornène	5 / 40	LAP / 17 mM	DLP	100*	6000	12	80	<i>Scaffold</i> dégradable	[184]
Chitosane méthacrylate	1,0 / 34	LAP / 0,20	DLP	50	160	n.d.	325	Réparation de tissus biologiques	[186]
Chitosane méthacrylate	2,5 / 100	I2959 / 0,18	P2P	10	n.d.	3,5	n.d.	Réparation de tissus biologiques	[183]
Pullulane thiol-norbornène	10 / 30	LAP / 0,10	DLP	n.d.	13 000	0,5	1,2	Réparation de tissus biologiques mous	[185]
Carboxyméthylcellulose méthacrylate	2 / 60	LAP / 0,04	DLP	500*	n.d.	1,0	n.d.	Domaine biomédical	[190]
				> 1000	n.d.	3,3	32		

(a) DM : degré de méthacrylation ; DN : degré de norbornénisation (b) Q_m : Taux de gonflement de l'hydrogel ; (c) Module élastique G' ; * Imprimé avec un photo-absorbeur

I.6. Les hydrogels de CMC

La réticulation covalente de la CMC permet la formation d’un hydrogel stable grâce à la formation de liaisons chimiques entre les chaînes de CMC. Dans ce cadre, plusieurs fonctionnalisations par des méthacrylates [129,155,190], des thiol-norbornènes [175,176,191], des époxydes [192–194] ou de l’acide citrique [195–197] ont été envisagées. Il est aussi possible d’utiliser des réactifs possédant deux fonctions de nature différentes. Par exemple, la tyramine [198] et la dopamine [199] ont été utilisées. D’autres groupes de recherche se sont penchés sur la 1,3-propanediamine [200] et la dihydrazide adipique [201]. Ces groupements réactifs peuvent être greffés sur la CMC par réaction avec ses groupements hydroxyles et carboxyles.

Cette partie sera consacrée à la réticulation covalente de la CMC par photo-réticulation UV pour la formation d’hydrogels par fabrication additive (SLA, DLP, P2P). Pour cela, les deux voies décrites dans la partie I.5.2.3 (méthacrylate, thiol-ène) ont été étudiées.

Le degré de méthacrylation (DM) ou de norbornénisation (DN) de la CMC fonctionnalisée est quantifiable par spectroscopies FT-IR ou RMN liquide du proton ^1H , et correspond au nombre de fonctions greffées par unité répétitive. Il est compris dans la gamme [0 ; 3-DS], si la réaction est réalisée sur les OH, et dans la gamme [0 et DS] si la réaction est réalisée sur les carboxylates (COO^-). Dans la littérature, il est exprimé en % et indique le nombre de groupements greffés pour 100 unités répétitives.

I.6.1. HYDROGELS DE CMC NORBORNÈNE (NORCMC)

Trois publications recensent la réticulation de la CMC par chimie click thiol-norbornène [175,176,191]. Dans un premier temps, le norbornène est greffé sur la CMC, soit par réaction d’un amide du norbornène sur le groupement carboxylate de la CMC (**Figure I-23a**) [175,191], soit par estérification des fonctions hydroxyles par un anhydride carbique (**Figure I-23b**) [175,176]. Dans le premier cas, pour former un intermédiaire amide semi-stable permettant de réagir avec la fonction amine du norbornène, il est essentiel d’incorporer des agents de couplage tels que le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et le N-hydroxysuccinimide (NHS). Cette réaction se déroule à température ambiante en milieu aqueux pendant 12 heures. Quant à la fonctionnalisation de la CMC par l’anhydride carbique (AC), elle est également réalisée en milieu aqueux. Pour déprotoner et rendre réactifs les hydroxyles de la CMC, de la soude est régulièrement ajoutée afin d’ajuster le pH entre 9,0 et 10,5. Cette réaction est moins contraignante que celle avec le 5-norbornène-2-éthylamine (NE) car elle est plus rapide et nécessite moins de réactifs. De plus, les intermédiaires utilisés (NHS,

EDC) peuvent rester greffés sur la CMC. Le degré de norbornénisation (DN) maximal atteint est de 45 % avec l'anhydride carbique [176] et de 20 % avec le 5-norbornène-2-éthylamine [175] (**Tableau I-4**).

Un agent de réticulation dithiol et un photo-amorceur sont ensuite ajoutés pour former le réseau 3D après insolation UV (**Figure I-23c**). Celui-ci est choisi en fonction des propriétés souhaitées de l'hydrogel. Seuls les modules élastiques en compression des hydrogels ont été étudiés en commun dans les trois publications. Ils sont donc répertoriés dans le **Tableau I-4**, pour permettre la comparaison des hydrogels de NorCMC obtenus dans les différentes études. Tous les hydrogels ont été insolés de manière à atteindre le maximum de conversion de réticulation [175,176,191].

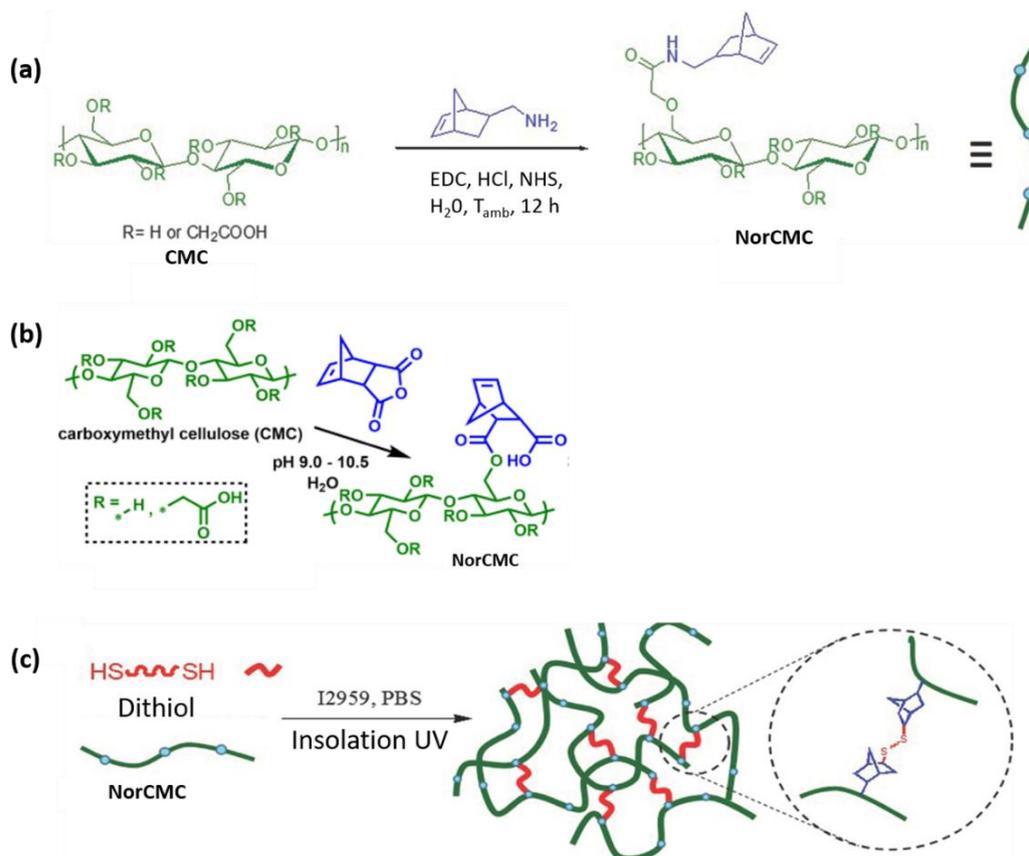


Figure I-23 : (a) Fonctionnalisation de la carboxyméthylcellulose par le 5-norbornène-2-éthylamine (NE) pour former une carboxyméthylcellulose norbornène (NorCMC) (b) Fonctionnalisation de la carboxyméthylcellulose avec l'anhydride carbique (AC) pour former une carboxyméthylcellulose norbornène (NorCMC) (c) Réaction de photo-réticulation de la NorCMC par chimie click thiol-ène [176,191].

Tout d'abord, Thomas *et al.* ont réalisés des formulations de NorCMC fonctionnalisée avec de l'AC en ajoutant du 2,2'-(éthylendioxy)diéthanethiol (DEG) en tant qu'agent réticulant et de l'I2959 en tant que photo-amorceur [176]. La concentration en polymère était de 4 %m et des ratios massiques de 0,25, 0,5 et 1 en dithiol ont été ajoutés par rapport aux

norbornènes. L’augmentation de la quantité d’agent réticulant permet l’augmentation de la résistance mécanique (**Tableau I-4**). En effet, le module élastique en compression de l’hydrogel est de 8 kPa avec un ratio de 0,25, alors qu’il est de 75 kPa avec un ratio de 0,5. Par ailleurs, en continuant d’augmenter le ratio jusqu’à 1, le module est de 80 kPa, indiquant qu’un maximum de résistance en compression est atteint. Lors de la réticulation les dithiols peuvent être piégés dans le réseau. En conséquence, lorsque davantage de thiols sont ajoutés au mélange réactionnel, la vitesse de réaction augmente et ce point d’immobilisation des chaînes est atteint plus tôt [176].

De même, Ji *et al.* ont fonctionnalisé la CMC avec de l’AC et ont développé des formulations contenant une concentration en NorCMC de 15 %v et ont ajoutés du DTT avec des ratios de 0,25 et 0,5 par rapport aux norbornènes (**Tableau I-4**) [175]. Le LAP a été utilisé comme photo-amorceur. Comme précédemment, l’augmentation de la quantité en dithiol permet d’améliorer la résistance en compression des hydrogels. Ainsi, avec un ratio de 0,25 en NorCMC/DTT, le module élastique en compression est de 46 kPa alors qu’il est de 316 kPa pour un ratio de 0,5. Il est cependant difficile de comparer les études utilisant la NorCMC fonctionnalisée avec de l’AC car le dithiol et le photo-amorceur utilisés sont différents.

Dans la même publication, Ji *et al.* ont fonctionnalisé la CMC par le NE. Des formulations contenant 10 %v de NorCMC et des ratios en DTT de 0,25 et 0,5 par rapport aux norbornènes ont été ajoutés (**Tableau I-4**) [175]. Le LAP a été utilisé comme photo-amorceur. L’augmentation de la quantité en dithiol permet d’améliorer la résistance en compression des hydrogels. Ainsi, avec un ratio de 0,25 en NorCMC/DTT, le module élastique en compression des hydrogels est de 40 kPa alors qu’il est de 134 kPa pour un ratio de 0,5. A ce ratio, la résistance en compression est plus faible que celle des hydrogels de NorCMC fonctionnalisés avec de l’AC. Cette disparité n’a pas été clairement expliquée par les auteurs. Cependant, il est possible que la concentration plus élevée de polymère soit un facteur déterminant.

Enfin, Dadoo *et al.* ont aussi fonctionnalisé la CMC par le NE et ont développé des formulations contenant 4 %m de NorCMC. Des ratios en DTT de 0,25, 0,5, 1 et 2 par rapport aux norbornènes ont été ajoutés (**Tableau I-4**) [191]. L’I2959 a été utilisé comme photo-initiateur. Comme observé dans les deux autres publications, le module élastique en compression des hydrogels augmente avec la quantité de dithiol. Cependant, lorsque celle-ci devient supérieure à celle des norbornènes, le module diminue. En effet, à un ratio de 1 le module élastique en compression est de 100 kPa alors qu’il est de 30 kPa à un ratio 2, équivalent au module mesuré avec un ratio de 0,25 (40 kPa). Ce phénomène peut être expliqué par le nombre élevé de thiols, qui saturent les groupes norbornène disponibles sans former de liaisons croisées efficaces. Enfin, les auteurs ont démontré que le module élastique en compression diminue avec la longueur du dithiol. En effet, plus ce dernier est long, plus le module élastique est faible, car le réseau devient plus détendu.

Tableau I-4 : Formulations et propriétés des hydrogels de NorCMC.

NorCMC		Formulation				Propriété principale	Réf
Réactif	DN (%)	NorCMC	Dithiol	Ratio dithiol/NorCMC	Photo-amorceur /concentration (m%)	Module élastique en compression (kPa)	
AC	30	4 (%m)	DEG	1/4	I2959 / 0,5	8	[176]
				1/2		75	
				1/1		80	
		15 (%v)	DTT	1/4	LAP / 0,05	46	[175]
				1/2		316	
NE	20	10 (%v)	DTT	1/4	LAP / 0,05	40	[175]
				1/2		134	
	18	4 (%m)	DTT	1/4	I2959 / 0,05	13	[191]
				1/2		40	
				1/1		100	
				2/1		30	

AC : anhydride carbique ; NE : 5-norbornène-2-éthylamine ; DN : degré de norbornénisation ; DTT : dithiothreitol ; DEG : 2,2'-(éthylenedioxy)diéthanethiol ; λ : longueur d’onde

La réaction de photo-réticulation la plus étudiée est celle basée sur la photopolymérisation des groupements méthacrylates ou acrylates [190,202–205]. Elle nécessite au préalable la présence d’un groupement photosensible sur la CMC.

Les réactions de photo-réticulation utilisant des groupements méthacrylates ou basées sur une chimie click thiol-norbonène permettent de travailler à température ambiante et en solution aqueuse pour former des hydrogels de CMC. **Dans la suite de l’étude, la formation d’hydrogels de CMC par réticulation de méthacrylates a été choisie car elle est moins coûteuse, plus simple et que les hydrogels obtenus sont plus stables. Enfin, c’est la méthode la plus courante pour la mise en forme d’hydrogels par fabrication additive.**

I.6.2. MÉTHACRYLATION DE LA CMC

Différents réactifs méthacrylates ont été étudiés dans la littérature pour la fonctionnalisation de la CMC. Ces réactifs possèdent une fonction qui peut réagir avec les hydroxyles ou les carboxylates de la CMC pour former la carboxyméthylcellulose méthacrylate (mCMC). Dans tous les cas, le produit est purifié par dialyse dans l’eau et récupéré par lyophilisation. La dialyse est un processus doux qui n’implique pas de changement brutal de pH ou de température. Cela est important pour préserver l’intégrité et la fonction des polysaccharides modifiés, qui peuvent être sensibles à certaines conditions. La dialyse permet d’éliminer toutes les impuretés dont la taille est inférieure aux pores de la membrane utilisée,

comme les sous-produits de réaction ou certains sels présents auxquels les polysaccharides modifiés peuvent être sensibles [206].

La méthacrylation de carboxylates de la CMC a été réalisée avec le 2-aminoéthyl méthacrylate (**Figure I-24**) [205]. Cette réaction se fait dans une solution tampon de bicarbonate ou d'acide 2-éthanosulfonique (MES) à $\text{pH} > 5$ pour conserver la forme carboxylates ($\text{pK}_a < 5$). L'EDC et le NHS sont ajoutés pour former un intermédiaire amide semi-stable pouvant réagir avec la fonction amine du 2-aminoéthyl méthacrylate. La réaction se poursuit pendant 24 h. L'inconvénient de cette méthode est que le nombre de groupements carboxylates est moins important que celui des hydroxyles, ce qui diminue la valeur du DM maximal qu'il est possible d'atteindre. Il est aussi possible qu'une certaine quantité des réactifs intermédiaires (EDC, NHS) puissent rester greffés ou adsorbés sur la CMC.

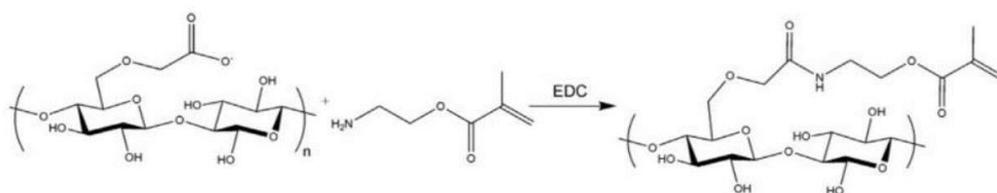


Figure I-24 : Méthacrylation de la CMC avec le 2-aminoéthyl méthacrylate [205].

D'autres groupes de recherche se sont intéressés à la réaction entre la CMC et le méthacrylate de glycidyle (**Figure I-25**) [207–209]. Dans ce cas, la réaction se fait entre un groupement époxy et les groupements hydroxyles de la CMC. La CMC est solubilisée dans l'eau et le réactif est ajouté pour un volume comptant pour 1/5^{ème} du milieu réactionnel. De la soude est aussi ajoutée pour maintenir un pH permettant de déprotoner les hydroxyles de la CMC. Ces derniers réagissent ensuite avec l'époxy. La réaction est maintenue à 50 °C pendant 72 h [207]. Cette réaction est longue et plusieurs réactions sont en compétition, telles que l'addition de l'alcoolate sur le carbonyle du méthacrylate, l'addition de l'alcoolate sur le CH₂ ou sur le CH du groupe époxy, et l'hydrolyse du réactif par réaction de la soude sur le carbonyle. La CMC fonctionnalisée obtenue possède ainsi des groupements méthacrylates hétérogènes [209]. La caractérisation par RMN est donc difficile et aucun DM n'a été reporté.

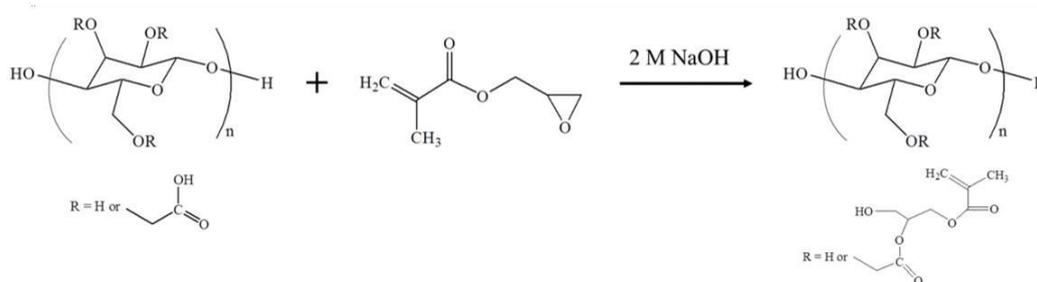


Figure I-25 : Méthacrylation de la CMC avec le méthacrylate de glycidyle [207].

Depuis 2010, la réaction de méthacrylation la plus étudiée dans la littérature, et la plus simple, est réalisée entre la CMC et l’anhydride méthacrylique (AM) (**Figure I-26**) [129,155,156,190,202,204,210–214].

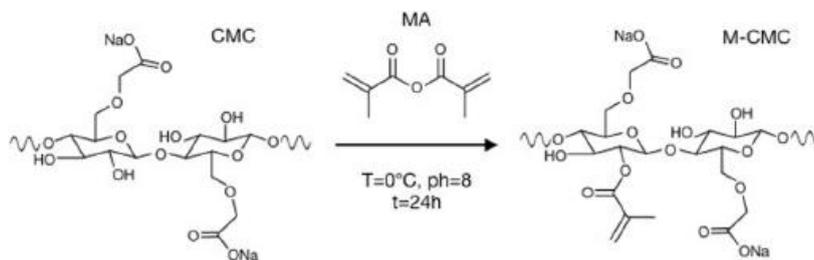


Figure I-26 : Méthacrylation de la CMC avec l’anhydride méthacrylique [190].

De manière générale, la CMC est solubilisée dans l’eau et l’anhydride méthacrylique est ajouté. Le pH est ajusté au cours du temps autour de 8 avec de la soude pour déprotoner les groupements hydroxyles de la CMC, qui réagissent avec un des carbonyles de l’AM. De l’acide méthacrylique est alors libéré. L’hydrolyse de l’AM ainsi que la méthacrylation de la CMC sont deux réactions en compétition. Le DM de la mCMC obtenue dépend des différents paramètres de synthèse (**Tableau I-5**).

Tableau I-5 : Conditions expérimentales de la méthacrylation de la CMC par l’anhydride méthacrylique dans l’eau et degré de méthacrylation (DM) des mCMC obtenues pour des synthèses de 100 g.

M _w (kDa)	DS	mCMC (%m)*	Volume d’anhydride méthacrylique (VAM ; mL)*	Température de réaction (° C)	Durée de réaction (h)	Degré de méthacrylation (DM ; %)	Réf
90	0,7	2	4	0	24	11,8	[211]
90	0,7	1	3,3	n.d.	5,5	21	[129]
90	0,6 – 0,9	1	40	4	24	10, 15 et 25	[212]
90	0,6 - 0,9	1	20	4	24	3,29	[155]
250	0,6 - 0,9	1	20	4	24	2,87	[155]
250	0,6 – 0,9	1	20	4	24	8,15	[156]
250	0,6 – 0,9	1	20	4	24	8,06	[204]
250	0,6 – 0,9	2	4	4	24	60	[190]
250	0,6 – 0,9	2	4	4	24	60	[214]
n.d.	n.d.	1	20	4	24	69	[202]
n.d.	0,7	2	5	4	48	n.d.	[210]

DS : degré de substitution ; Mw : masse molaire moyenne en masse ; * pour un milieu de synthèse de 100 g (eau + mCMC)

L’influence des paramètres du protocole expérimental sur la valeur du DM reste encore inconnue. Tout d’abord, tous les auteurs ont réalisé la réaction à basse température (0 ou 4 °C). La réaction est généralement conduite pendant 24 h, mises à part deux synthèses réalisées durant 5,5 h [129] et 48 h [210]. Aucune des autres conditions n’étant similaires, il n’est pas possible de comparer l’influence de la durée de réaction sur le DM.

Seulement deux masses molaires de CMC ont été étudiées à deux concentrations différentes dans l’eau (1 et 2 %m). Reza *et al.* ont fonctionnalisés deux CMC de masses molaires moyennes en masse différentes (90 kDa et 250 kDa) et ont obtenus deux DM très proches de 3,29 % et 2,87 %, respectivement [155]. Cette différence n’étant pas significative, aucune conclusion ne peut être tirée sur l’influence de la masse molaire sur le DM.

Pour un même volume d’eau, le volume ajouté en AM est le paramètre expérimental le plus variable (de 3,3 à 40 mL). Cependant, il n’y a pas de corrélation entre cette valeur et le DM en analysant les données reportées. Par exemple, pour une synthèse à partir d’une CMC de 90 kDa à 1 %m dans l’eau, un DM de 3,29 % a été atteint avec 20 mL d’AM, alors qu’un DM de 21 % a été atteint pour un volume d’AM de 3,3 mL [122,194]. Enfin, un groupe de recherche a réussi à obtenir trois DM différents sans modification du protocole ni justification apportée [212].

Il est difficile de déterminer l’influence du DS de la CMC sur le DM car celui-ci est généralement compris entre 0,6 et 0,9 et n’est pas vérifié expérimentalement précisément. Il est cependant important de noter qu’une incertitude sur la valeur du DS entraîne systématiquement une incertitude sur la valeur du DM calculée par spectroscopie RMN ^1H . En effet, le massif des protons de la CMC compris entre 2,7 et 5,0 ppm sur le spectre RMN ^1H correspond aux protons du CH_2 du carboxylate (**Figure I-27**) [190]. Le DM correspond à la valeur de l’intégrale des protons du CH_2 de l’alcène du méthacrylate (6,1 et 5,7 ppm) par rapport à celle de la CMC. Par exemple, une CMC avec un DS de 0,7 intègre pour 8,4 protons entre 2,7 et 5,0 ppm (H des OH déblindés). Si la valeur du DS n’est pas connue précisément alors la valeur de référence de l’intégrale de la CMC est faussée et le DM résultant est surévalué ou sous-évalué. Enfin, l’évolution de la valeur du DM peut finalement s’expliquer par une méthode d’intégration et de traitement du spectre différents.

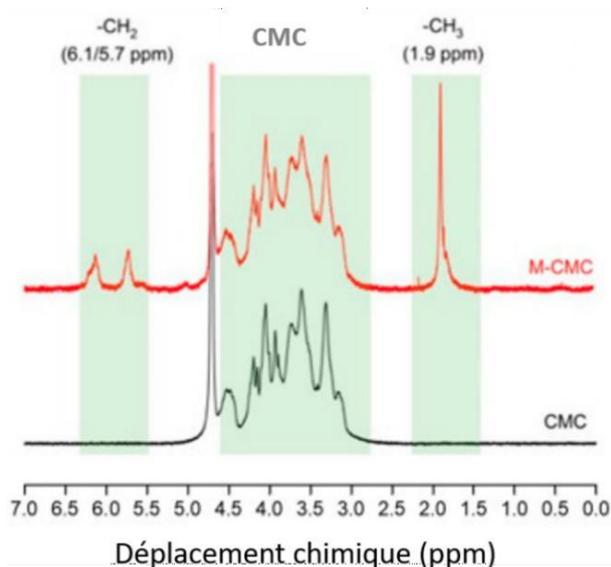


Figure I-27 : Spectres RMN ^1H de la CMC et de la mCMC (DM = 60 %) à 25 °C dans le D_2O [190].

Parmi les erreurs pouvant être observées dans la littérature, certains spectres RMN ^1H comportent des impuretés intégrant au même déplacement chimique que les protons méthacrylates, tels que les protons de l'acide méthacrylique si l'étape de dialyse n'a pas été menée suffisamment longtemps. La valeur des intégrales et le DM correspondant sont donc dans ce cas surévalués [204,211]. D'autre part, Prasad *et al.* présentent un spectre qui ne correspond pas à celui de la mCMC et détermine le DM le plus élevé (DM = 69 %) [202]. Enfin, la quantification n'est pas systématique et quatre publications ne montrent pas de spectre RMN [155,156,210,212].

I.6.3. PROPRIÉTÉS DES HYDROGELS ET CRYOGELS DE MCMC

Ce paragraphe traite uniquement de la formation d'hydrogels de mCMC qui ont été synthétisés avec de l'anhydride méthacrylique. Trois photo-amorceurs ont été utilisés dans la littérature : l'I2959 [155,156,212], LAP [190,202] et le BAPO-OH [214]. Les formulations ainsi développées permettent de préparer des hydrogels photo-réticulés présentant une large gamme de propriétés (**Tableau I-6**).

Ainsi, le groupe de recherche de B. Nicoll a développé des hydrogels de mCMC pour la réparation tissulaire du nucleus pulposus, une substance gélatineuse retrouvée au cœur du disque intervertébral [155,156,212]. Tout d'abord, en 2010, Reza *et al.* ont essayé d'encapsuler des cellules du nucleus pulposus dans des hydrogels obtenus à partir de deux mCMC différentes, issues de CMC de masses molaires moyennes en masse de 90 et 250 kDa, caractérisées par des DM de 3,3 et 2,9 %, respectivement. Pour cela, après stérilisation, les mCMC ont été solubilisées dans du PBS à des concentrations de 2,3 et 4 %m, en présence des cellules de nucleus pulposus et de 0,05 %m d'I2959. Des hydrogels cylindriques ont ensuite été obtenus en insolant pendant 10 min la formulation coulée dans un moule. Les résultats de cytotoxicités montrent que les cellules sont vivantes au contact du matériau. Le taux de gonflement et le module de compression des hydrogels ont été caractérisés. Seuls les hydrogels obtenus à partir des formulations contenant des concentrations de 4 %m de mCMC issue d'une CMC de 90 kDa et de 2 et 3 %m de mCMC synthétisée à partir d'une CMC de 250 kDa, ont été caractérisés. Les hydrogels obtenus avec des concentrations de 1 %m de mCMC et de 3 %m de mCMC provenant de CMC de 250 kDa et 90 kDa, n'étaient pas mécaniquement résistants. Aucune justification n'a été apportée concernant l'absence de caractérisation pour l'hydrogel obtenu à partir de la formulation contenant 5 %m de mCMC (CMC de 90 kDa). Le taux de gonflement a été mesuré sur les cryogels et ne montre pas de variation significative en fonction des différents paramètres. En effet, pour un hydrogel de mCMC issue d'une CMC à 250 kDa, le taux de gonflement est de $4\ 800 \pm 300$ et de $4\ 200 \pm 300$ pour des concentrations de 2 et 3 %m en mCMC, respectivement. De même, à 1 %m de mCMC issue d'une CMC de 90 kDa, le taux de gonflement est de 4600 ± 300 . En revanche, la valeur du module élastique en

compression augmente avec la concentration. En effet, pour un hydrogel de mCMC (CMC à 250 kDa), le module élastique en compression est de $1,27 \pm 0,35$ kPa et de $3,83 \pm 0,87$ kPa pour des concentrations de 2 et 3 %m en mCMC (**Tableau I-6**).

En 2014, Gupta *et al.* ont développé une matrice extracellulaire fonctionnelle pour le nucleus pulposus humain [156]. Dans cette étude, une mCMC issue d’une CMC de 250 kDa présentant un DM de 8,15 % a été utilisée. Les hydrogels étudiés ont été obtenus à partir de différentes formulations constituées de 1,5, 2,5 ou 3,5 %m de mCMC, et de 0,05 %m d’I2959, solubilisés dans le PBS et insolés sous UV pendant 10 minutes. Contrairement aux résultats publiés dans la première étude, la concentration de la formulation a une influence sur le taux de gonflement et sur le module élastique en compression de l’hydrogel obtenu. Le premier diminue et le deuxième augmente avec l’augmentation de la concentration en mCMC, malgré des incertitudes importantes sur les valeurs des propriétés de l’hydrogel à 1.5 %m. La distance entre deux points de réticulation, calculée à partir de la théorie de Flory-Rehner est de l’ordre d’une centaine de nanomètre, donnant des densités de nœuds de réticulation de l’ordre de la $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$.

En 2015, Lin *et al.* ont conservé le même procédé de fabrication des hydrogels que Gupta *et al.* à partir d’une mCMC de masse molaire 90 kDa [212]. En revanche, les DM des mCMC obtenues étaient de 10, 15 et 25 % en ayant utilisé les mêmes paramètres du protocole de synthèse pour chaque mCMC obtenue. Quatre hydrogels ont été comparés à partir de formulations composées de concentrations de 2 et 4 %m de mCMC (DM = 10 %), et de 2 %m de mCMC (DM = 15 et 25 %). Dans cette étude, l’objectif était d’augmenter la densité de nœuds de réticulation pour améliorer les propriétés de l’ECM pour le nucleus pulposus. Comme précédemment, le gonflement diminue et le module élastique en compression augmente avec l’augmentation de la concentration dans le cas de la mCMC 10 %. De même, une légère diminution du taux de gonflement est observée avec l’augmentation du DM. En revanche, il n’y a pas de variation significative sur le module élastique en compression entre les hydrogels avec des mCMC avec des DM de 10 ou 15 %. Une légère augmentation de ce dernier est observée avec un hydrogel de mCMC 25 %. Dans les trois cas, la comparaison entre les propriétés des hydrogels peut être controversée étant donné que la concentration en photo-initiateur est équivalente (0,05 %m) dans chaque formulation et n’est pas dépendante de la quantité de méthacrylates.

La dernière publication traitant de la réticulation de la mCMC obtenue par réaction de la CMC avec l’anhydride méthacrylique est celle de Melilli *et al.* [190]. L’objectif de cette étude était le développement d’une formulation imprimable par DLP. Dans ce cadre, une mCMC avec un DM de 60 % a été solubilisée à 2 %m dans l’eau en présence de 0,4 %m de LAP (**Tableau I-6**). Dans le cas des tests de compression et de gonflement, les hydrogels ont été imprimés avec des couches de 50 μm insolés par une LED à 30 mW/cm^2 .

Malheureusement, les durée d’insolation de chaque couche n’ont pas été mentionnés. De plus, les mesures des propriétés rhéologiques n’ont pas été mesurées sur les hydrogels imprimés. Le même groupe de recherche a réalisé les mêmes caractérisations sur un hydrogel obtenu à partir d’une formulation contenant du BAPO-OH à la place du LAP comme photo-amorceur (**Tableau I-6**) [214]. De façon contre intuitive, en comparaison avec l’hydrogel précédent, le module élastique G' est plus faible, mais le module de compression est plus élevé et l’hydrogel absorbe moins d’eau. Le photo-amorceur a donc un effet sur les propriétés des hydrogels.

Tableau I-6 : Propriétés des hydrogels et **cryogels** de mCMC et applications. Afin d’assurer une comparaison appropriée, ce tableau ne répertorie que la réticulation des mCMC sans l’ajout d’un autre agent de réticulation ou d’une autre espèce [155,156,190,212,214]. Certaines caractérisations comme le taux de gonflement et la mesure de la porosité ont été réalisées sur les **cryogels**.

mCMC		Formulation		Mise en forme		Propriétés					Application	Réf			
Mw (kDa)	DM (%)	mCMC (m%)	Photo-amorceur /concentration (m%)	λ_{UV} (nm)	Temps (min) / Puissance UV (W)	Densité de nœuds de réticulation ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$)	Porosité (μm)	Taux de gonflement à l’équilibre (%)	Module élastique en compression (kPa)	Module élastique G’ (Pa) à 1 %, 1 Hz					
90	3,29	4	I2959 / 0,05	368	10 / 1,2	n.d.	n.d.	<i>4 600 ± 300</i>	1,37 ± 0,44	n.d.	Encapsulation du nucleus pulposus	[155]			
	10	4				8,1*		<i>4 300*</i>	6,17 ± 1,16						
		2				3,2*		<i>7 400*</i>	1,74 ± 0,47						
	15	2				3,6*		<i>6 800*</i>	1,61 ± 0,75						
	25	2				5,0*		<i>5 700*</i>	3,95 ± 1,16						
250	2,87	2	LAP / 0,04	385	Variable	n.d.	n.d.	<i>4 800 ± 300</i>	1,27 ± 0,35	n.d.	Encapsulation du nucleus pulposus	[155]			
		3				5,92 ± 4,04		<i>4 200 ± 300</i>	3,53 ± 0,87						
	8,15	1,5				7,31 ± 0,44		<i>6 500 ± 2200</i>	3,38 ± 1,12						
		2,5				11,3 ± 0,40		<i>4 500 ± 160</i>	7,91 ± 2,28						
		3,5				<i>3 500 ± 282</i>		13,81 ± 1,66							
	60	2				PABO-OH / 0,04		n.d.	<i>80*</i>		650	32	3 320	réparation tissulaire, biocapteurs	[190]
								1,7 ± 0,6	n.d.		450	43*	500*		[214]

*Mw : masse molaire moyenne en masse ; DM : degré de méthacrylation ; λ : longueur d’onde ; *valeurs déterminées à partir d’un graphique. En italique pour les propriétés des cryogels*

I.6.4. HYDROGELS COMPOSITES DE MCMC

Un hydrogel composite est un matériau obtenu en incorporant des charges ou des particules inorganiques ou organiques dans le réseau 3D, dans le but de modifier certaines de ses propriétés afin de répondre à des exigences spécifiques. Cette incorporation permet de créer un matériau hybride qui conserve les caractéristiques du gel tout en apportant de nouvelles propriétés issues des éléments ajoutés.

I.6.4.1. Exemple de l’ajout d’un agent réticulant

Afin d’améliorer les propriétés mécaniques et la stabilité des hydrogels, il est souvent nécessaire d’ajouter des agents réticulant pour renforcer la structure du gel.

Dutta *et al.* ont développé des hydrogels à partir d’une copolymérisation de N-isopropylacrylamide (NIPA) et des méthacrylates de la mCMC dans un but de délivrance de principes actifs [213]. Dans cette formulation, la mCMC est l’additif du réseau NIPA, avec au maximum 25 %m de mCMC par rapport au NIPA.

Zhang *et al.* [210] ont réalisé une formulation d’un mélange d’hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA), d’acrylamide et de mCMC dans du PBS pour réaliser une résine photo-réticulable pour l’impression par DLP. Plusieurs compositions ont été étudiées, puis deux photo-amorceurs ont été ajoutés : le TPO à 0,3 %m, qui est toxique, et le camphoroquinone à 0,5 %m qui est non soluble dans l’eau [215,216]. Enfin, 0,3 %m de nanoparticules de laponite ont été ajoutés dans la formulation pour servir de renfort mécanique. Les hydrogels ont été imprimés par DLP sous irradiation à 405 nm avec des couches insolées pendant 5 à 20 s. L’épaisseur et le nombre de couches n’ont pas été mentionnés. L’augmentation de la concentration en hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA) et acrylamide diminue la taille des pores et augmente le module élastique en compression. En revanche, le taux de gonflement des hydrogels n’a pas de variation significative et est d’environ 600 % de la masse initiale de l’hydrogel imprimé. La dégradation dans la cellulase est négligeable avec l’ajout d’HEMA et d’acrylamide.

I.6.4.2. Ajout de nanocristaux de cellulose

Les nanocristaux de cellulose (NCC) seuls ont été largement étudiés pour renforcer mécaniquement des composites polymères et des hydrogels. Par ailleurs, la modification chimique des NCC est parfois envisagée pour réagir de manière covalente avec le réseau de polymères et renforcer l’hydrogel de manière plus efficace [55,217–220]. Enfin, leurs

propriétés, leurs structures et leur biocompatibilité en font des additifs particulièrement intéressants pour des hydrogels destinés à des applications médicales [221].

Dans ce contexte, il peut être intéressant d'ajouter des nanocristaux de cellulose dans des hydrogels de mCMC, notamment parce qu'ils possèdent une structure moléculaire proche de la CMC. Le mélange de ces deux entités a déjà été étudié en solution aqueuse, pour la formation de papier ou d'emballages alimentaires [222–226].

Cafiso *et al.* ont ajouté des NCC issus des rafles (résidus) du palmier à huile vides dans les hydrogels de mCMC développés par Melilli *et al.* [214]. Une formulation aqueuse contenant 2 %m de mCMC, 1 %m de NCC et du BAPO-OH (0,04 %m) comme photo-amorceur a ainsi été utilisée pour préparer des hydrogels dans les mêmes conditions que Melilli *et al.* (Tableau I-6, Tableau I-7) [190]. Les auteurs ont montré que l'ajout de NCC n'augmente pas significativement le temps de gélification qui passe de 4 secondes sans NCC, à 6 secondes avec. Les propriétés rhéologiques n'ont pas été mesurées sur les hydrogels imprimés, mais en prenant en compte les valeurs maximales de G' obtenues lors des mesures de temps de gélification par rhéologie en temps réel de l'hydrogel formé au cours du temps. D'autre part, les conditions d'insolation ne sont pas les mêmes, l'irradiance de la source UV utilisée est de 25 mW/cm² dans ce cas et non de 30 mW/cm². En présence de NCC, la valeur du module élastique G' à 1 % et 1 Hz a été multipliée par 2 ($G'_{\text{hydrogel référence}} = 500 \text{ Pa}$, $G'_{\text{hydrogel renforcé}} \approx 1100 \text{ Pa}$). Ce résultat est expliqué par les auteurs par l'augmentation de la densité de noeuds de réticulation engendrée par la présence de NCC, sans que l'origine de cette augmentation, non intuitive, ne soit explicitée. Cependant, le calcul effectué prend en compte la valeur du module G' obtenue au plateau des mesures de rhéologie. Or, la valeur de ce module ne dépend pas seulement de la densité de noeuds de réticulation mais aussi de la présence seule des NCC, qui par essence, permettent de renforcer le réseau sans pour autant participer à la réticulation. De plus, le module élastique en compression a lui aussi été augmenté d'un facteur 1,3 en passant de 32 kPa pour l'hydrogel de mCMC seule à 43 kPa en présence de NCC. En somme, les propriétés mécaniques ont été augmentées avec l'intégration des NCC. Enfin, la présence des NCC fait diminuer le taux de gonflement des hydrogels d'un facteur 1,5 (300 % avec et 450 % sans). Ce résultat est expliqué par l'augmentation de la densité de noeuds de réticulation qui limite l'étirement du réseau lors du gonflement et par la diminution du volume libre dans le réseau, qui est en partie occupé par les NCC.

I.6.4.3. Ajout de nanocristaux de cellulose méthacrylate

Afin d'améliorer davantage les propriétés mécaniques des hydrogels, il est parfois nécessaire de fonctionnaliser les NCC de façon à interagir de manière covalente avec le réseau de polymères.

Jusqu'à présent, la fonctionnalisation de NCC avec des groupements norbornènes n'a pas été reportée dans la littérature. Cependant, celle-ci a déjà été réalisée sur les nanofibrilles de cellulose (NFC) [227–229]. En revanche, Wang *et al.* ont greffé des thiols en surface de NCC (DS = 0,26) afin de les rendre réactifs vis-à-vis de groupements méthacrylates greffés sur de la gélatine. La formulation développée a ensuite été utilisée pour imprimer des hydrogels par DLP [230].

Plusieurs réactions ont été envisagées sur la fonctionnalisation des CNC par des fonctions méthacrylates pour former des nanocristaux de cellulose méthacrylate (mNCC). L'acide méthacrylique est un des réactifs utilisés pour la méthacrylation des NCC [231,232]. De cette façon, Nielsen *et al.* ont développé des NCC modifiés pour la détection de pH par un double marquage fluorescent [231]. Dans ces travaux, la méthacrylation des NCC a été réalisée par estérification des groupes hydroxyles avec l'acide méthacrylique dans le dichlorométhane en présence de deux catalyseurs (N,N'-diisopropylcarbodiimide et 4-diméthylaminopyridine). Wang *et al.* ont réalisé une estérification de Fischer d'une suspension de NCC dans l'eau, en présence de toluène (agent de déshydratation), d'acide paratoluènesulfonique (catalyseur) et de phénothiazine (inhibiteur de polymérisation) [232]. L'acide méthacrylique a ensuite été ajouté lentement à 80 °C. Après 4 heures de réaction à 120 °C, la caractérisation des NCC par RMN ¹³C CP-MAS du solide a prouvé la méthacrylation, sans que le DS n'ait été quantifié.

L'anhydride méthacrylique (AM) a également été utilisé pour la méthacrylation des NCC [233–236]. Wang *et al.* ont fait réagir l'AM avec les NCC dans du diméthylformamide (DMF) en présence de pyridine à 60 °C pendant 18 heures [233]. Cette modification a été suivie d'un greffage du BAPO sur les NCC pour la création d'un photo-amorceur NCC-BAPO dédié à la polymérisation de groupements méthacrylates. En 2017, Siqueira *et al.* ont fonctionnalisé de la même manière les NCC pour le développement d'une encre imprimable en ajoutant 188,9 g d'AM et 4,8 g de pyridine à une suspension de 2 %m de NCC dans 156,7 g d'une composition de CNC/DMF [234]. La réaction entre l'AM et les NCC en présence de pyridine a été réalisée à 105 °C pendant 5 h. Dans ces deux études, le DS des NCC modifiés n'est malheureusement pas étudié. Bai *et al.* ont développé un composite constitué de poly(alcool vinylique) fonctionnalisé avec du méthacrylate de glycidyle et de nanocristaux de cellulose fonctionnalisés avec de l'AM pour une utilisation dans le domaine du packaging [235]. Pour fonctionnaliser les NCC, de l'AM et du 4-diméthylaminopyridine (DMAP) ont été ajoutés à une suspension de NCC dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) à 50 °C puis la synthèse s'est

déroulée pendant 48 heures. Un DS de 0,68 % a ainsi été obtenu. Enfin, Ma *et al.* ont réalisé la méthacrylation de NCC avec l'AM en milieu aqueux pendant 4 heures à 50 °C en ajustant le pH entre 8 et 10 avec de la soude [236]. Cependant, aucun DS n'a été déterminé. Les NCC méthacrylate (mNCC) et non méthacrylate ont été ajoutés pour renforcer des plastiques à base d'isolats de protéines de soja. Ils apportent une résistance accrue à l'eau et une amplitude de déformation plus importante que la matrice initiale.

Cafiso *et al.* a utilisé le 3-(triméthoxysilyl) propyl méthacrylate (TPM) pour fonctionnaliser les NCC [214]. La méthacrylation a été réalisée en ajoutant le TPM dans une dispersion de NCC à 2 %m dans l'eau. Le pH a été ajusté à 3,0 et la réaction s'est déroulée pendant 24 h à température ambiante. La quantification du DS n'a pas été effectuée. Ces NCC méthacrylates ont ensuite été utilisés pour renforcer des hydrogels de carboxyméthylcellulose méthacrylate à partir d'une formulation contenant 2 %m de mCMC et 1 %m de mNCC et du BAPO-OH (0,04 %m) comme photo-amorceur (**Tableau I-7**) [214]. Les auteurs ont montré que l'ajout des mNCC renforce davantage la structure des hydrogels que l'ajout de NCC non fonctionnalisés, du fait de leur participation covalente au réseau. Les auteurs ont montré que l'ajout de mNCC n'impacte pas significativement les cinétiques de réticulation. En effet, le temps de gélification est passé de 4 secondes sans mNCC, à 2 secondes avec. Ainsi, les hydrogels contenant des mNCC présentent un module élastique G' supérieur (2400 Pa) à ceux des hydrogels renforcés avec des NCC (500 Pa). En conséquence, les auteurs en concluent une densité de noeuds de réticulation supérieure, preuve de leur participation dans la réticulation des méthacrylates des mNCC entre eux et avec la mCMC. Cependant, comme avec les NCC, le calcul utilisé prend en compte la valeur du module G' obtenue au plateau des mesures de rhéologie en temps réel. Or, la valeur de ce module ne dépend pas uniquement de la densité de noeuds de réticulation mais aussi de la présence des mNCC qui renforcent le matériau sans nécessairement participer à la réticulation. Les hydrogels obtenus ont une plus faible résistance à la déformation que ceux sans nanocristaux et ceux avec NCC non fonctionnalisés. En revanche, le module élastique en compression n'est pas supérieur à celui des hydrogels contenant des NCC. La présence des NCC conduit à une diminution du taux de gonflement car en leur présence le réseau est plus dense. Les modules élastiques en compression des hydrogels gonflés ont été mesurés. Les hydrogels contenant des mNCC perdent moins leurs propriétés mécaniques après gonflement que ceux avec des NCC. En effet, le module élastique en compression des hydrogels gonflés avec mNCC est de 26 kPa, soit 1,6 fois moins que l'hydrogel initial (43 kPa), alors que l'hydrogel gonflé avec des NCC a un module élastique en compression de 14 kPa et qu'il était de 55 kPa pour l'hydrogel initial. De même, les hydrogels gonflés de mCMC avec et sans NCC ont le même module élastique (14 kPa), ce qui peut laisser supposer la migration hors du réseau des NCC à travers le réseau lors du gonflement. Ceci prouve l'importance des mNCC pour le renforcement des hydrogels pouvant être amenés à

gonfler tout en conservant une certaine rigidité. Cependant, les auteurs n’ont pas mesuré le DS des mNCC ni étudié l’influence de sa variation sur les propriétés des hydrogels.

Tableau I-7 : Composition des formulations de mCMC et NCC/mNCC (0,04 %m BAPO-OH) et propriétés des hydrogels obtenus. Les mesures de G' sont obtenues après 60 s d’insolation à 30 mW/cm². Les autres caractérisations sont réalisées sur des hydrogels imprimés avec des couches de 50 μ m, insolés 13, 15 et 12 s avec 30 mW/cm² pour les formulations de mCMC, avec NCC et mNCC [214].

Composition	t_{gel} (s)	Module élastique G' (Pa) à 1 %, 1 Hz	Densité de noeuds de réticulation (μ mol/cm ³)	Module élastique en compression (kPa)	Taux de gonflement à l’équilibre (%)	Module élastique en compression des hydrogels gonflés (kPa)
2 %m mCMC	4*	500*	1,70 \pm 0,6	37*	450	14*
2 %m mCMC 1 %m NCC	6*	1 100*	3,13 \pm 0,04	55*	300	14*
2 %m mCMC 1 %m mNCC	2*	2 400*	5,72 \pm 1,01	43*	150	26*

*valeurs déterminées à partir d’un graphique.

I.6.5. FABRICATION ADDITIVE D’HYDROGELS DE MCMC

Dans la littérature scientifique, seulement trois publications traitent de l’impression par DLP d’hydrogels de mCMC. Tout d’abord, Zhang *et al.* ont imprimé des hydrogels à partir de formulations constituées de mCMC, d’HEMA, d’acrylamide et de nanoparticules de Laponite (silicate d’aluminium et de magnésium) (**Figure I-28**) [210]. Les hydrogels obtenus sont destinés à la culture de cellules stromales de la moelle osseuse. Cependant, la publication ne mentionne aucune information sur les objets imprimés.

Un second groupe de recherche, mené par le Dr. Chiappone, à l’Institut Polytechnique de Turin (Italie), a également mis en forme par DLP un hydrogel à partir d’une formulation de mCMC à 2%*m* dans l’eau (**Figure I-28**) [190]. L’imprimante DLP utilisée (UV-MAX, Asiga, Australie) possède un pixel de dimension 62 μ m en XY. Les hydrogels ont été imprimés par couches successives de 50 μ m (Z) avec une irradiance d’insolation UV (385 nm) de 30 mW/cm². Les objets ont ensuite été post-réticulés sous UV pendant 6 minutes à 12 mW/cm². Malheureusement, le nombre de couches et le durée d’insolation de chaque couche ne sont pas mentionnés. Les hydrogels imprimés sans post-réticulation présentent des formes relativement simples (**Figure I-28a et b**). Un objet plus détaillé a été imprimé mais l’hydrogel obtenu présente une mauvaise résolution difficile à définir (**Figure I-28d**). Pour améliorer la résolution des hydrogels imprimés, Melilli *et al.* ont remplacé l’eau par un milieu de culture cellulaire (DNEM) absorbant à 385 nm. La résolution est ainsi améliorée dans les trois dimensions XYZ (**Figure I-28e et f**). Un objet possédant un creux a pu être obtenu, ce qui n’est pas possible sans

photo-absorbeur étant donné que le faisceau UV diffuse sur toute l’épaisseur insolée. Des objets avec une résolution proche de 500 μm en XY ont été obtenus. Les hydrogels imprimés dans le milieu de culture cellulaire ont un module élastique G' trois fois inférieur à ceux obtenus dans l’eau. En effet, le module élastique G' est de 1 030 Pa dans le milieu de culture et de 3 320 Pa dans l’eau. En revanche, en remplaçant l’eau par le milieu de culture, le groupe de recherche s’est affranchi de l’utilisation de photo-absorbeurs solubles dans l’eau et absorbant à 365-385 ou 405 nm dont la toxicité est avérée ou suspectée comme la tartrazine ou les colorants alimentaires [169,237–239]. Dans cette étude, l’influence des paramètres d’impression et de la composition de la formulation sur la résolution des objets n’a pas été étudiée.

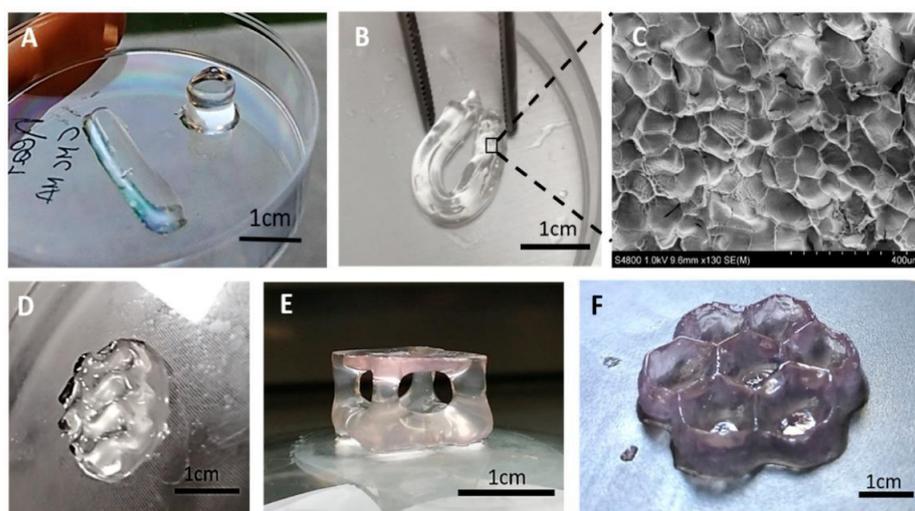


Figure I-28 : Hydrogels de mCMC imprimés par DLP par Melilli *et al.* (A) Cylindres simples et rectangle (B) L’hydrogel rectangle présente une bonne flexibilité et une bonne maniabilité (C) Image MEB de l’hydrogel lyophilisé. (D) Hydrogels imprimés à partir de formulations constituées de 2 %m de mCMC (DM = 60 %) dans l’eau (E,F) ou dans un milieu de culture [190].

Plus récemment, en 2022, Cafiso *et al.* ont imprimé par DLP des hydrogels à partir d’une formulation cellulosique en ajoutant des NCC ou des mNCC (**Figure I-29**) afin de renforcer la structure des hydrogels et d’améliorer la résolution des objets imprimés. L’imprimante DLP utilisée (Asiga MAX, Australie) présente une résolution XY de 27 μm . L’irradiance utilisée est de 30 mW/cm^2 et des couches de 50 μm (Z) sont imprimées avec des insolations respectives de 13 secondes avec la formulation seulement composée de mCMC, 15 s avec NCC et 12 s avec les mNCC. Après avoir été nettoyés dans un bain d’eau distillée, les hydrogels ont été post-réticulés 3 minutes sous UV (385 nm) à 50 mW/cm^2 . Lors de cette étape, il est possible que les hydrogels aient subi un gonflement pouvant augmenter la résolution finale. Comme discuté précédemment, les hydrogels sont effectivement plus résistants lorsqu’ils contiennent des NCC ou des mNCC (**Tableau I-7**). En comparaison avec l’hydrogel imprimé **Figure I-28f**, la résolution de celui imprimé avec des mNCC est moins bonne en raison d’un contrôle difficile de la polymérisation en présence des nanocristaux (**Figure I-29b**) [214]. Pour pallier ce

problème, le colorant vert brillant BS (E142) a été utilisé comme photo-absorbeur. Le groupe de recherche affirme qu’une meilleure résolution a été obtenue dans les trois dimensions de l’espace. Or, la résolution en XY est toujours de l’ordre du mm et aucun objet possédant des cavités n’a été imprimé afin de prouver l’amélioration de la résolution en Z. De plus, le colorant utilisé est toxique, et ne permet pas d’envisager des applications biomédicales [240,241] (Figure I-29d et e).

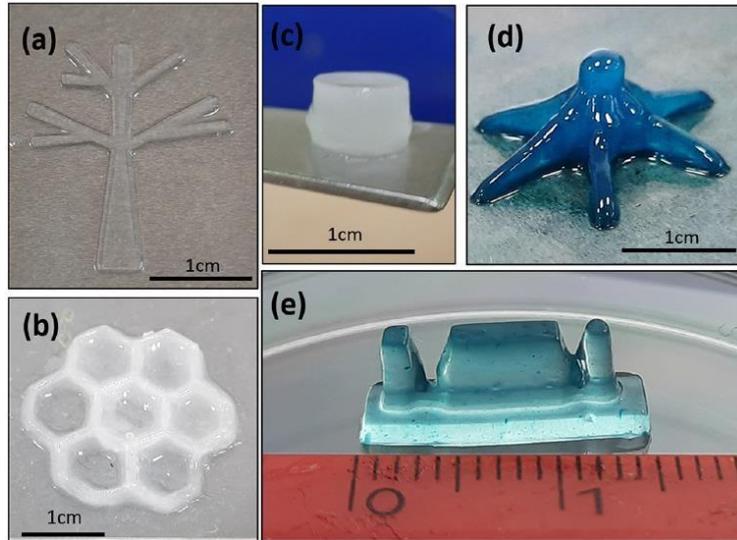


Figure I-29 : Hydrogels imprimés par DLP par Cafiso et al. à partir de formulations constituées de 2 %m de mCMC dans l’eau et 1 %m de mNCC, sans (a-c) ou avec un colorant vert brillant BS (d, e) [214].

Les résultats obtenus soulignent clairement les défis liés à l’impression d’hydrogels de mCMC avec une combinaison de résistance mécanique et de résolution adaptées aux applications biomédicales.

I.7. CONCLUSIONS

Bien que de nombreuses études aient été menées sur la méthacrylation de la mCMC et la formation d'hydrogels, il est difficile d'identifier des tendances claires en fonction de ces différents paramètres. Dans ce contexte, un des objectifs de cette thèse est de comprendre en profondeur l'influence de ces paramètres et des mécanismes sous-jacents sur les propriétés des hydrogels et des cryogels de mCMC grâce à des mesures quantitatives. L'objectif ultime est de développer une formulation imprimable offrant une résolution supérieure à celles obtenues dans les travaux déjà publiés dans la littérature. L'objectif de cette thèse est de proposer des solutions aux difficultés mentionnées précédemment. Pour ce faire, une analyse approfondie de l'influence du rapport DM (degré de méthacrylation) et de la concentration en mCMC sur les propriétés physicochimiques et mécaniques des hydrogels est nécessaire. De plus, il est primordial d'évaluer l'effet de l'ajout de nanocristaux de cellulose, qu'ils soient fonctionnalisés ou non sur ces mêmes propriétés mais aussi sur l'imprimabilité des formulations. En outre, l'étude du choix du photo-amorceur et de l'optimisation des paramètres d'impression revêt une importance capitale pour obtenir des objets précis grâce à la fabrication additive de type « *vat photopolymerization* ». En combinant ces différentes investigations, l'objectif est de développer une approche novatrice permettant de surmonter les contraintes actuelles et de parvenir à la réalisation d'hydrogels imprimables offrant à la fois la résistance mécanique et la résolution requises pour des applications biomédicales réussies.

RÉFÉRENCES

1. Mohammed, A.S.A.; Naveed, M.; Jost, N. Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities). *J Polym Environ* **2021**, doi:10.1007/s10924-021-02052-2.
2. S. Dassanayake, R.; Acharya, S.; Abidi, N. Biopolymer-Based Materials from Polysaccharides: Properties, Processing, Characterization and Sorption Applications. In *Advanced Sorption Process Applications*; Edeballi, S., Ed.; IntechOpen, 2019 ISBN 978-1-78984-818-2.
3. Luo, M.; Zhang, X.; Wu, J.; Zhao, J. Modifications of Polysaccharide-Based Biomaterials under Structure-Property Relationship for Biomedical Applications. *Carbohydrate Polymers* **2021**, *266*, 118097, doi:10.1016/j.carbpol.2021.118097.
4. Danks, A.E.; Hall, S.R.; Schnepf, Z. The Evolution of 'Sol-Gel' Chemistry as a Technique for Materials Synthesis. *Mater. Horiz.* **2016**, *3*, 91–112, doi:10.1039/C5MH00260E.
5. Gupta, R.C.; Lall, R.; Srivastava, A.; Sinha, A. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 192, doi:10.3389/fvets.2019.00192.
6. Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H.-P.; Bohn, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *36*.
7. Radotić, K.; Mičić, M. Methods for Extraction and Purification of Lignin and Cellulose from Plant Tissues. In *Sample Preparation Techniques for Soil, Plant, and Animal Samples*; Micic, M., Ed.; Springer Protocols Handbooks; Springer New York: New York, NY, 2016; pp. 365–376 ISBN 978-1-4939-3184-2.
8. Willstätter, R.; Zechmeister, L. Zur Kenntnis der Hydrolyse von Cellulose I. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1913**, *46*, 2401–2412, doi:10.1002/cber.191304602174.
9. Staudinger, H. Über Polymerisation. *Ber. dtsh. Chem. Ges. A/B* **1920**, *53*, 1073–1085, doi:10.1002/cber.19200530627.
10. Klemm, D.; Phillip, B.; Heinze, T.; Heinze, ute *Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and Analytical Methods*; Wiley-VCH.; 1998; Vol. 1; ISBN 978-3-527-29413-8.
11. Habibi, Y.; Lucia, L.A.; Rojas, O.J. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3479–3500, doi:10.1021/cr900339w.
12. Lindman, B.; Karlström, G.; Stigsson, L. On the Mechanism of Dissolution of Cellulose. *Journal of Molecular Liquids* **2010**, *156*, 76–81, doi:10.1016/j.molliq.2010.04.016.
13. Tao, H.; Lavoine, N.; Jiang, F.; Tang, J.; Lin, N. Reducing End Modification on Cellulose Nanocrystals: Strategy, Characterization, Applications and Challenges. *Nanoscale Horiz.* **2020**, *5*, 607–627, doi:10.1039/D0NH00016G.
14. Kang, H.; Liu, R.; Huang, Y. Cellulose Derivatives and Graft Copolymers as Blocks for Functional Materials: Cellulose Derivatives and Graft Copolymers Functional Materials. *Polym. Int* **2013**, *62*, 338–344, doi:10.1002/pi.4455.
15. Moon, R.J.; Martini, A.; Nairn, J.; Simonsen, J.; Youngblood, J. Cellulose Nanomaterials Review: Structure, Properties and Nanocomposites. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3941, doi:10.1039/c0cs00108b.
16. Erdal, N.B.; Hakkarainen, M. Degradation of Cellulose Derivatives in Laboratory, Man-Made, and Natural Environments. *Biomacromolecules* **2022**, *23*, 2713–2729, doi:10.1021/acs.biomac.2c00336.
17. Data bridge Global Carboxymethyl Cellulose Market - Industry Trends and Forecast to 2029 Available online: <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-carboxymethyl-cellulose-market> (accessed on 17 February 2023).

18. Heinze, T.; Koschella, A. Carboxymethyl Ethers of Cellulose and Starch - A Review. *Macromol. Symp.* **2005**, *223*, 13–40, doi:10.1002/masy.200550502.
19. Rahman, Md.S.; Hasan, Md.S.; Nitai, A.S.; Nam, S.; Karmakar, A.K.; Ahsan, Md.S.; Shiddiky, M.J.A.; Ahmed, M.B. Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose. *Polymers* **2021**, *13*, 1345, doi:10.3390/polym13081345.
20. Casaburi, A.; Montoya Rojo, Ú.; Cerrutti, P.; Vázquez, A.; Foresti, M.L. Carboxymethyl Cellulose with Tailored Degree of Substitution Obtained from Bacterial Cellulose. *Food Hydrocolloids* **2018**, *75*, 147–156, doi:10.1016/j.foodhyd.2017.09.002.
21. Parikh, D.V.; Fink, T.; Rajasekharan, K.; Sachinvala, N.D.; Sawhney, A.P.S.; Calamari, T.A.; Parikh, A.D. Antimicrobial Silver/Sodium Carboxymethyl Cotton Dressings for Burn Wounds. *Textile Research Journal* **2005**, *75*, 134–138, doi:10.1177/004051750507500208.
22. Yáñez-S, M.; Matsuhira, B.; Maldonado, S.; González, R.; Luengo, J.; Uyarte, O.; Serafine, D.; Moya, S.; Romero, J.; Torres, R.; et al. Carboxymethylcellulose from Bleached Organosolv Fibers of Eucalyptus Nitens: Synthesis and Physicochemical Characterization. *Cellulose* **2018**, *25*, 2901–2914, doi:10.1007/s10570-018-1766-7.
23. Mondal, Md.I.H.; Yeasmin, Mst.S.; Rahman, Md.S. Preparation of Food Grade Carboxymethyl Cellulose from Corn Husk Agrowaste. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, *79*, 144–150, doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.04.061.
24. Silva, D.A.; de Paula, R.C.M.; Feitosa, J.P.A.; de Brito, A.C.F.; Maciel, J.S.; Paula, H.C.B. Carboxymethylation of Cashew Tree Exudate Polysaccharide. *Carbohydrate Polymers* **2004**, *58*, 163–171, doi:10.1016/j.carbpol.2004.06.034.
25. Heinze, T.; Pfeiffer, K. Studies on the Synthesis and Characterization of Carboxymethylcellulose. *Angew. Makromol. Chem.* **1999**, *266*, 37–45, doi:10.1002/(SICI)1522-9505(19990501)266:1<37::AID-APMC37>3.0.CO;2-Z.
26. Eyler, R.W.; Klug, E.D.; Diephuis, Floyd. Determination of Degree of Substitution of Sodium Carboxymethylcellulose. *Anal. Chem.* **1947**, *19*, 24–27, doi:10.1021/ac60001a007.
27. Yeasmin, Mst.S.; Mondal, Md.I.H. Synthesis of Highly Substituted Carboxymethyl Cellulose Depending on Cellulose Particle Size. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, *80*, 725–731, doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.07.040.
28. Mondal, I.H.; Rahman, S.; Yeasmin, M.S.; Sayeed, A. SYNTHESIS OF CARBOXYMETHYL CELLULOSE FROM CORN LEAVES BASED ON PARTICLE SIZE – A NEW ASPECT.
29. Edali, M.; Esmail, M.N.; Vastias, G.H. Rheological Properties of High Concentrations of Carboxymethyl Cellulose Solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *79*, 1787–1801, doi:10.1002/1097-4628(20010307)79:10<1787::AID-APP70>3.0.CO;2-2.
30. Wang, F.; Sun, Z.; Li, X.; Wang, K.; Chen, D.; Li, Z. Study on Factors Influencing the Viscosity of Sodium Carboxymethyl Cellulose Used in Capsule-Mucous Sealers. *Geofluids* **2022**, *2022*, 1–9, doi:10.1155/2022/4198311.
31. Laribi, N.; Maatoug, S.; University of Monastir, ISET Ksar Hellal, Laboratory of Textile Engineering, B.P. 68, Ksar Hellal, 5070, Monastir, Tunisia; Jebali, Z.; University of Monastir, Faculty of Sciences of Monastir, Laboratory of Interfaces and Advanced Materials, Avenue of the Environment, 5019, Monastir, Tunisia; Zouari, R.; University of Monastir, ISET Ksar Hellal, Laboratory of Textile Engineering, B.P. 68, Ksar Hellal, 5070, Monastir, Tunisia; Majdoub, H.; University of Monastir, Faculty of Sciences of Monastir, Laboratory of Interfaces and Advanced Materials, Avenue of the Environment, 5019, Monastir, Tunisia; Cheikhrouhou, M.; et al. LOW-COST CARBOXYMETHYL HOLOCELLULOSE AND CARBOXYMETHYL CELLULOSE FROM WHEAT STRAW. *Cellulose Chem. Technol.* **2020**, *54*, 225–236, doi:10.35812/CelluloseChemTechnol.2020.54.24.

32. Yang, X.H.; Zhu, W.L. Viscosity Properties of Sodium Carboxymethylcellulose Solutions. *Cellulose* **2007**, *14*, 409–417, doi:10.1007/s10570-007-9137-9.
33. Ghannam, M.T.; Esmail, M.N. Rheological Properties of Carboxymethyl Cellulose. **1997**, *13*.
34. Benchabane, A.; Bekkour, K. Rheological Properties of Carboxymethyl Cellulose (CMC) Solutions. *Colloid Polym Sci* **2008**, *286*, 1173–1180, doi:10.1007/s00396-008-1882-2.
35. Nickerson, R.F.; Habrle, J.A. Cellulose Intercrystalline Structure. *Ind. Eng. Chem.* **1947**, *39*, 1507–1512, doi:10.1021/ie50455a024.
36. Rånby, B.G. Fibrous Macromolecular Systems. Cellulose and Muscle. The Colloidal Properties of Cellulose Micelles. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 158–164, doi:10.1039/DF9511100158.
37. Nagarajan, K.J.; Ramanujam, N.R.; Sanjay, M.R.; Siengchin, Suchart.; Surya Rajan, B.; Sathick Basha, K.; Madhu, P.; Raghav, G.R. A Comprehensive Review on Cellulose Nanocrystals and Cellulose Nanofibers: Pretreatment, Preparation, and Characterization. *Polymer Composites* **2021**, *42*, 1588–1630, doi:10.1002/pc.25929.
38. Djafari Petroudy, S.R.; Shojaeiarani, J.; Chabot, B. Recent Advances in Isolation, Characterization, and Potential Applications of Nanocellulose-Based Composites: A Comprehensive Review. *Journal of Natural Fibers* **2023**, *20*, 2146830, doi:10.1080/15440478.2022.2146830.
39. Revol, J.-F.; Bradford, H.; Giasson, J.; Marchessault, R.H.; Gray, D.G. Helicoidal Self-Ordering of Cellulose Microfibrils in Aqueous Suspension. *International Journal of Biological Macromolecules* **1992**, *14*, 170–172, doi:10.1016/S0141-8130(05)80008-X.
40. Foster, E.J.; Moon, R.J.; Agarwal, U.P.; Bortner, M.J.; Bras, J.; Camarero-Espinosa, S.; Chan, K.J.; Clift, M.J.D.; Cranston, E.D.; Eichhorn, S.J.; et al. Current Characterization Methods for Cellulose Nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 2609–2679, doi:10.1039/C6CS00895J.
41. Lee, H.V.; Hamid, S.B.A.; Zain, S.K. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. *The Scientific World Journal* **2014**, *2014*, 1–20, doi:10.1155/2014/631013.
42. Elazzouzi-Hafraoui, S.; Nishiyama, Y.; Putaux, J.-L.; Heux, L.; Dubreuil, F.; Rochas, C. The Shape and Size Distribution of Crystalline Nanoparticles Prepared by Acid Hydrolysis of Native Cellulose. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 57–65, doi:10.1021/bm700769p.
43. Qiu, X.; Hu, S. “Smart” Materials Based on Cellulose: A Review of the Preparations, Properties, and Applications. *Materials* **2013**, *6*, 738–781, doi:10.3390/ma6030738.
44. Duchemin, B. Size, Shape, Orientation and Crystallinity of Cellulose I β by X-Ray Powder Diffraction Using a Free Spreadsheet Program. *Cellulose* **2017**, *24*, 2727–2741, doi:10.1007/s10570-017-1318-6.
45. Isogai, A.; Usuda, M.; Kato, T.; Uryu, T.; Atalla, R.H. Solid-State CP/MAS Carbon-13 NMR Study of Cellulose Polymorphs. *Macromolecules* **1989**, *22*, 3168–3172, doi:10.1021/ma00197a045.
46. Atalla, R.H.; VanderHart, D.L. The Role of Solid State ¹³C NMR Spectroscopy in Studies of the Nature of Native Celluloses. **1999**, *19*.
47. Nishiyama, Y.; Langan, P.; Chanzy, H. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-Ray and Neutron Fiber Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9074–9082, doi:10.1021/ja0257319.
48. Gong, J.; Li, J.; Xu, J.; Xiang, Z.; Mo, L. Research on Cellulose Nanocrystals Produced from Cellulose Sources with Various Polymorphs. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 33486–33493, doi:10.1039/C7RA06222B.
49. Eyley, S.; Thielemans, W. Surface Modification of Cellulose Nanocrystals. **2014**, *16*.
50. Dufresne, A. Nanocellulose: A New Ageless Bionanomaterial. *Materials Today* **2013**, *16*, 220–227, doi:10.1016/j.mattod.2013.06.004.

51. Daicho, K.; Kobayashi, K.; Fujisawa, S.; Saito, T. Crystallinity-Independent yet Modification-Dependent True Density of Nanocellulose. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 939–945, doi:10.1021/acs.biomac.9b01584.
52. Mariano, M.; El Kissi, N.; Dufresne, A. Cellulose Nanocrystals and Related Nanocomposites: Review of Some Properties and Challenges. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* **2014**, *52*, 791–806, doi:10.1002/polb.23490.
53. Lin, N.; Dufresne, A. Nanocellulose in Biomedicine: Current Status and Future Prospect. *European Polymer Journal* **2014**, *59*, 302–325, doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025.
54. Klemm, D.; Kramer, F.; Moritz, S.; Lindström, T.; Ankerfors, M.; Gray, D.; Dorris, A. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5438–5466, doi:10.1002/anie.201001273.
55. Eyley, S.; Thielemans, W. Surface Modification of Cellulose Nanocrystals. *Nanoscale* **2014**, *6*, 7764–7779, doi:10.1039/C4NR01756K.
56. Tortorella, S.; Vetri Buratti, V.; Maturi, M.; Sambri, L.; Comes Franchini, M.; Locatelli, E. Surface-Modified Nanocellulose for Application in Biomedical Engineering and Nanomedicine: A Review. *IJN* **2020**, *Volume 15*, 9909–9937, doi:10.2147/IJN.S266103.
57. Sharma, A.; Thakur, M.; Bhattacharya, M.; Mandal, T.; Goswami, S. Commercial Application of Cellulose Nano-Composites – A Review. *Biotechnology Reports* **2019**, *21*, e00316, doi:10.1016/j.btre.2019.e00316.
58. Li, W.; Cai, G.; Zhang, P. A Simple and Rapid Fourier Transform Infrared Method for the Determination of the Degree of Acetyl Substitution of Cellulose Nanocrystals. *J Mater Sci* **2019**, *54*, 8047–8056, doi:10.1007/s10853-019-03471-2.
59. Dassanayake, R.S.; Dissanayake, N.; Fierro, J.S.; Abidi, N.; Quitevis, E.L.; Boggavarappu, K.; Thalangaarachchige, V.D. Characterization of Cellulose Nanocrystals by Current Spectroscopic Techniques. *Applied Spectroscopy Reviews* **2021**, 1–26, doi:10.1080/05704928.2021.1951283.
60. Vaca-Garcia, C.; Borredon, M.E.; Gaseto, A. Determination of the Degree of Substitution (DS) of Mixed Cellulose Esters by Elemental Analysis.
61. Kim, U.-J.; Kuga, S.; Wada, M.; Okano, T.; Kondo, T. Periodate Oxidation of Crystalline Cellulose. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 488–492, doi:10.1021/bm0000337.
62. Dyre, J.; Hvidt, S. Towards a Phenomenological Definition of the Term “Gel” K. Almdal.
63. Stojkov, G.; Niyazov, Z.; Picchioni, F.; Bose, R.K. Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications. *Gels* **2021**, *7*, 255, doi:10.3390/gels7040255.
64. Aswathy, S.H.; Narendrakumar, U.; Manjubala, I. Commercial Hydrogels for Biomedical Applications. *Heliyon* **2020**, *6*, e03719, doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03719.
65. M. Kavanag, G.; B. Ross-Murphy, S. Rheological Characterisation of Polymer Gels. *Progress in Polymer Science* **1998**, *23*, 533–562, doi:10.1016/S0079-6700(97)00047-6.
66. Bashir, S.; Hina, M.; Iqbal, J.; Rajpar, A.H.; Mujtaba, M.A.; Alghamdi, N.A.; Wageh, S.; Ramesh, K.; Ramesh, S. Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications. *Polymers* **2020**, *12*, 2702, doi:10.3390/polym12112702.
67. Flory, P.J.; Rehner, J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks. 9.
68. Bruck, S.D. Extension of the Flory-Rehner Theory of Swelling to an Anisotropic Polymer System. *J. RES. NATL. BUR. STAN. SECT. A.* **1961**, *65A*, 485, doi:10.6028/jres.065A.051.

69. Richbourg, N.R.; Peppas, N.A. The Swollen Polymer Network Hypothesis: Quantitative Models of Hydrogel Swelling, Stiffness, and Solute Transport. *Progress in Polymer Science* **2020**, *105*, 101243, doi:10.1016/j.progpolymsci.2020.101243.
70. Nasution, H.; Harahap, H.; Dalimunthe, N.F.; Ginting, M.H.S.; Jaafar, M.; Tan, O.O.H.; Aruan, H.K.; Herfananda, A.L. Hydrogel and Effects of Crosslinking Agent on Cellulose-Based Hydrogels: A Review. *Gels* **2022**, *8*, 568, doi:10.3390/gels8090568.
71. Zafar, S.; Hanif, M.; Azeem, M.; Mahmood, K.; Gondal, S.A. Role of Crosslinkers for Synthesizing Biocompatible, Biodegradable and Mechanically Strong Hydrogels with Desired Release Profile. *Polym. Bull.* **2022**, *79*, 9199–9219, doi:10.1007/s00289-021-03956-8.
72. Wang, S.; Tavakoli, S.; Parvathaneni, R.P.; Nawale, G.N.; Oommen, O.P.; Hilborn, J.; Varghese, O.P. Dynamic Covalent Crosslinked Hyaluronic Acid Hydrogels and Nanomaterials for Biomedical Applications. *Biomater. Sci.* **2022**, *10*, 6399–6412, doi:10.1039/D2BM01154A.
73. Hu, W.; Wang, Z.; Xiao, Y.; Zhang, S.; Wang, J. Advances in Crosslinking Strategies of Biomedical Hydrogels. *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 843–855, doi:10.1039/C8BM01246F.
74. 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. *Biotechnology Advances* **2017**, *35*, 530–544, doi:10.1016/j.biotechadv.2017.05.006.
75. Daval, D.; Xu, D. Biodegradation of Materials: Building Bridges between Scientific Disciplines. *npj Mater Degrad* **2023**, *7*, 36, s41529-023-00356-3, doi:10.1038/s41529-023-00356-3.
76. Cabral, J.; Moratti, S.C. Hydrogels for Biomedical Applications. *Future Medicinal Chemistry* **2011**, *3*, 1877–1888, doi:10.4155/fmc.11.134.
77. Caliari, S.R.; Burdick, J.A. A Practical Guide to Hydrogels for Cell Culture. *Nat Methods* **2016**, *13*, 405–414, doi:10.1038/nmeth.3839.
78. Chaudhuri, O.; Cooper-White, J.; Janmey, P.A.; Mooney, D.J.; Shenoy, V.B. Effects of Extracellular Matrix Viscoelasticity on Cellular Behaviour. *Nature* **2020**, *584*, 535–546, doi:10.1038/s41586-020-2612-2.
79. El-Sherbiny, I.M.; Yacoub, M.H. Hydrogel Scaffolds for Tissue Engineering: Progress and Challenges. *Global Cardiology Science and Practice* **2013**, *2013*, 38, doi:10.5339/gcsp.2013.38.
80. Ding, X.; Zhao, H.; Li, Y.; Lee, A.L.; Li, Z.; Fu, M.; Li, C.; Yang, Y.Y.; Yuan, P. Synthetic Peptide Hydrogels as 3D Scaffolds for Tissue Engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2020**, *160*, 78–104, doi:10.1016/j.addr.2020.10.005.
81. Hoare, T.R.; Kohane, D.S. Hydrogels in Drug Delivery: Progress and Challenges. *Polymer* **2008**, *49*, 1993–2007, doi:10.1016/j.polymer.2008.01.027.
82. Villalba-R, A.M.; Dhama, K.; Iqbal, H.M.N. Biomaterials-Based Hydrogels and Their Drug Delivery Potentialities. *International J. of Pharmacology* **2017**, *13*, 864–873, doi:10.3923/ijp.2017.864.873.
83. Simões, S. Modular Hydrogels for Drug Delivery. *JBNB* **2012**, *03*, 185–199, doi:10.4236/jbnb.2012.32025.
84. Harrison, I.; Spada, F. Hydrogels for Atopic Dermatitis and Wound Management: A Superior Drug Delivery Vehicle. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 71, doi:10.3390/pharmaceutics10020071.
85. Tavakoli, S.; Klar, A.S. Advanced Hydrogels as Wound Dressings. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1169, doi:10.3390/biom10081169.
86. Liang, Y.; He, J.; Guo, B. Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing. *ACS Nano* **2021**, *15*, 12687–12722, doi:10.1021/acsnano.1c04206.
87. Fan, F.; Saha, S.; Hanjaya-Putra, D. Biomimetic Hydrogels to Promote Wound Healing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 718377, doi:10.3389/fbioe.2021.718377.

88. Völlmecke, K.; Afroz, R.; Bierbach, S.; Brenker, L.J.; Frücht, S.; Glass, A.; Giebelhaus, R.; Hoppe, A.; Kanemaru, K.; Lazarek, M.; et al. Hydrogel-Based Biosensors. *Gels* **2022**, *8*, 768, doi:10.3390/gels8120768.
89. Herrmann, A.; Haag, R.; Schedler, U. Hydrogels and Their Role in Biosensing Applications. *Adv. Healthcare Mater.* **2021**, *10*, 2100062, doi:10.1002/adhm.202100062.
90. Onaciu, Munteanu; Moldovan; Moldovan; Berindan-Neagoe Hydrogels Based Drug Delivery Synthesis, Characterization and Administration. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 432, doi:10.3390/pharmaceutics11090432.
91. Holback, H.; Yeo, Y.; Park, K. Hydrogel Swelling Behavior and Its Biomedical Applications. In *Biomedical Hydrogels*; Elsevier, 2011; pp. 3–24 ISBN 978-1-84569-590-3.
92. Chamkouri, H. A Review of Hydrogels, Their Properties and Applications in Medicine. *AJBSR* **2021**, *11*, 485–493, doi:10.34297/AJBSR.2021.11.001682.
93. Chang, C.; Duan, B.; Cai, J.; Zhang, L. Superabsorbent Hydrogels Based on Cellulose for Smart Swelling and Controllable Delivery. *European Polymer Journal* **2010**, *46*, 92–100, doi:10.1016/j.eurpolymj.2009.04.033.
94. Uzun, M. A Review of Wound Management Materials. *JTEFT* **2018**, *4*, doi:10.15406/jteft.2018.04.00121.
95. Kanikireddy, V.; Varaprasad, K.; Jayaramudu, T.; Karthikeyan, C.; Sadiku, R. Carboxymethyl Cellulose-Based Materials for Infection Control and Wound Healing: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *164*, 963–975, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.160.
96. Bai, X.; Gao, M.; Syed, S.; Zhuang, J.; Xu, X.; Zhang, X.-Q. Bioactive Hydrogels for Bone Regeneration. *Bioactive Materials* **2018**, *3*, 401–417, doi:10.1016/j.bioactmat.2018.05.006.
97. Ganji, F.; Vasheghani-Farahani, S.; Vasheghani-Farahani, E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iranian Polymer Journal* **2010**, *5*, 375–398.
98. Yacob, N.; Hashim, K. Morphological Effect on Swelling Behaviour of Hydrogel.; Kuala Lumpur, Malaysia, 2014; pp. 153–159.
99. Hoti, G.; Caldera, F.; Ceccone, C.; Rubin Pedrazzo, A.; Anceschi, A.; Appleton, S.L.; Khazaei Monfared, Y.; Trotta, F. Effect of the Cross-Linking Density on the Swelling and Rheological Behavior of Ester-Bridged β -Cyclodextrin Nanosponges. *Materials* **2021**, *14*, 478, doi:10.3390/ma14030478.
100. Gupta, N.V.; Shivakumar, H.G. Investigation of Swelling Behavior and Mechanical Properties of a PH-Sensitive Superporous Hydrogel Composite. **2012**.
101. Colinet, I.; Dulong, V.; Mocanu, G.; Picton, L.; Le Cerf, D. New Amphiphilic and PH-Sensitive Hydrogel for Controlled Release of a Model Poorly Water-Soluble Drug. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *73*, 345–350, doi:10.1016/j.ejpb.2009.07.008.
102. Wang, Y.; He, G.; Li, Z.; Hua, J.; Wu, M.; Gong, J.; Zhang, J.; Ban, L.; Huang, L. Novel Biological Hydrogel: Swelling Behaviors Study in Salt Solutions with Different Ionic Valence Number. *Polymers* **2018**, *10*, 112, doi:10.3390/polym10020112.
103. Dulong, V.; Cerf, D.L.; Picton, L.; Muller, G. Carboxymethylpullulan Hydrogels with a Ionic and/or Amphiphilic Behavior: Swelling Properties and Entrapment of Cationic and/or Hydrophobic Molecules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, *274*, 163–169, doi:10.1016/j.colsurfa.2005.08.045.
104. Harsh, D.C.; Gehrke, S.H. Controlling the Swelling Characteristics of Temperature-Sensitive Cellulose Ether Hydrogels. *Journal of Controlled Release* **1991**, *17*, 175–185, doi:10.1016/0168-3659(91)90057-K.

105. FitzSimons, T.M.; Anslyn, E.V.; Rosales, A.M. Effect of PH on the Properties of Hydrogels Cross-Linked via Dynamic Thia-Michael Addition Bonds. *ACS Polym. Au* **2022**, *2*, 129–136, doi:10.1021/acspolymersau.1c00049.
106. Xiao, Y.; Friis, E.A.; Gehrke, S.H.; Detamore, M.S. Mechanical Testing of Hydrogels in Cartilage Tissue Engineering: Beyond the Compressive Modulus. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **2013**, *19*, 403–412, doi:10.1089/ten.teb.2012.0461.
107. Li, X.; Sun, Q.; Li, Q.; Kawazoe, N.; Chen, G. Functional Hydrogels With Tunable Structures and Properties for Tissue Engineering Applications. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 499, doi:10.3389/fchem.2018.00499.
108. Nafar Dastgerdi, J.; Koivisto, J.T.; Orell, O.; Rava, P.; Jokinen, J.; Kanerva, M.; Kellomäki, M. Comprehensive Characterisation of the Compressive Behaviour of Hydrogels Using a New Modelling Procedure and Redefining Compression Testing. *Materials Today Communications* **2021**, *28*, 102518, doi:10.1016/j.mtcomm.2021.102518.
109. Means, A.K.; Grunlan, M.A. Modern Strategies To Achieve Tissue-Mimetic, Mechanically Robust Hydrogels. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8*, 705–713, doi:10.1021/acsmacrolett.9b00276.
110. Pal, K.; Banthia, A.K.; Majumdar, D.K. Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications. *Designed Monomers and Polymers* **2009**, *12*, 197–220, doi:10.1163/156855509X436030.
111. Slaughter, B.V.; Khurshid, S.S.; Fisher, O.Z.; Khademhosseini, A.; Peppas, N.A. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3307–3329, doi:10.1002/adma.200802106.
112. Qu, H.; Fu, H.; Han, Z.; Sun, Y. Biomaterials for Bone Tissue Engineering Scaffolds: A Review. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 26252–26262, doi:10.1039/C9RA05214C.
113. Drury, J.L.; Mooney, D.J. Hydrogels for Tissue Engineering: Scaffold Design Variables and Applications. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337–4351, doi:10.1016/S0142-9612(03)00340-5.
114. Li, Y.; Yang, H.Y.; Lee, D.S. Biodegradable and Injectable Hydrogels in Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **2022**, *23*, 609–618, doi:10.1021/acs.biomac.1c01552.
115. Ahn, J.; Ryu, J.; Song, G.; Whang, M.; Kim, J. Network Structure and Enzymatic Degradation of Chitosan Hydrogels Determined by Crosslinking Methods. *Carbohydrate Polymers* **2019**, *217*, 160–167, doi:10.1016/j.carbpol.2019.04.055.
116. Sobczak, M. Enzyme-Responsive Hydrogels as Potential Drug Delivery Systems—State of Knowledge and Future Prospects. *IJMS* **2022**, *23*, 4421, doi:10.3390/ijms23084421.
117. Suzuki, N.; Kim, Y.-M.; Fujimoto, Z.; Momma, M.; Okuyama, M.; Mori, H.; Funane, K.; Kimura, A. Structural Elucidation of Dextran Degradation Mechanism by Streptococcus Mutans Dextranase Belonging to Glycoside Hydrolase Family 66. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 19916–19926, doi:10.1074/jbc.M112.342444.
118. Karlsson, J.; Momcilovic, D.; Wittgren, B.; Schülein, M.; Tjerneld, F.; Brinkmalm, G. Enzymatic Degradation of Carboxymethyl Cellulose Hydrolyzed by the Endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola Insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from *Trichoderma Reesei*: Enzymatic Degradation of Carboxymethyl Cellulose. *Biopolymers* **2002**, *63*, 32–40, doi:10.1002/bip.1060.
119. Annabi, N.; Nichol, J.W.; Zhong, X.; Ji, C.; Koshy, S.; Khademhosseini, A.; Dehghani, F. Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **2010**, *16*, 371–383, doi:10.1089/ten.teb.2009.0639.
120. Mays, T.J. A New Classification of Pore Sizes. In *Studies in Surface Science and Catalysis*; Elsevier, 2007; Vol. 160, pp. 57–62 ISBN 978-0-444-52022-7.
121. Serrano-Aroca, Á. Enhancement of Hydrogels' Properties for Biomedical Applications: Latest Achievements. In *Hydrogels*; Haider, S., Haider, A., Eds.; InTech, 2018 ISBN 978-1-78923-368-1.

122. Mandal, B.B.; Kundu, S.C. Cell Proliferation and Migration in Silk Fibroin 3D Scaffolds. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2956–2965, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.006.
123. Lien, S.-M.; Ko, L.-Y.; Huang, T.-J. Effect of Pore Size on ECM Secretion and Cell Growth in Gelatin Scaffold for Articular Cartilage Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia* **2009**, *5*, 670–679, doi:10.1016/j.actbio.2008.09.020.
124. Griffon, D.; Sedighi, M.; Schaeffer, D.; Eurell, J.; Johnson, A. Chitosan Scaffolds: Interconnective Pore Size and Cartilage Engineering. *Acta Biomaterialia* **2006**, *2*, 313–320, doi:10.1016/j.actbio.2005.12.007.
125. Xiang, C.; Zhang, X.; Zhang, J.; Chen, W.; Li, X.; Wei, X.; Li, P. A Porous Hydrogel with High Mechanical Strength and Biocompatibility for Bone Tissue Engineering. *JFB* **2022**, *13*, 140, doi:10.3390/jfb13030140.
126. Darpentigny, C.; Molina-Boisseau, S.; Nonglaton, G.; Bras, J.; Jean, B. Ice-Templated Freeze-Dried Cryogels from Tunicate Cellulose Nanocrystals with High Specific Surface Area and Anisotropic Morphological and Mechanical Properties. *Cellulose* **2020**, *27*, 233–247, doi:10.1007/s10570-019-02772-8.
127. Henderson, T.M.A.; Ladewig, K.; Haylock, D.N.; McLean, K.M.; O'Connor, A.J. Cryogels for Biomedical Applications. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 2682, doi:10.1039/c3tb20280a.
128. Darpentigny, C.; Nonglaton, G.; Bras, J.; Jean, B. Highly Absorbent Cellulose Nanofibrils Aerogels Prepared by Supercritical Drying. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *229*, 115560, doi:10.1016/j.carbpol.2019.115560.
129. Hossen, M.R.; Dadoo, N.; Holomakoff, D.G.; Co, A.; Gramlich, W.M.; Mason, M.D. Wet Stable and Mechanically Robust Cellulose Nanofibrils (CNF) Based Hydrogel. *Polymer* **2018**, *151*, 231–241, doi:10.1016/j.polymer.2018.07.016.
130. Memic, A.; Rezaeeyazdi, M.; Villard, P.; Rogers, Z.J.; Abudula, T.; Colombani, T.; Bencherif, S.A. Effect of Polymer Concentration on Autoclaved Cryogel Properties. *Macromol. Mater. Eng.* **2020**, *305*, 1900824, doi:10.1002/mame.201900824.
131. Pacelli, S.; Di Muzio, L.; Paolicelli, P.; Fortunati, V.; Petralito, S.; Trilli, J.; Casadei, M.A. Dextran-Polyethylene Glycol Cryogels as Spongy Scaffolds for Drug Delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2021**, *166*, 1292–1300, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.273.
132. Razavi, M.; Qiao, Y.; Thakor, A.S. Three-dimensional Cryogels for Biomedical Applications. *J Biomed Mater Res* **2019**, *107*, 2736–2755, doi:10.1002/jbm.a.36777.
133. Le, H.V.; Dulong, V.; Picton, L.; Le Cerf, D. Lyophilization for Formulation Optimization of Drug-Loaded Thermoresponsive Polyelectrolyte Complex Nanogels from Functionalized Hyaluronic Acid. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 929, doi:10.3390/pharmaceutics15030929.
134. Salleh, K.M.; Zakaria, S.; Gan, S.; Baharin, K.W.; Ibrahim, N.A.; Zamzamin, R. Interconnected Macropores Cryogel with Nano-Thin Crosslinked Network Regenerated Cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *148*, 11–19, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.240.
135. Li, J.; Wu, C.; Chu, P.K.; Gelinsky, M. 3D Printing of Hydrogels: Rational Design Strategies and Emerging Biomedical Applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2020**, *140*, 100543, doi:10.1016/j.mser.2020.100543.
136. Cruz-Medina, R.; Ayala-Hernández, D.A.; Vega-Rios, A.; López-Martínez, E.I.; Mendoza-Duarte, M.E.; Estrada-Monje, A.; Zaragoza-Contreras, E.A. Curing of Cellulose Hydrogels by UV Radiation for Mechanical Reinforcement. *Polymers* **2021**, *13*, 2342, doi:10.3390/polym13142342.
137. Anastasio, R.; Peerbooms, W.; Cardinaels, R.; van Breemen, L.C.A. Characterization of Ultraviolet-Cured Methacrylate Networks: From Photopolymerization to Ultimate Mechanical Properties. *Macromolecules* **2019**, *52*, 9220–9231, doi:10.1021/acs.macromol.9b01439.

138. Muir, V.G.; Burdick, J.A. Chemically Modified Biopolymers for the Formation of Biomedical Hydrogels. *Chem. Rev.* **2020**, acs.chemrev.0c00923, doi:10.1021/acs.chemrev.0c00923.
139. An, J.; Teoh, J.E.M.; Suntornnond, R.; Chua, C.K. Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues. *Engineering* **2015**, *1*, 261–268, doi:10.15302/J-ENG-2015061.
140. Huang, J.; Xiong, J.; Wang, D.; Zhang, J.; Yang, L.; Sun, S.; Liang, Y. 3D Bioprinting of Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Gels* **2021**, *7*, 144, doi:10.3390/gels7030144.
141. Remaggi, G.; Zaccarelli, A.; Elviri, L. 3D Printing Technologies in Biosensors Production: Recent Developments. *Chemosensors* **2022**, *10*, 65, doi:10.3390/chemosensors10020065.
142. Rengaraj, A.; Bosc, L.; Machillot, P.; McGuckin, C.; Milet, C.; Forraz, N.; Paliard, P.; Barbier, D.; Picart, C. Engineering of a Microscale Niche for Pancreatic Tumor Cells Using Bioactive Film Coatings Combined with 3D-Architected Scaffolds. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 13107–13121, doi:10.1021/acsami.2c01747.
143. Zhang, X.N.; Zheng, Q.; Wu, Z.L. Recent Advances in 3D Printing of Tough Hydrogels: A Review. *Composites Part B: Engineering* **2022**, *238*, 109895, doi:10.1016/j.compositesb.2022.109895.
144. Hull, C.W.; Gabriel, S. (54) APPARATUS FOR PRODUCTION OF THREE-DMENSONAL OBJECTS BY STEREO THOGRAPHY.
145. Tejada Jacob, G.; Passamai, V.E.; Katz, S.; Castro, G.R.; Alvarez, V. Hydrogels for Extrusion-Based Bioprinting: General Considerations. *Bioprinting* **2022**, *27*, e00212, doi:10.1016/j.bprint.2022.e00212.
146. Quan, H.; Zhang, T.; Xu, H.; Luo, S.; Nie, J.; Zhu, X. Photo-Curing 3D Printing Technique and Its Challenges. *Bioactive Materials* **2020**, *5*, 110–115, doi:10.1016/j.bioactmat.2019.12.003.
147. Melchels, F.P.W.; Feijen, J.; Grijpma, D.W. A Review on Stereolithography and Its Applications in Biomedical Engineering. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6121–6130, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.050.
148. Zhang, J.; Hu, Q.; Wang, S.; Tao, J.; Gou, M. Digital Light Processing Based Three-Dimensional Printing for Medical Applications. *Int J Bioprint* **2019**, *6*, 1, doi:10.18063/ijb.v6i1.242.
149. Jing, X.; Fu, H.; Yu, B.; Sun, M.; Wang, L. Two-Photon Polymerization for 3D Biomedical Scaffolds: Overview and Updates. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 994355, doi:10.3389/fbioe.2022.994355.
150. Pagac, M.; Hajnys, J.; Ma, Q.-P.; Jancar, L.; Jansa, J.; Stefek, P.; Mesicek, J. A Review of Vat Photopolymerization Technology: Materials, Applications, Challenges, and Future Trends of 3D Printing. *Polymers* **2021**, *13*, 598, doi:10.3390/polym13040598.
151. Tromayer, M.; Gruber, P.; Rosspeintner, A.; Ajami, A.; Husinsky, W.; Plasser, F.; González, L.; Vauthey, E.; Ovsianikov, A.; Liska, R. Wavelength-Optimized Two-Photon Polymerization Using Initiators Based on Multipolar Aminostyryl-1,3,5-Triazines. *Sci Rep* **2018**, *8*, 17273, doi:10.1038/s41598-018-35301-x.
152. Desert, A. Colloïdes Hybrides Silice/Polystyrène de Morphologie Contrôlée, Université Bordeaux 1: Bordeaux, 2011.
153. Yao, H.; Wang, J.; Mi, S. Photo Processing for Biomedical Hydrogels Design and Functionality: A Review. *Polymers* **2017**, *10*, 11, doi:10.3390/polym10010011.
154. Tomal, W.; Ortyl, J. Water-Soluble Photoinitiators in Biomedical Applications. *Polymers* **2020**, *12*, 1073, doi:10.3390/polym12051073.
155. Reza, A.T.; Nicoll, S.B. Characterization of Novel Photocrosslinked Carboxymethylcellulose Hydrogels for Encapsulation of Nucleus Pulposus Cells. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 179–186, doi:10.1016/j.actbio.2009.06.004.
156. Gupta, M.S.; Nicoll, S.B. Functional Nucleus Pulposus-like Matrix Assembly by Human Mesenchymal Stromal Cells Is Directed by Macromer Concentration in Photocrosslinked Carboxymethylcellulose Hydrogels. *Cell Tissue Res* **2014**, *358*, 527–539, doi:10.1007/s00441-014-1962-1.

157. Benedikt, S.; Wang, J.; Markovic, M.; Moszner, N.; Dietliker, K.; Ovsianikov, A.; Grützmacher, H.; Liska, R. Highly Efficient Water-Soluble Visible Light Photoinitiators. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2016**, *54*, 473–479, doi:10.1002/pola.27903.
158. Müller, G.; Zalibera, M.; Gescheidt, G.; Rosenthal, A.; Santiso-Quinones, G.; Dietliker, K.; Grützmacher, H. Simple One-Pot Syntheses of Water-Soluble Bis(Acyl)Phosphane Oxide Photoinitiators and Their Application in Surfactant-Free Emulsion Polymerization. *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36*, 553–557, doi:10.1002/marc.201400743.
159. Wloka, T.; Gottschaldt, M.; Schubert, U.S. From Light to Structure: Photo Initiators for Radical Two-Photon Polymerization. *Chemistry A European J* **2022**, *28*, doi:10.1002/chem.202104191.
160. Tromayer, M.; Dobos, A.; Gruber, P.; Ajami, A.; Dedic, R.; Ovsianikov, A.; Liska, R. A Biocompatible Diazosulfonate Initiator for Direct Encapsulation of Human Stem Cells via Two-Photon Polymerization. *Polym. Chem.* **2018**, *9*, 3108–3117, doi:10.1039/C8PY00278A.
161. Li, Z.; Torgersen, J.; Ajami, A.; Mühleder, S.; Qin, X.; Husinsky, W.; Holnthoner, W.; Ovsianikov, A.; Stampfl, J.; Liska, R. Initiation Efficiency and Cytotoxicity of Novel Water-Soluble Two-Photon Photoinitiators for Direct 3D Microfabrication of Hydrogels. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 15939, doi:10.1039/c3ra42918k.
162. Wloka, T.; Czich, S.; Chalupa-Gantner, F.; Sittig, M.; Dirauf, M.; Weber, C.; Gottschaldt, M.; Liefeth, K.; Ovsianikov, A.; Dietzek-Ivanšić, B.; et al. New Water-Soluble Photo-Initiators for Two-Photon Polymerization Based on Benzylidene Cyclopentanones. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2023**, *442*, 114743, doi:10.1016/j.jphotochem.2023.114743.
163. Morgen, T.O.; Baur, M.; Göttker-Schnetmann, I.; Mecking, S. Photodegradable Branched Polyethylenes from Carbon Monoxide Copolymerization under Benign Conditions. *Nat Commun* **2020**, *11*, 3693, doi:10.1038/s41467-020-17542-5.
164. Yoshii, E. Cytotoxic Effects of Acrylates and Methacrylates: Relationships of Monomer Structures and Cytotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *37*, 517–524, doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19971215)37:4<517::AID-JBM10>3.0.CO;2-5.
165. Hoyle, C.E.; Bowman, C.N. Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 1540–1573, doi:10.1002/anie.200903924.
166. Northrop, B.; N. Coffey, R. Thiol–Ene Click Chemistry: Computational and Kinetic Analysis of the Influence of Alkene Functionality. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *33*, 13804–13817, doi:10.1021/ja305441d.
167. Lin, C.-C.; Ki, C.S.; Shih, H. Thiol-Norbornene Photoclick Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, n/a-n/a, doi:10.1002/app.41563.
168. Azagarsamy, M.A.; Anseth, K.S. Bioorthogonal Click Chemistry: An Indispensable Tool to Create Multifaceted Cell Culture Scaffolds. *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 5–9, doi:10.1021/mz300585q.
169. Yu, C.; Schimelman, J.; Wang, P.; Miller, K.L.; Ma, X.; You, S.; Guan, J.; Sun, B.; Zhu, W.; Chen, S. Photopolymerizable Biomaterials and Light-Based 3D Printing Strategies for Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 10695–10743, doi:10.1021/acs.chemrev.9b00810.
170. Gramlich, W.M.; Kim, I.L.; Burdick, J.A. Synthesis and Orthogonal Photopatterning of Hyaluronic Acid Hydrogels with Thiol-Norbornene Chemistry. *Biomaterials* **2013**, *34*, 9803–9811, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.08.089.
171. Pirman, T.; Ocepek, M.; Likozar, B. Radical Polymerization of Acrylates, Methacrylates, and Styrene: Biobased Approaches, Mechanism, Kinetics, Secondary Reactions, and Modeling. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2021**, *60*, 9347–9367, doi:10.1021/acs.iecr.1c01649.

172. Holmes, P.F.; Bohrer, M.; Kohn, J. Exploration of Polymethacrylate Structure–Property Correlations: Advances towards Combinatorial and High-Throughput Methods for Biomaterials Discovery. *Progress in Polymer Science* **2008**, *33*, 787–796, doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.05.002.
173. Przesławski, G.; Szcześniak, K.; Gajewski, P.; Marcinkowska, A. Influence of Initiator Concentration on the Polymerization Course of Methacrylate Bone Cement. *Polymers* **2022**, *14*, 5005, doi:10.3390/polym14225005.
174. Shih, H.; Lin, C.-C. Cross-Linking and Degradation of Step-Growth Hydrogels Formed by Thiol–Ene Photoclick Chemistry. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2003–2012, doi:10.1021/bm300752j.
175. Ji, S.; Abaci, A.; Morrison, T.; Gramlich, W.M.; Guvendiren, M. Novel Bioinks from UV-Responsive Norbornene-Functionalized Carboxymethyl Cellulose Macromers. *Bioprinting* **2020**, *18*, e00083, doi:10.1016/j.bprint.2020.e00083.
176. McOscar, T.V.C.; Gramlich, W.M. Hydrogels from Norbornene-Functionalized Carboxymethyl Cellulose Using a UV-Initiated Thiol-Ene Click Reaction. *Cellulose* **2018**, *25*, 6531–6545, doi:10.1007/s10570-018-2015-9.
177. Leonards, H.; Engelhardt, S.; Hoffmann, A.; Pongratz, L.; Schriever, S.; Bläsius, J.; Wehner, M.; Gillner, A. Advantages and Drawbacks of Thiol-Ene Based Resins for 3D-Printing.; Helvajian, H., Piqué, A., Wegener, M., Gu, B., Eds.; San Francisco, California, United States, March 16 2015; p. 93530F.
178. Kumar, R.; Kumar, M.; Chohan, J.S. The Role of Additive Manufacturing for Biomedical Applications: A Critical Review. *Journal of Manufacturing Processes* **2021**, *64*, 828–850, doi:10.1016/j.jmapro.2021.02.022.
179. Tamay, D.G.; Dursun Usal, T.; Alagoz, A.S.; Yucel, D.; Hasirci, N.; Hasirci, V. 3D and 4D Printing of Polymers for Tissue Engineering Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, 164, doi:10.3389/fbioe.2019.00164.
180. Cordeiro, A.S.; Tekko, I.A.; Jomaa, M.H.; Vora, L.; McAlister, E.; Volpe-Zanutto, F.; Nethery, M.; Baine, P.T.; Mitchell, N.; McNeill, D.W.; et al. Two-Photon Polymerisation 3D Printing of Microneedle Array Templates with Versatile Designs: Application in the Development of Polymeric Drug Delivery Systems. *Pharm Res* **2020**, *37*, 174, doi:10.1007/s11095-020-02887-9.
181. Brossier, T.; Volpi, G.; Vasquez-Villegas, J.; Petitjean, N.; Guillaume, O.; Lapinte, V.; Blanquer, S. Photoprintable Gelatin- Graft -Poly(Trimethylene Carbonate) by Stereolithography for Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* **2021**, *22*, 3873–3883, doi:10.1021/acs.biomac.1c00687.
182. Kufelt, O.; El-Tamer, A.; Sehring, C.; Schlie-Wolter, S.; Chichkov, B.N. Hyaluronic Acid Based Materials for Scaffolding via Two-Photon Polymerization. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 650–659, doi:10.1021/bm401712q.
183. Kufelt, O.; El-Tamer, A.; Sehring, C.; Meißner, M.; Schlie-Wolter, S.; Chichkov, B.N. Water-Soluble Photopolymerizable Chitosan Hydrogels for Biofabrication via Two-Photon Polymerization. *Acta Biomaterialia* **2015**, *18*, 186–195, doi:10.1016/j.actbio.2015.02.025.
184. Galarraga, J.H.; Dhand, A.P.; Enzmann, B.P.; Burdick, J.A. Synthesis, Characterization, and Digital Light Processing of a Hydrolytically Degradable Hyaluronic Acid Hydrogel. *Biomacromolecules* **2023**, *24*, 413–425, doi:10.1021/acs.biomac.2c01218.
185. Feng, Z.; Li, J.; Zhou, D.; Song, H.; Lv, J.; Bai, W. A Novel Photocurable Pullulan-Based Bioink for Digital Light Processing 3D Printing. *Int J Bioprint* **2022**, *9*, doi:10.18063/ijb.v9i2.657.
186. Shen, Y.; Tang, H.; Huang, X.; Hang, R.; Zhang, X.; Wang, Y.; Yao, X. DLP Printing Photocurable Chitosan to Build Bio-Constructs for Tissue Engineering. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *235*, 115970, doi:10.1016/j.carbpol.2020.115970.
187. Mo, X.; Ouyang, L.; Xiong, Z.; Zhang, T. Advances in Digital Light Processing of Hydrogels. *Biomed. Mater.* **2022**, *17*, 042002, doi:10.1088/1748-605X/ac6b04.

188. Bom, S.; Ribeiro, R.; Ribeiro, H.M.; Santos, C.; Marto, J. On the Progress of Hydrogel-Based 3D Printing: Correlating Rheological Properties with Printing Behaviour. *International Journal of Pharmaceutics* **2022**, *615*, 121506, doi:10.1016/j.ijpharm.2022.121506.
189. Díaz-Montes, E. Polysaccharides: Sources, Characteristics, Properties, and Their Application in Biodegradable Films. *Polysaccharides* **2022**, *3*, 480–501, doi:10.3390/polysaccharides3030029.
190. Melilli, G.; Carmagnola, I.; Tonda-Turo, C.; Pirri, F.; Ciardelli, G.; Sangermano, M.; Hakkarainen, M.; Chiappone, A. DLP 3D Printing Meets Lignocellulosic Biopolymers: Carboxymethyl Cellulose Inks for 3D Biocompatible Hydrogels. *Polymers* **2020**, *12*, 1655, doi:10.3390/polym12081655.
191. Dadoo, N.; Landry, S.B.; Bomar, J.D.; Gramlich, W.M. Synthesis and Spatiotemporal Modification of Biocompatible and Stimuli-Responsive Carboxymethyl Cellulose Hydrogels Using Thiol-Norbornene Chemistry. *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 1700107, doi:10.1002/mabi.201700107.
192. Kono, H. Characterization and Properties of Carboxymethyl Cellulose Hydrogels Crosslinked by Polyethylene Glycol. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *106*, 84–93, doi:10.1016/j.carbpol.2014.02.020.
193. Lawal, O.S.; Yoshimura, M.; Fukae, R.; Nishinari, K. Microporous Hydrogels of Cellulose Ether Cross-Linked with Di- or Polyfunctional Glycidyl Ether Made for the Delivery of Bioactive Substances. *Colloid Polym Sci* **2011**, *289*, 1261–1272, doi:10.1007/s00396-011-2458-0.
194. Jeong, D.; Kim, C.; Kim, Y.; Jung, S. Dual Crosslinked Carboxymethyl Cellulose/Polyacrylamide Interpenetrating Hydrogels with Highly Enhanced Mechanical Strength and Superabsorbent Properties. *European Polymer Journal* **2020**, *127*, 109586, doi:10.1016/j.eurpolymj.2020.109586.
195. Ayouch, I.; Kassem, I.; Kassab, Z.; Barrak, I.; Barhoun, A.; Jacquemin, J.; Draoui, K.; Achaby, M.E. Crosslinked Carboxymethyl Cellulose-Hydroxyethyl Cellulose Hydrogel Films for Adsorption of Cadmium and Methylene Blue from Aqueous Solutions. *Surfaces and Interfaces* **2021**, *24*, 101124, doi:10.1016/j.surfin.2021.101124.
196. Lima, G.F.; Souza, A.G.; Rosa, D. dos S. Nanocellulose as Reinforcement in Carboxymethylcellulose Superabsorbent Nanocomposite Hydrogels. *Macromol. Symp.* **2020**, *394*, 2000126, doi:10.1002/masy.202000126.
197. Capanema, N.S.V.; Mansur, A.A.P.; de Jesus, A.C.; Carvalho, S.M.; de Oliveira, L.C.; Mansur, H.S. Superabsorbent Crosslinked Carboxymethyl Cellulose-PEG Hydrogels for Potential Wound Dressing Applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *106*, 1218–1234, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.124.
198. Ogushi, Y.; Sakai, S.; Kawakami, K. Phenolic Hydroxy Groups Incorporated for the Peroxidase-Catalyzed Gelation of a Carboxymethylcellulose Support: Cellular Adhesion and Proliferation. *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 262–267, doi:10.1002/mabi.200800263.
199. Zhong, Y.; Wang, J.; Yuan, Z.; Wang, Y.; Xi, Z.; Li, L.; Liu, Z.; Guo, X. A Mussel-Inspired Carboxymethyl Cellulose Hydrogel with Enhanced Adhesiveness through Enzymatic Crosslinking. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, *179*, 462–469, doi:10.1016/j.colsurfb.2019.03.044.
200. Feura, E.S.; Yang, L.; Schoenfisch, M.H. Antibacterial Activity of Nitric Oxide-releasing Carboxymethylcellulose against Periodontal Pathogens. *J Biomed Mater Res* **2021**, *109*, 713–721, doi:10.1002/jbm.a.37056.
201. Pettignano, A.; Charlot, A.; Fleury, E. Carboxyl-Functionalized Derivatives of Carboxymethyl Cellulose: Towards Advanced Biomedical Applications. *Polymer Reviews* **2019**, *59*, 510–560, doi:10.1080/15583724.2019.1579226.
202. Prasad, A.S.; Wilson, J.; Thomas, L.V. Designer Injectable Matrices of Photocrosslinkable Carboxymethyl Cellulose Methacrylate Based Hydrogels as Cell Carriers for Gel Type Autologous Chondrocyte Implantation (GACI). *International Journal of Biological Macromolecules* **2023**, *224*, 465–482, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.137.

203. Pal, K.; Banthia, A.K.; Majumdar, D.K. Development of Carboxymethyl Cellulose Acrylate for Various Biomedical Applications. *Biomed. Mater.* **2006**, *1*, 85–91, doi:10.1088/1748-6041/1/2/006.
204. Varma, D.M.; Gold, G.T.; Taub, P.J.; Nicoll, S.B. Injectable Carboxymethylcellulose Hydrogels for Soft Tissue Filler Applications. *Acta Biomaterialia* **2014**, *10*, 4996–5004, doi:10.1016/j.actbio.2014.08.013.
205. Reeves, R.; Ribeiro, A.; Lombardo, L.; Boyer, R.; Leach, J.B. Synthesis and Characterization of Carboxymethylcellulose-Methacrylate Hydrogel Cell Scaffolds. *Polymers* **2010**, *2*, 252–264, doi:10.3390/polym2030252.
206. Shi, L. Bioactivities, Isolation and Purification Methods of Polysaccharides from Natural Products: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *92*, 37–48, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100.
207. Huang, Y.-C.; Liu, Z.-H.; Kuo, C.-Y.; Chen, J.-P. Photo-Crosslinked Hyaluronic Acid/Carboxymethyl Cellulose Composite Hydrogel as a Dural Substitute to Prevent Post-Surgical Adhesion. *IJMS* **2022**, *23*, 6177, doi:10.3390/ijms23116177.
208. Lin, O.H.; Kumar, R.N.; Rozman, H.D.; Mohd. Noor, Mohd.A. Grafting of Sodium Carboxymethylcellulose (CMC) with Glycidyl Methacrylate and Development of UV Curable Coatings from CMC-g-GMA Induced by Cationic Photoinitiators. *Carbohydrate Polymers* **2005**, *59*, 57–69, doi:10.1016/j.carbpol.2004.08.027.
209. Barakat, A.; Kamoun, E.A.; EL-Moslami, S.H.; Ghazy, M.B.; Fahmy, A. Photo-Curable Carboxymethylcellulose Composite Hydrogel as a Promising Biomaterial for Biomedical Applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **2022**, *207*, 1011–1021, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.03.201.
210. Zhang, J.; Huang, D.; Liu, S.; Yang, Z.; Dong, X.; Zhang, H.; Huang, W.; Zhou, S.; Wei, Y.; Hua, W.; et al. Water Soluble Photocurable Carboxymethyl Cellulose-based Bioactive Hydrogels for Digital Light Processing. *J of Applied Polymer Sci* **2022**, 52155, doi:10.1002/app.52155.
211. Qian, H.; Wang, X.; Yuan, K.; Xie, C.; Wu, W.; Jiang, X.; Hu, L. Delivery of Doxorubicin in Vitro and in Vivo Using Bio-Reductive Cellulose Nanogels. *Biomater. Sci.* **2014**, *2*, 220–232, doi:10.1039/C3BM60176E.
212. Lin, H.A.; Gupta, M.S.; Varma, D.M.; Gilchrist, M.L.; Nicoll, S.B. Lower Crosslinking Density Enhances Functional Nucleus Pulposus-like Matrix Elaboration by Human Mesenchymal Stem Cells in Carboxymethylcellulose Hydrogels: Crosslinking Density Impacts HMSC Chondrogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.* **2016**, *104*, 165–177, doi:10.1002/jbm.a.35552.
213. Dutta, S.; Samanta, P.; Dhara, D. Temperature, PH and Redox Responsive Cellulose Based Hydrogels for Protein Delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *87*, 92–100, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.042.
214. Cafiso, D.; Septevani, A.A.; Noè, C.; Schiller, T.; Pirri, C.F.; Roppolo, I.; Chiappone, A. 3D Printing of Fully Cellulose-Based Hydrogels by Digital Light Processing. *Sustainable Materials and Technologies* **2022**, *32*, e00444, doi:10.1016/j.susmat.2022.e00444.
215. Manojlovic, D.; Dramićanin, M.D.; Miletic, V.; Mitić-Ćulafić, D.; Jovanović, B.; Nikolić, B. Cytotoxicity and Genotoxicity of a Low-Shrinkage Monomer and Monoacylphosphine Oxide Photoinitiator: Comparative Analyses of Individual Toxicity and Combination Effects in Mixtures. *Dental Materials* **2017**, *33*, 454–466, doi:10.1016/j.dental.2017.02.002.
216. Kamoun, E.A.; Winkel, A.; Eisenburger, M.; Menzel, H. Carboxylated Camphorquinone as Visible-Light Photoinitiator for Biomedical Application: Synthesis, Characterization, and Application. *Arabian Journal of Chemistry* **2016**, *9*, 745–754, doi:10.1016/j.arabjc.2014.03.008.
217. Yang, J.; Han, C.; Xu, F.; Sun, R. Simple Approach to Reinforce Hydrogels with Cellulose Nanocrystals. *Nanoscale* **2014**, *6*, 5934, doi:10.1039/c4nr01214c.

218. Abbasi Moud, A. *Mechanically Tuned Cellulose Nanocrystal (CNC)-Based Bio-Aimed Hydrogels: Are Hydrogel Meeting Bio-Based Application Demands?*; PHYSICAL SCIENCES, 2022;
219. Hasan, M.J.; Johnson, A.E.; Ureña-Benavides, E.E. “Greener” Chemical Modification of Cellulose Nanocrystals via Oxa-Michael Addition with N-Benzylmaleimide. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* **2021**, 4, 100081, doi:10.1016/j.crgsc.2021.100081.
220. Lin, N.; Dufresne, A. Surface Chemistry, Morphological Analysis and Properties of Cellulose Nanocrystals with Graded Sulfation Degrees. *Nanoscale* **2014**, 6, 5384–5393, doi:10.1039/C3NR06761K.
221. Du, H.; Liu, W.; Zhang, M.; Si, C.; Zhang, X.; Li, B. Cellulose Nanocrystals and Cellulose Nanofibrils Based Hydrogels for Biomedical Applications. *Carbohydrate Polymers* **2019**, 209, 130–144, doi:10.1016/j.carbpol.2019.01.020.
222. He, Y.; Li, H.; Fei, X.; Peng, L. Carboxymethyl Cellulose/Cellulose Nanocrystals Immobilized Silver Nanoparticles as an Effective Coating to Improve Barrier and Antibacterial Properties of Paper for Food Packaging Applications. *Carbohydrate Polymers* **2021**, 252, 117156, doi:10.1016/j.carbpol.2020.117156.
223. Fernández-Santos, J.; Valls, C.; Cusola, O.; Roncero, M.B. Composites of Cellulose Nanocrystals in Combination with Either Cellulose Nanofibril or Carboxymethylcellulose as Functional Packaging Films. *International Journal of Biological Macromolecules* **2022**, 211, 218–229, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.05.049.
224. Oun, A.A.; Rhim, J.-W. Characterization of Carboxymethyl Cellulose-Based Nanocomposite Films Reinforced with Oxidized Nanocellulose Isolated Using Ammonium Persulfate Method. *Carbohydrate Polymers* **2017**, 174, 484–492, doi:10.1016/j.carbpol.2017.06.121.
225. da Fonsêca, J.H.L.; d’Ávila, M.A. Rheological Behavior of Carboxymethylcellulose and Cellulose Nanocrystal Aqueous Dispersions. *Rheol Acta* **2021**, 60, 497–509, doi:10.1007/s00397-021-01292-2.
226. Hassan, M.L.; Zeid, R.E.A.; Fadel, S.M.; Sakhawy, M.E.; Khiari, R. Cellulose Nanocrystals and Carboxymethyl Cellulose from Olive Stones and Their Use to Improve Paper Sheets Properties. *IJNP* **2014**, 7, 261, doi:10.1504/IJNP.2014.067613.
227. Fein, K.; Bousfield, D.W.; Gramlich, W.M. Thiol-Norbornene Reactions to Improve Natural Rubber Dispersion in Cellulose Nanofiber Coatings. *Carbohydrate Polymers* **2020**, 250, 117001, doi:10.1016/j.carbpol.2020.117001.
228. Fein, K.; Bousfield, D.W.; Gramlich, W.M. The Influence of Versatile Thiol-Norbornene Modifications to Cellulose Nanofibers on Rheology and Film Properties. *Carbohydrate Polymers* **2020**, 230, 115672, doi:10.1016/j.carbpol.2019.115672.
229. Dadoo, N.; Zeitler, S.; McGovern, A.D.; Gramlich, W.M. Waterborne Functionalization of Cellulose Nanofibrils with Norbornenes and Subsequent Thiol-Norbornene Gelation to Create Robust Hydrogels. *Cellulose* **2021**, 28, 1339–1353, doi:10.1007/s10570-020-03582-z.
230. Wang, Q.; Xu, W.; Koppolu, R.; van Bochove, B.; Seppälä, J.; Hupa, L.; Willför, S.; Xu, C.; Wang, X. Injectable Thiol-Ene Hydrogel of Galactoglucomannan and Cellulose Nanocrystals in Delivery of Therapeutic Inorganic Ions with Embedded Bioactive Glass Nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* **2022**, 276, 118780, doi:10.1016/j.carbpol.2021.118780.
231. Nielsen, L.J.; Eyley, S.; Thielemans, W.; Aylott, J.W. Dual Fluorescent Labelling of Cellulose Nanocrystals for PH Sensing. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 8929, doi:10.1039/c0cc03470c.
232. Wang, B.; Liu, J.; Chen, K.; Wang, Y.; Shao, Z. Three-Dimensional Printing of Methacrylic Grafted Cellulose Nanocrystal-Reinforced Nanocomposites With Improved Properties. *Polym Eng Sci* **2020**, 60, 782–792, doi:10.1002/pen.25336.
233. Wang, J.; Siqueira, G.; Müller, G.; Rentsch, D.; Huch, A.; Tingaut, P.; Levalois-Grützmacher, J.; Grützmacher, H. Synthesis of New Bis(Acyl)Phosphane Oxide Photoinitiators for the Surface Functionalization of Cellulose Nanocrystals. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 2823–2826, doi:10.1039/C5CC09760F.

234. Siqueira, G.; Kokkinis, D.; Libanori, R.; Hausmann, M.K.; Gladman, A.S.; Neels, A.; Tingaut, P.; Zimmermann, T.; Lewis, J.A.; Studart, A.R. Cellulose Nanocrystal Inks for 3D Printing of Textured Cellular Architectures. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, 1604619, doi:10.1002/adfm.201604619.
235. Bai, H.; Li, Y.; Zhang, S.; Ma, P.; Dong, W. Photo-crosslinkable Poly (Vinyl Alcohol)/Nanocrystalline Cellulose Composites with Controllable Performance and Exceptional Water Vapor Barrier Property for Packaging Application. *Cellulose* **2022**, *29*, 7721–7734, doi:https://doi.org/10.1007/s10570-022-04760-x.
236. Ma, Q.; Mohawk, D.; Jahani, B.; Wang, X.; Chen, Y.; Mahoney, A.; Zhu, J.Y.; Jiang, L. UV-Curable Cellulose Nanofiber-Reinforced Soy Protein Resins for 3D Printing and Conventional Molding. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, *2*, 4666–4676, doi:10.1021/acsapm.0c00717.
237. Toxicity of Tartrazine: Scientific Review Report. **2014**.
238. Silva, J. da; Fracacio, R. Toxicological and Ecotoxicological Aspects of Tartrazine Yellow Food Dye: A Literature Review. *Rev. Bras. Ciênc. Ambient. (Online)* **2020**, *56*, 137–151, doi:10.5327/Z21769478746.
239. Amchova, P.; Kotolova, H.; Ruda-Kucerova, J. Health Safety Issues of Synthetic Food Colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2015**, *73*, 914–922, doi:10.1016/j.yrtph.2015.09.026.
240. Kline, E.K. Toxicity of Brilliant Green for Certain Bacteria. *Am J Public Health Nations Health* **1935**, *25*, 314–318, doi:10.2105/AJPH.25.3.314.
241. Oplatowska, M.; Donnelly, R.F.; Majithiya, R.J.; Glenn Kennedy, D.; Elliott, C.T. The Potential for Human Exposure, Direct and Indirect, to the Suspected Carcinogenic Triphenylmethane Dye Brilliant Green from Green Paper Towels. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, *49*, 1870–1876, doi:10.1016/j.fct.2011.05.005.

CHAPITRE II.

Partie expérimentale

II.1. INTRODUCTION

Ce chapitre présente en détail le matériel expérimental utilisé et les méthodes mises en œuvre dans le cadre de ces travaux de thèse. Ils ont été choisis en fonction de leur pertinence et de leur adéquation avec les objectifs du projet. Leur description détaillée doit permettre la reproduction des résultats obtenus. La première section décrit les produits utilisés et la partie méthodes décrit les différentes étapes expérimentales, les protocoles de préparation des échantillons et de mesures, ainsi que toutes les autres manipulations réalisées pendant l'étude. Les méthodes utilisées dans ce projet sont basées sur des protocoles établis dans la littérature et des détails plus précis sont fournis pour celles développées spécifiquement pour cette étude. Cette section décrit également des contrôles expérimentaux appropriés mis en place pour minimiser les erreurs et assurer la reproductibilité des résultats.

II.2. MATIÈRES PREMIÈRES

La CMC sous forme de sel de sodium (NaCMC, référence BLANOSE 7LP EP, Ashland, France) avec une masse molaire moyenne en masse (M_w) de 90,5 kg/mol et un degré de substitution (DS) de 0,7, a été utilisée telle quelle. L'anhydride méthacrylique (AM) contenant 2 000 ppm de topanol A en tant qu'inhibiteur de radicaux, le 2-hydroxy-4'-(2-hydroxyéthoxy)-2-méthylpropiophénone (I2959), le lithium phenyl-2,4,6-triméthylbenzoylphosphinate (LAP), les pastilles d'hydroxyde de sodium anhydre (NaOH), l'oxyde de deutérium (D_2O), les cellulases (trichoderma ressei), la solution tamponnée au sel phosphaté pH = 7,4 (PBS), l'acide sulfurique 98% et l'éthanol 96% ont été achetés chez Sigma Aldrich (France). Les fibres de coton (linters) ont été achetés auprès de Buckeye Cellulose Corporation (États-Unis).

II.3. SYNTHÈSES, FORMULATIONS ET MISE EN FORME D’HYDROGELS ET DE CRYOGELS

II.3.1. SYNTHÈSES

II.3.1.1. Méthacrylation de la carboxyméthylcellulose

Le protocole de méthacrylation de la CMC a été adapté de ce qui est rapporté dans la littérature [1–11]. La NaCMC (90 kg/mol) est d’abord solubilisée à 2, 4 ou 6 %m dans de l’eau déionisée à température ambiante ou à 50 °C sous agitation constante pendant 12 h. Ensuite, l’anhydride méthacrylique (AM) est ajouté lentement (environ 15 minutes) à la solution de CMC. Différents rapports molaires entre les groupes hydroxyles de la CMC et l’AM ont été utilisés, à savoir 1,24 ; 2,48 ; 3,72 ; 4,96 ; 6,18 et 7,42. L’homogénéisation des réactifs pendant la réaction est réalisée par agitation magnétique à 700 ou 1400 tr/min ou par agitation mécanique avec une vitesse évolutive atteignant rapidement 2 000 tr/min. Dans ce dernier cas, deux types de mobiles d’agitation ont été testés afin d’étudier l’influence de la méthode d’agitation sur la réaction : une pâle droite (Velp Scientifica, Italie) (**Figure II-1a**) et une pâle ancre (ThermoFisher, France) (**Figure II-1b**). La réaction est menée pendant 24 heures à température ambiante. Quatre synthèses ont été réalisées à 0 °C pour comparaison. Le pH du milieu est constamment ajusté avec une solution de NaOH à 10 ou 3 M pendant la réaction de manière à être le plus proche possible de 8 et jamais inférieur. Pour étudier l’effet du pH, la réaction a également été réalisée en ajustant le pH à 12 et sans ajustement du pH. Dans certaines conditions, des prélèvements à 1, 3, 5 et 7 heures de réaction ont été réalisés sur un petit volume pour étudier la cinétique. Lors des réactions à petite échelle (« lab-scale ») impliquant une agitation magnétique, le volume de synthèse correspond à 100 ml (100 g). Dans le cas d’une agitation mécanique, le volume correspond à 2,5 L (2,5 kg, « scale-up ») (**Figure II-1c**).

Les milieux de synthèses sont purifiés pendant une semaine par dialyse dans l’eau déionisée à l’aide d’une membrane d’esters mixtes de cellulose (MWCO = 12-14 kg/mol ; Roth, Allemagne). Enfin, la mCMC est lyophilisée pendant cinq jours avec un lyophilisateur CHRIST Beta 2-8 LS plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Allemagne).

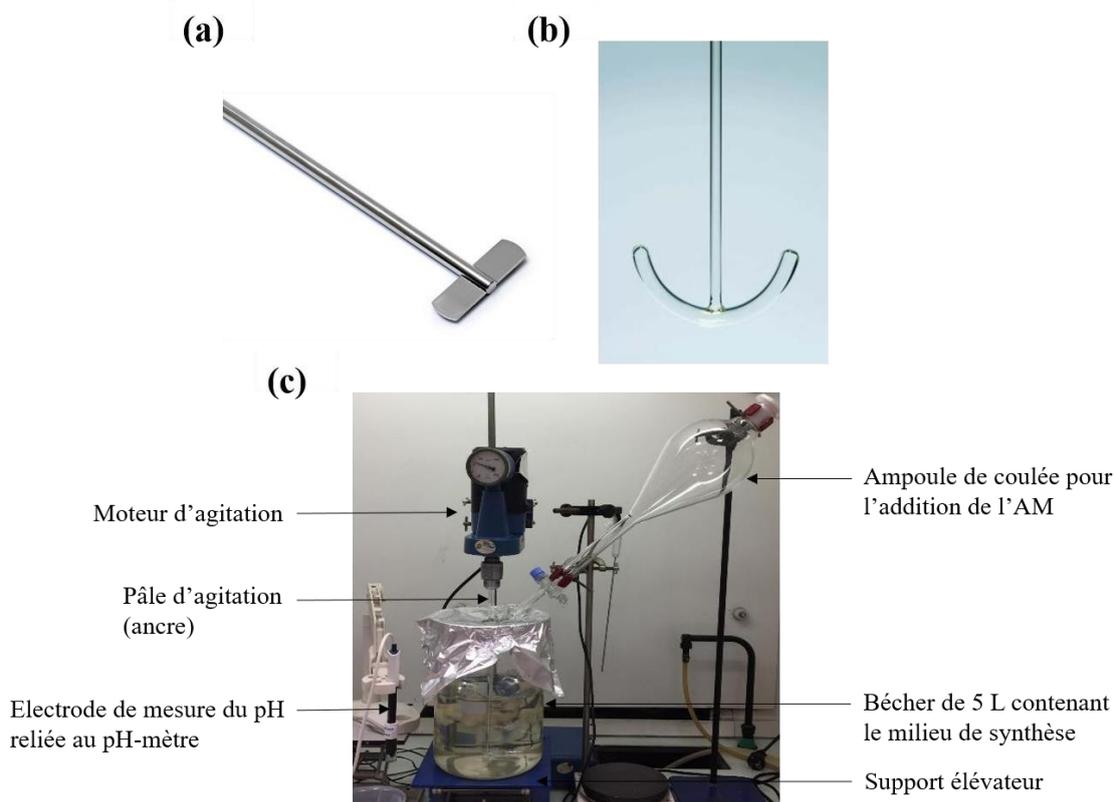


Figure II-1 : (a) pâle droite (b) pâle ancre et (c) montage du « scale-up » pour la méthacrylation de la CMC. Lors de la réaction, l'électrode de mesure du pH est plongée dans le milieu de synthèse.

II.3.1.2. Préparation des nanocristaux de cellulose

Le protocole de production des NCC est basé sur le travail de Revol *et al.* [12]. Des feuilles de linters (fibres courtes) de coton (60 g) sont coupées en petits morceaux et mélangées dans un blender pour augmenter la surface spécifique. L'hydrolyse acide est effectuée dans de l'acide sulfurique à 64 %m (840 mL) à 60 °C pendant 30 min sous agitation mécanique. L'hydrolyse est arrêtée en ajoutant un volume de glace représentant 50 % de celui de la solution acide (420 ml). L'acide sulfurique est éliminé par centrifugation à 20 300 g et 4 °C, pendant 30 min en utilisant une centrifugeuse Sigma 6-16KS (SIGMA, Allemagne). Après redispersion du culot contenant les NCC dans de l'eau déionisée pendant 30 min, une nouvelle centrifugation est effectuée pendant 15 min à 20 300 g et 20 °C. Cette séquence est répétée 3 fois. Le culot résultant est redispersé dans 2 L d'eau et purifié pendant 10 jours par dialyse contre de l'eau déionisée à l'aide d'une membrane d'esters mixtes de cellulose (MWCO = 12-14 kg/mol ; Roth, Allemagne) jusqu'à ce que la conductivité du bain d'eau soit égale à celle de l'eau déionisée. La suspension est ensuite soniquée par lots de 200 mL à l'aide d'un sonificateur numérique Branson 450 (Emerson, France) pendant 5 min en utilisant un mode pulsé pour limiter l'augmentation de température. De plus, pendant la sonication, le bécher contenant la dispersion est placé dans un bain de glace pour éviter toute augmentation de température. La suspension est ensuite filtrée

à travers des membranes de nitrate de cellulose Whatman de 5 µm puis de 1 µm avec un équipement de filtration Sartorius pour éliminer les gros agrégats. La concentration de NCC dans la suspension aqueuse finale (2,3 %m) est mesurée à partir de l'extrait sec.

II.3.1.3. Méthacrylation des nanocristaux de cellulose

Comme pour la méthacrylation de la CMC, l'anhydride méthacrylique est ajouté lentement à une dispersion de NCC à 2 %m dans de l'eau déionisée. Des rapports molaires de 3,0, 6,0, 12 ou 24 entre les groupes hydroxyles de surface des NCC et l'AM (AM/OH_{surf}) ont été utilisés. Le nombre de groupements hydroxyles en surface (N_{OH}) des NCC est calculé sur la base de l'**Equation II-1** donnée par Eyley et Thielemans [13,14].

$$N_{OH} = \frac{n_1 + n_2}{\rho N_A L_1 L_2 c} \left(\frac{L_1 + L_2}{d_{(110)}} + \frac{L_1 + L_2}{d_{(1\bar{1}0)}} \right) + 2(\rho N_A L_3 d_{(110)} d_{(1\bar{1}0)})^{-1} \quad (\text{Equation II-1})$$

Où n_1 (=2) et n_2 (=4) respectivement le nombre de groupes hydroxyles primaires et secondaires des plans cristallins (110) (ou $(1\bar{1}0)$) dans la cellule unitaire. ρ est la densité de la cellulose cristalline (1,605 g/cm³), N_A le nombre d'Avogadro (6,022.10²³ mol⁻¹), c la dimension de la cellule unitaire (1,038 nm), L_1 la largeur (22 nm), L_2 la hauteur (6 nm) et L_3 la longueur (150 nm) des nanocristaux de coton, dimensions moyennes obtenues à partir des données de diffusion des neutrons aux petits angles rapportées par Azzam *et al.* [15]. Les distances interplans $d_{(110)}$ et $d_{(1\bar{1}0)}$ sont respectivement de 0,53 et 0,59 nm. Le calcul donne $N_{OH} = 4,59 \times 10^{-3}$ mol/g [13].

La réaction est menée pendant 24 h à température ambiante sous agitation magnétique. Le pH est constamment ajusté au plus proche de 8 avec une solution de NaOH à 10 N pendant la réaction. Après celle-ci, les mNCC sont précipités dans 200 mL d'éthanol, centrifugés à 16 200 g à 20 °C pendant 15 min en utilisant une centrifugeuse Sigma 6-16KS (SIGMA, Allemagne). Les mNCC sont ensuite dispersés dans 100 g d'eau et centrifugés à 16 200 g et 20 °C pendant 30 min. Le mélange résultant est dispersé dans 50 mL d'eau et purifié pendant 14 jours par dialyse contre de l'eau à l'aide d'une membrane d'esters mixtes de cellulose (MWCO = 12-14 kg/mol ; Roth, Allemagne). Ensuite, le produit mNCC est lyophilisé pendant 4 jours avec un lyophilisateur CHRIST Beta 2-8 LS plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Allemagne). Une partie des mNCC récupérés est dispersée à 1 %m dans de l'eau déionisée par ultra-sonication à l'aide d'un sonificateur Branson en utilisant un mode pulsé pour limiter l'augmentation de température. Pendant la sonication, le bécher contenant la dispersion est placé dans un bain de glace pour éviter toute augmentation de température.

II.3.2. FORMULATIONS

II.3.2.1. Formulations aqueuses de carboxyméthylcellulose méthacrylate

Pour la formation d'hydrogels, les différentes mCMC synthétisées sont solubilisées à 2, 3 ou 4% m dans de l'eau déionisée à 25 °C ou 50 °C, selon le pourcentage massique, pendant 12 heures sous agitation magnétique. Le photo-amorceur (PI), l'Irgacure 2959[®] (I2959) est ensuite ajouté à température ambiante avec un rapport molaire constant par rapport au nombre de moles de méthacrylate (MA) en solution ($n_{PI}/n_{MA} = 0,55$). L'I2959 a été choisi car il est soluble dans l'eau (maximum 0,5% m), non toxique et absorbe à 365 nm, longueur d'onde à laquelle l'hydrogel est formé et correspondant à celle de la source UV des DLP Prodways V6000 et M120 [16]. L'I2959 est dispersé dans la formulation pendant 15 minutes dans un bain à ultrasons à 50 °C, puis celle-ci est agitée avec un multi-rotateur PTR-35 (Grant, Royaume-Uni) à 6 tr/min pendant 12 heures à température ambiante.

Au cours de la thèse, les imprimantes 3D DLP Prodways V6000 et M120 prévues pour être utilisées sont tombées en panne et n'ont pas pu être réparées. Pour les remplacer, le laboratoire s'est procuré une imprimante DLP polyvalente, l'Asiga MAX (**Figure II-3**). Cette dernière fonctionne avec une longueur d'onde de 385 nm. Dans ce cas, le photo-amorceur utilisé n'est plus l'I2959 mais le LAP, ajouté dans les mêmes proportions molaires par rapport aux groupements méthacrylates (0,55).

Les compositions des différentes formulations sont représentées dans le **Tableau II-1**.

II.3.2.2. Formulations cellulosiques à base de mCMC contenant des NCC/mNCC

Des formulations contenant 2 % m de mCMC et 0,2 ou 0,5 % m de NCC ou mNCC ont été réalisées. Le mélange est agité magnétiquement pendant 12 heures à 25 °C. L'I2959 est ensuite ajouté à température ambiante avec un rapport molaire constant par rapport au nombre total de moles de méthacrylates dans les formulations (0,55). La formulation est dispersée pendant 15 minutes dans un bain à ultrasons à 50 °C puis agitée avec un multi-rotateur PTR-35 (Grant, Royaume-Uni) à 6 tr/min pendant 12 heures à température ambiante. Dans le cas de la formulation préparée avec du LAP, ce dernier est ajouté avec un rapport molaire constant par rapport au nombre total de moles de méthacrylates (0,55). Les compositions des différentes formulations sont représentées dans le **Tableau II-1**.

Tableau II-1 : Compositions des formulations utilisées dans les différents chapitres, pour une masse totale de 100 g.

Chapitre	Nom	masse (g)			
		mCMC*	I2959/ <i>LAP</i>	NCC/ <i>mNCC</i>	Eau
III	A2	2	0,12		97,88
	A3	3	0,18		96,82
	A4	4	0,25		95,75
	B2	2	0,20		97,80
	B3	3	0,30		96,70
	B4	4	0,41		95,59
	C2	2	0,32		97,68
	C3	3	0,50		96,50
IV	FCNCC _{0,2}	2	0,12	0,2	97,68
	FCNCC _{0,5}		0,12	0,5	97,38
	FmCNCC _{0,5}		0,13	0,2	97,67
	FmCNCC _{0,5}		0,14	0,5	97,36
V	FA2	2	0,15		97,85
	FA3	3	0,22		96,78
	FA4	4	0,31		95,69
	FB2	2	0,25		97,75
	FC2		0,40		97,60

* Le DM de la mCMC utilisée est mentionné dans les chapitres respectifs

II.3.3. PRÉPARATION DES HYDROGELS ET DES CRYOGELS POUR LES CHAPITRES III ET IV

Dans le cas des formulations préparées dans les parties II.3.2.1 et II.3.2.2, 650 μ L de chaque formulation, prélevés avec une micropipette, sont placés dans un moule circulaire en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de 15 mm de diamètre et 1 cm de hauteur, puis exposés pendant 5 minutes sous une source UV carrée de 15 mm de côté, avec une longueur d'onde de 365 nm et une irradiance de 82 mW/cm² (Promaker V6000, Prodways, France). Tous les hydrogels obtenus ont une épaisseur moyenne de 3,6 mm et un diamètre de 15 mm. Ils sont ensuite déposés dans une coupelle en aluminium qui est placée dans un Dewar rempli d'azote liquide. La congélation est donc réalisée du bas vers le haut, puis l'hydrogel congelé est lyophilisé durant une nuit avec le lyophilisateur CHRIST Beta 2-8 LS plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Allemagne) pour obtenir des cryogels (**Figure II-2**).

Dans le cas des hydrogels issus de formulations contenant du LAP, leur formation est décrite dans la partie ci-après. Le processus de congélation et de lyophilisation est par contre le même que présenté ci-dessus.



Figure II-2 : Hydrogel transformé en cryogel par lyophilisation (-90 °C, 0,06 mbar).

II.3.4. FORMATION DES HYDROGELS DANS LE CHAPITRE V

II.3.4.1. Digital light processing et paramètres d'impression des hydrogels

La DLP Asiga Max (Asiga, Australie) est une imprimante 3D professionnelle qui comprend plusieurs composants essentiels pour son fonctionnement et sa performance (**Figure II-3**). La source de lumière qui émet une lumière ultraviolette de longueur d'onde monochromatique de 385 nm est située à l'intérieur de l'imprimante, sous la vitre en verre. La puissance maximale utilisable de cette dernière est de 18 mW/cm². La résolution de l'image projetée est de 62 µm dans les axes X et Y et dépend fortement de la qualité du focus réalisé sur la vitre (**Figure II-3a**). Le plateau de la DLP Asiga Max peut avoir une précision en épaisseur Z allant jusqu'à 1 µm. Cette précision en Z se réfère à l'ajustement de la hauteur de la plateforme de construction lors de la création de chaque couche de l'objet imprimé. La formulation utilisée est contenue dans une cuve dédiée, dont le fond est transparent aux UV et qui ne modifie pas la qualité du pixel (**Figure II-3b**). L'écran tactile de contrôle permet de gérer les paramètres d'initialisation, la puissance de la LED et les tests matériaux. Le logiciel Composer est dédié à l'imprimante sur lequel est envoyé un fichier STL d'un modèle CAO représentant la structure 3D à imprimer. Les différents paramètres d'impressions sont ajustables sur ce dernier, puis les informations sont envoyées à l'imprimante pour fabrication de l'objet. Dans le cas des formulations de mCMC, la durée d'insolation par couche est de 5 s pour la première puis de 4 s pour les autres avec une irradiance de 18 mW/cm².

Dans un premier temps, des objets sont imprimés à partir de modèles CAO issus de la base de données Thingiverse ou dessinés sur avec le logiciel SolidWorks. La structure des objets a été choisie de manière à définir les paramètres d'impression et la résolution maximale atteignable. L'épaisseur de couche dépend des objets à imprimer. Ensuite, les hydrogels sont rincés à l'eau puis subissent un post-traitement aux UV pendant 3 minutes dans une cuve UV TwinCure (Medifive, Corée du Sud). La cuve UV est composée d'une plaque tournante entourée de 7 LED UV à double longueur d'onde 365 nm + 405 nm pour une irradiance à l'intérieure de 6 mW/cm². Les hydrogels ont ensuite été photographiés par un smartphone

Samsung Galaxy S20 FE ou par un microscope numérique VHX-7000 (Keyence, France). Enfin, les hydrogels ont été lyophilisés pour la conservation de la structure.

Des hydrogels circulaires d'un diamètre de 15 mm de diamètre ont été imprimés avec des couches de 100, 250 et 500 μm jusqu'à obtenir une épaisseur de 4 mm. Les hydrogels imprimés subissent un post-traitement aux UV pendant 3 minutes dans une cuve UV TwinCure (Medifive, Corée du Sud). L'effet du post-traitement a été étudié en effectuant les caractérisations sur les hydrogels et les cryogels résultants et les propriétés ont été comparées à celles des matériaux après impression. Ces hydrogels ainsi que les cryogels résultants ont été caractérisés par les méthodes décrites dans la partie suivante.

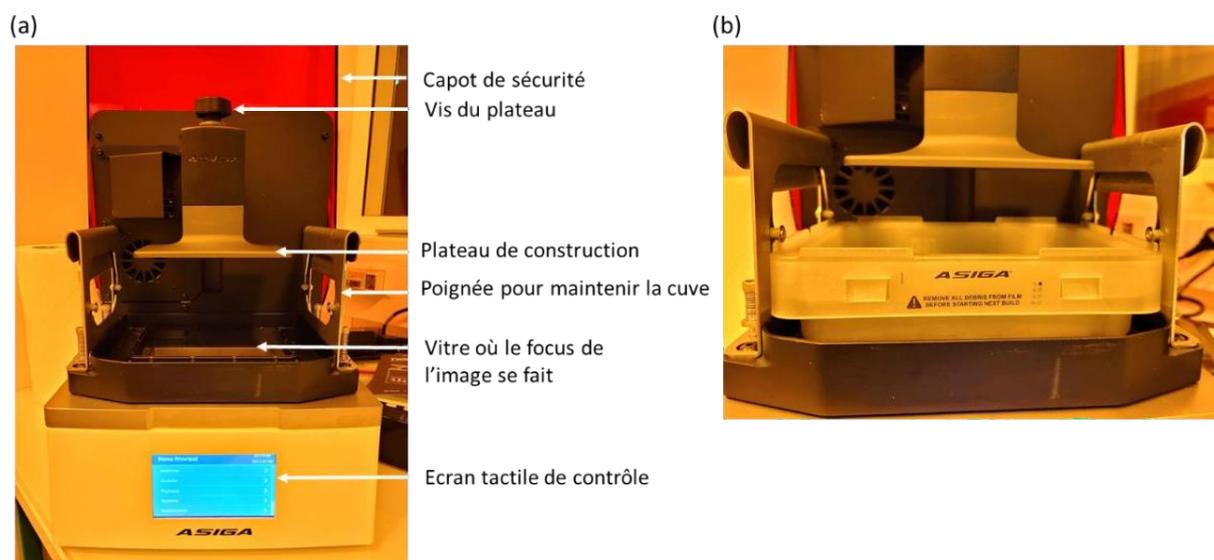


Figure II-3 : (a) photo représentant les différents éléments de la DLP Asiga MAX (b) photo représentant une formulation dans la cuve prête pour impression. La cuve est placée au-dessus de la vitre.

II.3.4.2. Polymérisation à 2-photons et paramètres d'impression des hydrogels

L'impression P2P a été réalisée par Angélique Schlepp de la startup Microlight3D (<https://www.microlight3d.com/>). L'imprimante utilisée est la μFab3D .Advanced (Microlight3D, France) qui comprend plusieurs composants essentiels pour son fonctionnement et sa performance (**Figure II-4**). Elle est équipée d'un microscope inverse possédant un objectif à air avec un grossissement X20 (Olympus, France) et ayant une ouverture numérique de 0,8 NA. Une platine piézoélectrique 3D se déplaçant jusqu'à 300 μm selon les axes X, Y et Z, permet de positionner le point focal du laser qui génère des impulsions laser femtosecondes vert à $\lambda = 532 \text{ nm}$ avec une puissance maximale de 20 mW. Les deux photons sont localisés au point focal dans un petit volume ($\sim 1 \mu\text{m}^3$) appelé voxel. La résolution maximale possible d'obtenir avec cette imprimante est de 200 nm. Enfin, la conception des objets à imprimer se fait à l'aide du logiciel Luminis. Dans le cas de cette imprimante, ce n'est pas une impression couche par couche, le laser suit les trajectoires de slicing établie par Luminis.

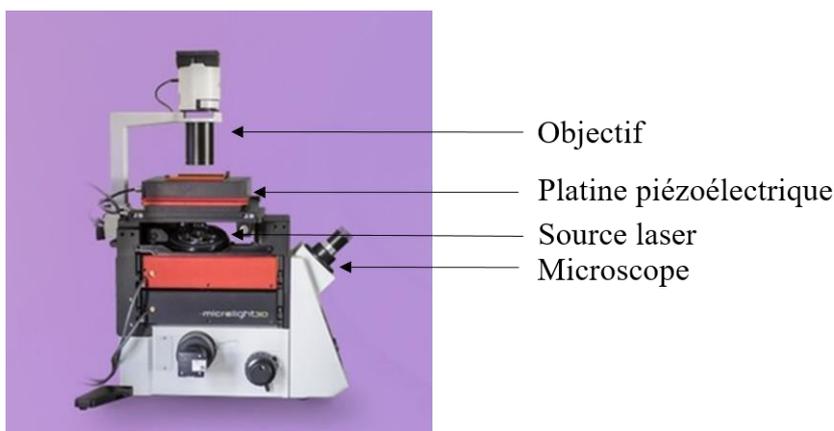


Figure II-4 : Imprimante P2P μ Fab3D.Advanced utilisée par Micrilight3D.

Tout d'abord, une goutte de formulation est déposée sur une lamelle de verre transparente de 24 mm de côté et d'une épaisseur entre 150 – 170 μm . La surface du verre est prétraitée avec du Bind-Silane pour permettre l'adhésion de l'hydrogel sur la lamelle. Cette dernière est ensuite fixée sur la platine. Pour la polymérisation, la puissance du laser est réglée à 4 mW et la vitesse d'impression de 187,5 $\mu\text{m/s}$ soit des temps d'exposition de 2 s. Avec les paramètres utilisés, la hauteur théorique du voxel est de 7 μm . Les images sont d'abord réalisées en capture d'écran sur le PC de la P2P post impression avec l'objectif 0,8 NA x20 (Olympus, France). Après la polymérisation, la formulation résiduelle est éliminée en rinçant l'échantillon pendant 1 minute dans une solution de PBS. Ensuite, l'hydrogel a été post-traité sous UV par une lampe (UV 701435, 254nm Jeulin, France) puis laissé sécher à l'air libre ou alors l'excès de PBS a été éliminé avec une feuille absorbante. Ces étapes correspondent au développement de la pièce imprimée. Les images des hydrogels imprimés post développement, sont réalisées avec un microscope optique (Olympus, France) possédant un grossissement x100, avec une dino-lite (Dino-lite, France, réf RS AM4815ZTL) possédant un grossissement x232,9, et enfin avec un microscope digital numérique sans oculaire (RYECOCAM, Suisse).

II.3.5. ETUDE DE L'ÉPAISSEUR DE COUCHE RÉTICULÉE EN FONCTION DU TEMPS

La connaissance de l'épaisseur de couche réticulée en fonction de la durée d'insolation permet de donner des informations importantes sur la résolution potentielle dans l'axe Z. Dans le cas des formulations de mCMC contenant des NCC ou des mNCC et de l'I2959, un volume correspondant à une hauteur de 1 cm de formulation est placé dans une coupelle en aluminium (**Figure II-4**). Ensuite, un pochoir opaque noir avec un trou circulaire de 12 mm de diamètre est placé sur la surface. L'insolation à des durées différentes est contrôlée par une lampe à fibres optiques UV UFIBER-COL 365 nm (UWAVE, France) réglée de manière à avoir une puissance moyenne de 82 mW/cm². L'hydrogel formé est retiré de la formulation liquide et sa largeur et

son épaisseur ont été mesurées à différents endroits à l'aide d'un pied à coulisse comptant pour environ 5 mesures et moyennées.

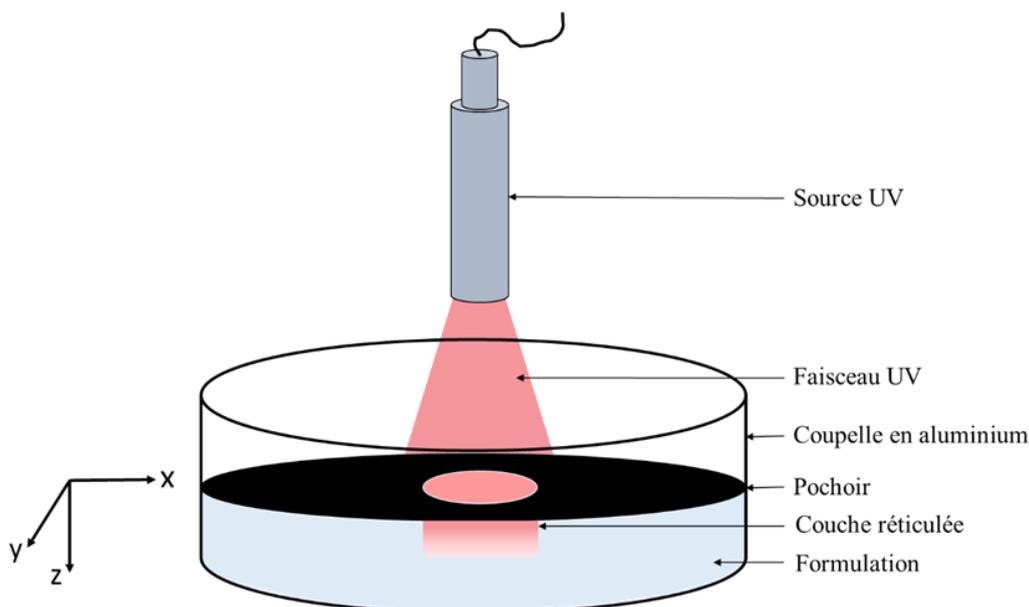


Figure II-5 : Schéma représentant le protocole permettant la mesure de l'épaisseur de couche réticulée d'un hydrogel en fonction de la durée d'exposition à partir d'une formulation contenant de l'I2959 comme photo-amorceur. La hauteur de la formulation (1 cm) est supérieure à l'épaisseur de l'hydrogel formé. La lampe UV a une longueur d'onde de 365 nm avec une irradiation moyenne de 82 mW/cm².

Lorsque le LAP est le photo-amorceur, les mesures de l'épaisseur de couche réticulée ont été réalisées directement sur la DLP Asiga Max qui propose le mode « test matériau ». Un volume correspondant à une hauteur de 1 cm de formulation est placé dans un cristalliseur en verre. Celui-ci est déposé sur la vitre à travers laquelle le faisceau UV est projeté (**Figure II-3a**). Le cristalliseur n'a pas d'impact sur le focus ni sur la puissance reçue. Un diamètre d'insolation de 15 mm et une irradianance de 18 mW/cm² ont été choisis comme paramètres constants. La durée d'insolation est le paramètre variable. L'hydrogel formé est retiré de la formulation à l'aide d'une spatule puis son épaisseur est mesurée à différents endroits à l'aide d'un pied à coulisse. La moyenne de ces mesures a été retenue. Des hydrogels insolés pendant une durée bien définie sur une épaisseur de 3,6 mm ont été caractérisés ainsi que les cryogels résultants.

II.4. CARACTÉRISATIONS

II.4.1. SPECTROSCOPIE ET MICROSCOPIE

La plupart des matériaux ont été caractérisés par des méthodes spectroscopiques et microscopiques. La spectroscopie est une technique d'analyse qui permet d'étudier l'interaction entre la lumière et la matière. Les spectres obtenus permettent de visualiser les interactions spécifiques entre les molécules et les radiations électromagnétiques, à différentes fréquences ou longueurs d'ondes. La microscopie est un ensemble de techniques d'imagerie qui permet de visualiser les structures moléculaires de l'échelle du nanomètre à celle du micromètre.

II.4.1.1. Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique d'analyse moléculaire qui permet d'étudier les propriétés magnétiques des noyaux des atomes. Le principe de la RMN repose sur le fait que les noyaux atomiques possèdent un moment magnétique et un spin, qui sont influencés par les champs magnétiques externes. Lorsqu'un échantillon est soumis à un champ magnétique statique, les spins des noyaux se répartissent selon deux orientations (états d'énergie) qui sont séparées par une quantité d'énergie proportionnelle au champ magnétique. Si une impulsion radiofréquence (centaine de MHz) est appliquée sur les noyaux, cela peut faire basculer certains spins d'un état d'énergie à l'autre, provoquant une émission ou une absorption de radiofréquence (fréquence de résonance). Cette dernière est influencée par l'environnement chimique de chaque noyau. Les spectres de RMN sont représentés en ppm (parties par million) qui est une mesure relative de la déviation de la fréquence de résonance par rapport à la fréquence de référence.

La spectroscopie RMN ^1H liquide

La spectroscopie RMN ^1H liquide a été utilisée pour confirmer la méthacrylation de la CMC et permet de quantifier le degré de méthacrylation (DM) de la mCMC. 4,5 mg de mCMC sont solubilisés dans 650 μL de D_2O à 50 °C pendant 12 h en utilisant un ThermoMixer C (Eppendorf, Allemagne). Tous les spectres RMN ^1H ont été enregistrés sur un spectromètre Spectrospin 300 MHz (Bruker, Allemagne) à 25 °C avec 64 scans successifs et un temps de relaxation D1 de 3 s.

La spectroscopie RMN ^{13}C solide à rotation à l'angle magique à polarisation croisée (CP-MAS) et à suppression non quaternaire (NQS)

Tout d'abord, la CP-MAS est une technique de RMN du solide utilisant deux méthodes pour améliorer la sensibilité : la polarisation croisée (CP) et la rotation à l'angle magique

(MAS). La polarisation croisée permet de transférer la polarisation des noyaux ayant un spin élevé (généralement des protons) vers les noyaux ayant un spin plus faible (par exemple le carbone). Cela permet d'augmenter la sensibilité de la mesure des noyaux à faible spin. La rotation à l'angle magique (MAS) permet de réduire les effets de la force dipolaire entre les noyaux des atomes dans un solide. En faisant tourner l'échantillon à une certaine vitesse, généralement de l'ordre de quelques kHz, on réduit les interactions dipolaires entre les noyaux, ce qui permet d'obtenir des signaux plus résolus. La RMN solide à suppression non quaternaire (NQS) permet de visualiser seulement les atomes de carbones quaternaires et les CH₃ mobiles.

Des mesures par RMN à l'état solide du carbone ¹³C NQS et CP-MAS ont été effectuées pour caractériser les carbones avant et après la réticulation des CMC, mCMC et des cryogels puis dans le but de déterminer le taux de méthacrylates réticulés. De plus, la spectroscopie RMN ¹³C CP-MAS a été utilisée pour quantifier le degré de méthacrylation (DM) des mNCC. 80 mg de NCC, mNCC ou de cryogels de mCMC sont placés dans un rotor de 3 mm de diamètre. Tous les spectres CP-MAS ont été enregistrés sur un spectromètre Neo 500 MHz (Bruker, Allemagne) fonctionnant à 125,8 MHz. La vitesse de rotation est fixée à 12 kHz. Le temps d'acquisition est de 28 ms, la largeur de bande de 37 kHz et un temps de contact de 2 ms. Au moins 2048 scans successifs ont été enregistrés à 25 °C.

II.4.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

La spectroscopie infrarouge (IR) est une technique basée sur l'interaction entre les molécules et les radiations infrarouges, qui sont des ondes électromagnétiques ayant des fréquences plus basses que la lumière visible. Lorsqu'une radiation IR est dirigée vers un échantillon, certaines molécules absorbent l'énergie des photons de la radiation IR, ce qui provoque leur vibration. Chaque type de liaison chimique absorbe l'énergie infrarouge à une fréquence spécifique, ce qui permet de déterminer la composition chimique de l'échantillon.

Les mesures de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) par réflexion totale atténuée (ATR) ont été effectuées avec un instrument MIRacle 10 (Shimadzu, Japon) pour analyser les liaisons et fonctions chimiques caractéristiques des échantillons de CMC, de mCMC, NCC et mNCC. Les spectres d'absorption ont été acquis sur la plage de nombre d'onde de 4 000 à 550 cm⁻¹ (64 scans, résolution de 4 cm⁻¹).

II.4.1.3. Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible est une technique analytique couramment utilisée pour étudier l'interaction de la lumière UV-visible avec les composés chimiques. Elle permet de mesurer l'absorption et la transmission de la lumière dans la plage des ultraviolets (UV) et du

visible. Dans le cas des formulations contenant des nanocristaux de cellulose, la spectroscopie UV-visible permet d'établir une corrélation entre l'absorbance et la concentration ou la stabilité de la suspension.

Les spectres UV-vis des suspensions de NCC et de mNCC ainsi que des formulations aqueuses de mCMC contenant des NCC ou des mNCC sans photo-amorceur ont été enregistrés de 350 à 800 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Cary 300 (Varian, États-Unis). Les formulations sont placées dans une cuvette en polystyrène (1 mL, $l = 1$ cm). La ligne de base a été préalablement enregistrée avec de l'eau déionisée.

II.4.1.4. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière est une technique utilisée pour caractériser les propriétés de particules en suspension dans un liquide. Elle fournit des informations sur la distribution de taille en intensité des particules.

Des expériences de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été menées avec un appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern, Royaume-Uni) à 25 °C pour déterminer la distribution de taille des nanocristaux. L'instrument fonctionne avec un laser HeNe de 2 mW à une longueur d'onde de 632,8 nm et avec un angle de détection de 173°. Les suspensions de NCC et de mNCC ont été caractérisées à une concentration de 0,1 %m dans l'eau. La viscosité du milieu est considérée égale à celle de l'eau à 25 °C (0,8872 mPa.s), l'indice de réfraction du milieu fixé à 1,33, et l'indice de réfraction du matériau à 1,50 correspondant à celui des NCC à 632,8 nm [17]. L'échantillon est déposé dans une microcuvette en quartz (3,5 mL, $l = 1$ cm), et 3 mesures de 13 cycles chacune ont été effectuées.

II.4.1.5. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Le microscope électronique à balayage (MEB) est une technique d'imagerie qui utilise un faisceau d'électrons pour produire des images en haute résolution de surfaces solides conductrices. Cet instrument fonctionne en émettant des électrons à partir d'un filament chauffé, qui sont ensuite focalisés en un faisceau étroit et dirigé vers la surface de l'échantillon à l'aide de lentilles électromagnétiques. Le faisceau d'électrons balaye la surface de l'échantillon produisant une série de signaux d'électrons réfléchis, émis ou transmis. Ces signaux sont captés par des détecteurs qui les convertissent en signaux électriques ensuite utilisés pour produire une image de la surface de l'échantillon. La résolution peut atteindre quelques dizaines de nanomètres.

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée pour étudier la morphologie des cryogels et mesurer la distribution en taille des pores. Ces caractérisations ont

été réalisées par Christine Lancelon-pin (CERMAV). Les échantillons ont été fracturés horizontalement, collés sur des supports métalliques avec du ciment de carbone et pulvérisés avec de l'or/palladium. Les images en électrons secondaires sont enregistrées avec un microscope électronique à balayage FEI Quanta 250 (Thermo Fisher Scientific, États-Unis) équipé d'un canon à électrons de champ fonctionnant à 2,5 kV. Tous les pores ont été observés sur la surface coupée. La taille des pores a été déterminée par traitement d'image avec le logiciel ImageJ. Des lignes horizontales ou verticales sont tracées sur chaque pore. Cette procédure est effectuée sur 25 pores par image et 4 images par échantillon. Les pores dont les parois sont rompues par la méthode de coupe n'ont pas été mesurés.

II.4.1.6. Microscopie électronique en transmission (MET)

Le microscope électronique en transmission (MET) est un instrument d'imagerie utilisé pour visualiser les structures à l'échelle nanométrique. Un faisceau d'électrons est envoyé sur un échantillon qui le traverse et interagit avec les différentes régions de l'échantillon. Lorsque les électrons passent à travers l'échantillon, certains sont diffusés ou absorbés, tandis que d'autres traversent sans être déviés. Un système de lentilles magnétiques focalise les électrons transmis pour former une image sur un écran fluorescent ou un capteur électronique, qui est ensuite enregistrée pour analyse. Le MET permet de visualiser les nanocristaux de cellulose avec une grande précision, ce qui permet d'étudier leur morphologie, leur taille, leur distribution et leur arrangement.

Les caractérisations MET ont été réalisées par Christine Lancelon-Pin (CERMAV). Des gouttelettes de suspensions aqueuses diluées de NCC et de mNCC sont déposées sur des grilles de cuivre recouvertes d'un film de carbone préalablement soumises à une décharge lumineuse, puis colorées négativement avec de l'acétate d'uranyl à 2 %m. Les échantillons sont observés au microscope JEOL JEM-2100-Plus fonctionnant à une tension d'accélération de 200 kV. Les images sont enregistrées avec une caméra Gatan Rio 16.

II.4.2. Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X est une technique couramment utilisée pour l'analyse de la structure des polymères semi cristallins. La structure cristalline de la cellulose et de ses dérivés est bien connue et étudiée [13,18]. Cette technique implique l'exposition d'un échantillon à un faisceau de rayons X monochromatique en faisant varier l'angle d'incidence, qui est ensuite diffracté par les plans cristallographiques formés par les atomes du matériau. Les rayons X sont diffractés par les atomes dans le matériau, créant des interférences entre les ondes diffractées qui produisent un motif de diffraction. Ce motif de diffraction est enregistré par un détecteur et

analysé pour déterminer la structure du matériau. La loi de Bragg (**Equation II-2**) relie les orientations des plans donnant des pics de diffraction :

$$2d_{hkl} \sin(\theta) = n\lambda \quad \text{(Equation II-2)}$$

Où d_{hkl} est la distance entre deux plans cristallographique d'une famille (hkl) définissant l'orientation dans l'espace, θ l'angle d'incidence du faisceau par rapport à la surface de l'échantillon, n l'ordre de diffraction et λ la longueur d'onde des rayons X incidents.

La structure des polymères CMC, mCMC, ont été caractérisés par DRX. Des pastilles de ces matériaux ont été formés sous une presse uniaxiale et placé puis placés sur le porte échantillon du diffractomètre D8 Advance (Brüker, Allemagne). La plage de variation de l'angle 2θ est prise entre 5 et 40 degrés, avec 0.02° par pas d'acquisition de 2 secondes chacun. Le rayon X d'incidence est celle du cuivre de longueur d'onde $1,54 \text{ \AA}$.

II.4.3. ANALYSE THERMIQUE DES MATÉRIAUX

L'analyse thermique permet de déterminer les propriétés thermiques et de décomposition des polymères, paramètres essentiels à la compréhension de leur comportement en réponse aux changements de température ainsi que pour prédire leur durée de vie et leur utilisation dans des applications spécifiques.

Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'ATG mesure la masse d'un échantillon en fonction de la température ou du temps, ce qui permet de déterminer la stabilité thermique et la décomposition des polymères. Des échantillons lyophilisés de CMC et de mCMC ont été analysés par l'ATG Jupiter STA 449 F1 (Netzsch, Allemagne). En moyenne, 10 mg de polymères sont déposés dans un creuset en alumine. La mesure est réalisée sous un flux d'air à 80 mL/min et d'argon à 20 mL/min comme gaz protecteur. Le cycle de chauffe utilisé correspond à une stabilisation thermique à 20°C pendant 5 minutes, puis a une montée en température jusqu'à 800°C à raison de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ et de 75 pts/min. Les températures de dégradation sont déterminées par la dérivée des courbes d'ATG.

Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC mesure la différence de chaleur nécessaire pour maintenir une température constante entre un échantillon et une référence alors qu'ils sont soumis à une plage de températures spécifique. Cette technique permet de mesurer les transitions de phase des polymères, telles que les températures de fusion (T_f) et de cristallisation (T_c), ainsi que la température de transition vitreuse (T_g). Des échantillons de CMC et de mCMC ont été analysés par la Pegasus DSC 404 F1 (Netzsch, Allemagne). En moyenne, 10 mg de polymères sont déposés dans un creuset en aluminium recouvert par un couvercle de la même matière. La

mesure est réalisée sous un flux d'air à 80 mL/min et d'argon à 20 mL/min comme gaz protecteur. Le cycle de mesure commence par un refroidissement à l'azote liquide jusqu'à -60 °C à raison de 10 °C/min puis et se poursuit par un maintien de cette température pendant 8 minutes. Cette étape permet d'obtenir un signal stable à partir de 0 °C lors de la montée en température. Celle-ci est effectuée jusqu'à 300 °C avec une rampe de 5 °C/min. La DSC est ensuite remise à température ambiante par diminution de la température à raison de 10 °C/min.

II.4.4. DOSAGE CONDUCTIMÉTRIQUE

La titration conductimétrique a été utilisée pour déterminer la quantité de demi-esters de sulfate (DS) à la surface des NCC juste après leur préparation par hydrolyse à l'acide sulfurique et celle des mNCC après méthacrylation, comme décrit par Darpentigny *et al.* [19]. Pour cela, une suspension à 2,3 %m de NCC ou de mNCC dans l'eau a été titrée avec 0,01 M NaOH et la teneur en sulfate a été extraite en utilisant l'**Equation II-3** suivante :

$$DS = \frac{V_{eq} \times C_{NaOH} \times M_{mean}}{m_{cellulose}} \quad (\text{Equation II-3})$$

où V_{eq} est le volume (en L) de NaOH nécessaire pour le titrage de la suspension de NCC ou mNCC déterminé à partir des courbes de conductivité en fonction du volume de soude ajouté (**Figure II-6**). C_{NaOH} est la concentration de NaOH (0,01 M), $m_{cellulose}$ est la masse de NCC ou mNCC titrés (en g), et M_{mean} est la masse molaire moyenne d'une unité répétitive considérant les sulfates (en g/mol), calculée selon l'**Equation II-4** suivante :

$$M_{mean} = \frac{M_{glu}}{1 - (M_{glu+sulf} - M_{glu}) \times \left(V_{eq} \times \frac{C_{NaOH}}{m_{cellulose}} \right)} \quad (\text{Equation II-4})$$

où M_{glu} est la masse molaire de l'unité répétitive de la cellulose (162 g/mol) et $M_{glu+sulf}$ est la masse molaire de l'unité répétitive de la cellulose avec le demi ester de sulfate en position C6 (242 g/mol). Pour les mNCC, la quantité de méthacrylate est considérée dans la masse molaire de l'unité répétitive à partir de la valeur de leur DM (**Equation II-5**). La masse molaire moyenne d'une unité de glucose possédant un méthacrylate est de 231 g/mol.

$$M_{glu+meth} = (1 - DM) \times 162 + DM \times 231 \quad (\text{Equation II-5})$$

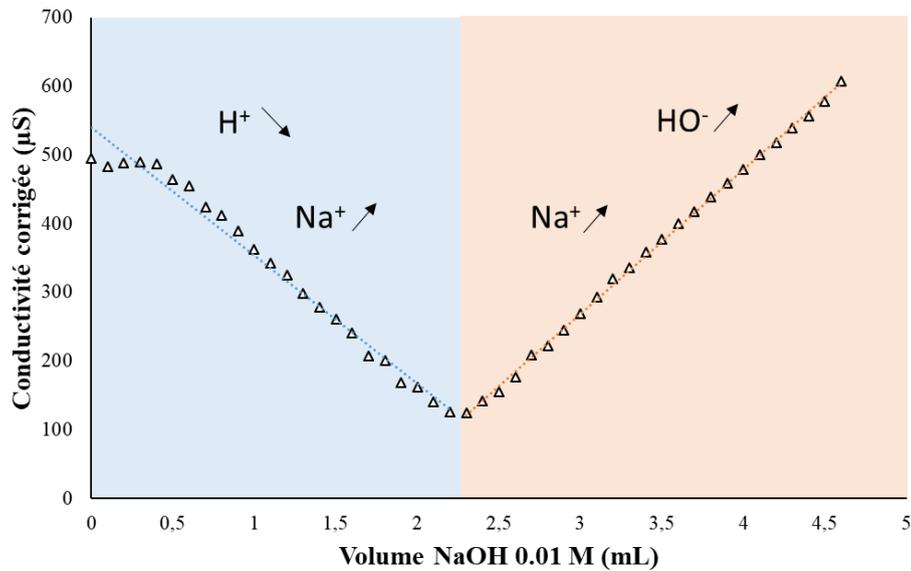


Figure II-6 : Evolution de la conductivité corrigée en fonction du volume de NaOH à 0,01 M ajouté lors du dosage des sulfates de surface des NCC dispersés dans l'eau. En ajoutant de la soude, les protons acides de SO_3^- , H^+ sont progressivement consommés, et la conductivité diminue. Après la neutralisation de tous les ions H^+ , la conductivité augmente avec l'ajout d'ions Na^+ et OH^- [20].

II.4.5. TESTS DE GONFLEMENT ET DÉGRADATION ENZYMATIQUE

II.4.5.1. Taux de gonflement

Des tests de gonflement ont été effectués sur les cryogels. Ces derniers sont immergés dans de l'eau déionisée à température ambiante, et, de cette manière, les cryogels sont transformés de nouveau en hydrogels (ou cryogels réhydratés) qui sont régulièrement pesés au cours du temps. Ces étapes sont répétées jusqu'à ce que l'équilibre de masse soit atteint pour déterminer le taux de gonflement (Q_m) selon l'Equation II-6.

$$Q_m(t) = m_t/m_0 \quad (\text{Equation II-6})$$

où m_0 est la masse initiale du cryogel et m_t est la masse au moment de la mesure au temps t correspondant à l'équilibre. Les rapports de gonflement sont moyennés sur les mesures effectuées sur trois échantillons différents. L'échantillon immergé est retiré à l'aide d'une spatule, l'eau en surface est éliminée par passage du matériau gonflé sur un gant, puis l'échantillon est pesé. Cette étape introduit une incertitude sur la mesure car il peut rester de l'eau en surface. Une autre source d'incertitude est liée aux potentiels dommages subis par l'échantillon lors des différentes manipulations. De même, les tests de gonflements dans le PBS à 37 °C ont été réalisés sur des cryogels issus d'hydrogels imprimés en couches de 250 µm puis réticulés 3 minutes supplémentaires en post-traitement UV.

Des tests de gonflements ont aussi été réalisés sur les hydrogels non séchés. Dans ce cas m_0 est la masse de l'hydrogel et m_t est la masse au moment de la mesure t de l'hydrogel gonflé.

II.4.5.2. Théorie de Flory-Rehner

La taille de maille de l'hydrogel (ξ) a été estimée à partir des tests de gonflement en se basant sur la théorie de Flory-Rehner décrite par Baier Leach *et al.* et Lin *et al.* [5,21]. Tout d'abord, le rapport de masse entre l'hydrogel et le cryogel, Q_m , est calculé en utilisant l'**Equation II-7** :

$$Q_m = m_h/m_0 \quad (\text{Equation II-7})$$

où m_h est la masse de l'hydrogel et w_0 est la masse initiale du cryogel. Le rapport volumique, Q_v , entre l'hydrogel et les volumes de polymère, a été déterminé à partir de Q_m en utilisant l'**Equation II-8** :

$$Q_v = 1 + \left(\frac{\rho_{mCMC}}{\rho_{eau}} (Q_m - 1) \right) \quad (\text{Equation II-8})$$

où ρ_{mCMC} est la densité de la mCMC sèche considérée, mesurée par pycnométrie, en analysant des pastilles de chaque mCMC à l'aide de l'appareil AccuPyc II 1340 (Micromeritics, US) (**Annexe II-1**) ; ρ_{eau} est la densité du solvant ($\rho_{eau} = 1 \text{ g.cm}^{-3}$). La masse molaire moyenne entre deux points de réticulation (M_c) a été calculée à l'aide d'une version simplifiée de l'équation de Flory-Rehner (**Equation II-9**) démontrée par Hoti *et al.* [22] :

$$\overline{M}_c = \frac{V_{eau} \left[\left(\frac{m_H}{w_{hC}} \right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{2}{f} \frac{m_H}{m_{hC}} \right) \right]}{- \left[\ln \left(1 - \frac{m_H}{m_{hC}} \right) + \frac{m_H}{m_{hC}} + \chi \left(\frac{m_H}{m_{hC}} \right)^2 \right]} \quad (\text{Equation II-9})$$

où V_{eau} est le volume molaire du solvant à température ambiante ($V_{eau} = 18 \text{ mol.cm}^{-3}$), m_h est la masse de l'hydrogel, m_{hC} est la masse du cryogel hydraté au maximum de gonflement, χ est le paramètre d'interaction polymère-solvant de Flory et f est la fonctionnalité de la réticulation, c'est-à-dire le nombre maximal de chaînes de polymère chimiquement liées à un point de réticulation ($f = 2,3$ pour les échantillons de CMC avec $DS = 0,7$). Étant donné que CMC et mCMC ont une structure similaire, une valeur de 0,45 qui correspond au paramètre d'interaction eau-CMC déterminé par Xia *et al.* (2013) a été utilisée pour χ [23]. Les différences entre CMC, mCMC et mCMC réticulée sont considérées comme négligeables sur la base des travaux de Leach *et al.* sur l'acide hyaluronique (HA), l'HA méthacrylate (mHA) et le mHA réticulé. La taille de la maille de l'hydrogel, ξ , a été déterminée par Torres-Lugo et Peppas en utilisant l'**Equation II-10** [21,24]:

$$\xi = Q_v^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\sqrt{M_c}}{\sqrt{M_w}} \right) \sqrt{r_0^2} \quad (\text{Equation II-10})$$

où M_w est la masse molaire de la mCMC calculée en fonction du DM (Annexe II-1), et r_0^2 est la distance quadratique moyenne entre deux points de réticulation qui a été liée à la masse molaire moyenne en masse M_w de la mCMC par Cleland en utilisant l'**Equation II-11** [25] :

$$\sqrt{r_0^2} = \sqrt{\frac{2C_n l^2}{M_r}} \sqrt{M_w} \quad \text{(Equation II-11)}$$

Dans cette formule, M_r est la masse molaire de l'unité de mCMC, C_n est le ratio caractéristique de Flory de la CMC (10) déterminé y et l est la longueur d'une liaison virtuelle entre deux unités de monosaccharide (0,545 nm) déterminée par Holtzer *et al.* (1954) [26,27]. Enfin, la taille de la maille de l'hydrogel a été calculée en utilisant l'**Equation II-12** :

$$\xi = \sqrt{\frac{2C_n l^2}{M_r}} \sqrt{M_c Q_v^{\frac{1}{3}}} \quad \text{(Equation II-12)}$$

II.4.5.3. Tests de dégradation enzymatique

Des tests de dégradation enzymatique ont été réalisés par Raphaël Buret lors son stage de M2, sur des cryogels issus d'hydrogels de 12,74 mm de diamètre et 3,37 mm d'épaisseur imprimés avec une durée d'insolation de 5 s pour la première couche, puis 4 s pour les suivantes. La première couche est insolée avec une épaisseur de 500 μm et de 250 μm pour les suivantes. La réticulation périphérique a été retirée. Les hydrogels ont ensuite été post réticulés 3 minutes supplémentaires. Après lyophilisation, les cryogels sont déposés dans une solution de PBS contenant des cellulases (*Trichoderma Ressei*) à différentes concentrations (0,05, 0,2 et 1 U/mL) maintenue à 37 °C dans une étuve. Les cryogels ont été pesés régulièrement dans le temps jusqu'à ce que le cryogel ne soit plus manipulable à cause de sa dégradation. Neufs cryogels par conditions ont été caractérisés.

II.4.6. RHÉOLOGIE

La rhéologie est l'étude de la déformation et du flux d'un matériau sous l'application de forces externes. Toutes les mesures de viscosité, de temps de gélification des formulations sous insolation UV et des propriétés rhéologiques des hydrogels ont effectuées à l'aide d'un rhéomètre Kinexus Pro+ de Netzsch (Allemagne) en géométrie plan-plan.

II.4.6.1. Mesures de viscosité

La viscosité, η , est une mesure de la résistance d'un fluide à l'écoulement. Pour les polymères en solution, la viscosité est une mesure de la résistance que rencontre la solution lorsqu'elle est soumise à une contrainte de cisaillement. Elle a été définie par Newton comme étant le rapport entre la contrainte de cisaillement τ et la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ (**Equation II-13**).

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (\text{Equation II-13})$$

La viscosité des polymères en solution dépend de leur masse molaire, de leur conformation, de leur concentration dans la solution et de la nature du solvant.

Des mesures de taux de cisaillement de 0,1 à 100 s⁻¹ à 25 °C ont été effectuées sur les différentes formulations de mCMC ainsi que sur les formulations de mCMC contenant des NCC et des mNCC. Un mobile plan en acier d'un diamètre de 50 mm est préféré dans le cas des formulations très peu visqueuses et un mobile plan d'un diamètre de 20 mm dans le cas de formulations plus visqueuses. Pour toutes les mesures, un entrefer de 0,2 mm et un temps de 3 minutes maximum par point ont été choisis. Le point de mesure est pris si l'état stationnaire (ET) est atteint pendant 10 secondes successives (ET = 1), au bout de 3 minutes s'il n'est pas atteint sur 10 secondes (ET ≠ 1). La valeur de viscosité est considérée bonne si celle de l'état stationnaire est égale à ET = 1 ± 0,05. Au moins deux mesures différentes ont été réalisées pour toutes les expériences.

II.4.6.2. Rhéologie en temps réel

La cinétique de photo-réticulation des différentes formulations de mCMC avec NCC/mNCC a été caractérisée par rhéologie en temps réel afin d'obtenir des informations essentielles sur la durée d'insolation nécessaire lors de l'utilisation des techniques d'impression 3D par polymérisation en cuve. La photo-réticulation des méthacrylates commence avec l'application de la lumière UV et conduit à une augmentation progressive des valeurs de G', le module de conservation qui caractérise le comportement élastique, et G'', le module de perte qui caractérise le comportement visqueux, jusqu'à l'obtention d'un comportement de type solide (G' > G''). Le temps de gélification (t_{gel}) est ensuite déterminé à l'intersection des courbes G' et G'' (G' = G'') (**Figure II-7**). Après la gélification, les deux modules de cisaillement continuent d'augmenter avec l'exposition aux UV jusqu'à atteindre un plateau correspondant à la conversion maximale des méthacrylates dans les conditions d'oscillation. La valeur du module élastique G' au plateau ne correspond pas à celui de l'hydrogel après réticulation classique. En effet, pendant la réticulation sous UV en rhéologie en temps réel, l'hydrogel peut subir des changements structuraux et de propriétés. Le réseau polymère se forme progressivement, ce qui

peut influencer la viscoélasticité de l'hydrogel au fil du temps. En revanche, lors de la mesure du temps de gélification en temps réel sous UV, la valeur du temps de gélification correspond généralement à la durée nécessaire pour que le matériau atteigne un état gélatineux [28,29].

Dans ces travaux, seuls les t_{gel} seront étudiés.

Les mesures de rhéologie en temps réel sous insolation UV ont été effectuées manuellement à l'aide d'une lampe à fibres optiques UV UFIBER-COL 365 nm (UWAVE, France). Les formulations sont déposées sur une plaque de quartz transparente aux UV. Le plan mobile a un diamètre de 20 mm et l'entrefer entre celui-ci et la plaque de quartz est de 0,2 mm. La lampe UV est réglée et placée sous la plaque de quartz à une distance permettant une exposition lumineuse de 2 cm de diamètre avec une densité de puissance moyenne de 82 mW/cm² ou de 18 mW/cm² selon les formulations étudiées. Les modules de cisaillement élastique (G') et visqueux (G'') sont mesurés au cours du temps avec une déformation de 5 %, à 0,1 Hz et à température ambiante. Après une minute de stabilisation sans irradiation UV, l'irradiation est activée pendant 10 minutes. Ces conditions ont été choisies de manière à obtenir un signal stable. Toutes les expériences sont réalisées sur 3 échantillons différents.

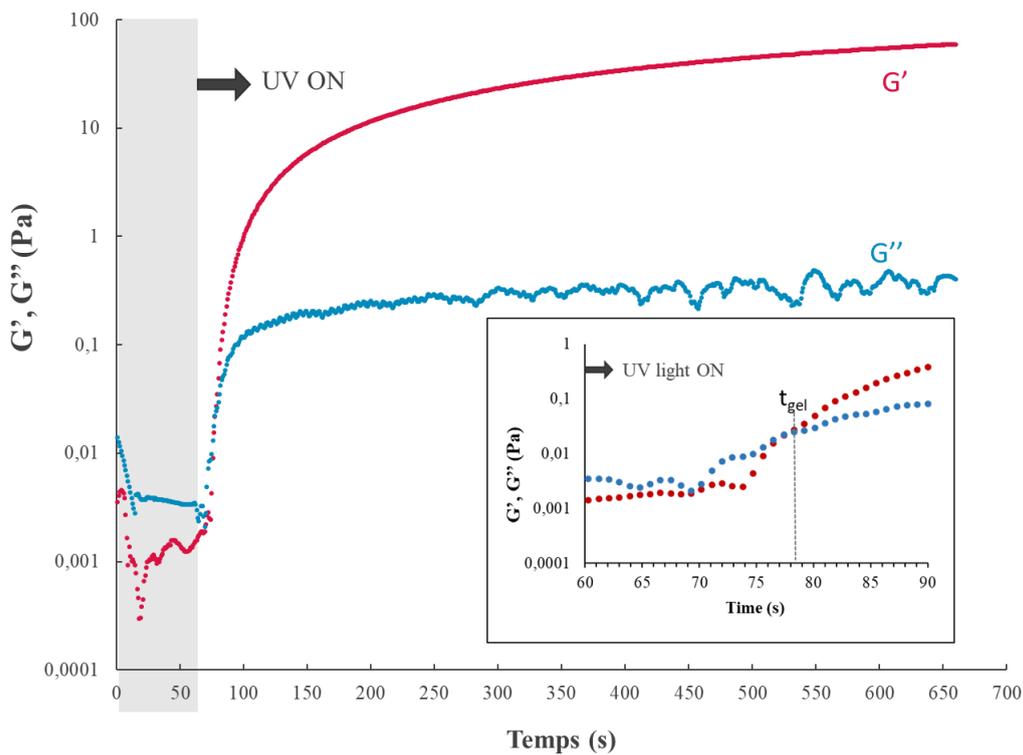


Figure II-7 : Evolution des modules élastiques et de perte (G' et G'') en fonction de la durée d'insolation UV pour une formulation de mCMC contenant des mNCC pendant toute l'expérience et autour de l'intersection des modules (temps de gélification).

II.4.6.3. Mesures d'oscillation en fréquence

Les mesures de balayage en fréquence ont été effectuées sur les hydrogels et cryogels hydratés, à une température constante (25 °C) entre 0,1 et 10 Hz. Selon des mesures préliminaires de balayage d'amplitude de 0,1 à 100 % à 0,1 et 10 Hz, tous les tests ont été effectués dans la région viscoélastique linéaire à une déformation de 1 %. L'entrefer entre la plaque et le plan mobile (d'un diamètre de 20 mm) a été fixé à 0,4 mm pour les hydrogels formés avec l'Irgacure 2959 et 0,6 mm pour les hydrogels imprimés par DLP. Des mesures ont aussi été effectuées à 37 °C. L'excédent d'hydrogel en dehors de la zone de mesure a été enlevé. Toutes les expériences ont été réalisées sur 3 échantillons différents. De même, les hydrogels ont systématiquement été placés dans le même sens pour chaque condition d'insolation (dans un moule ou avec la DLP).

La méthode de mesures rhéologiques en oscillation d'hydrogels est délicate et plusieurs protocoles ont été envisagés dans la littérature. Bien qu'il soit préférable de mesurer les propriétés rhéologiques des hydrogels sur des échantillons homogènes continus, car cela permet d'obtenir des résultats plus précis [30], lors des mesures présentées dans cette partie, l'hydrogel a dû être écrasé. En effet, le diamètre de l'hydrogel (15 mm) était plus petit que celui du mobile utilisé (20 mm). Avec une distance d'entrefer égal à l'épaisseur de l'hydrogel, des erreurs de mesures ont été signalées par l'appareil. En écrasant l'hydrogel de manière à ce qu'il soit réparti sur la surface totale du mobile, l'hydrogel glissait jusqu'à sortir de la zone de mesure. En l'écrasant un peu plus, celui-ci se divisait en plusieurs morceaux et des erreurs de mesures ont été détectées. De plus certains morceaux sortaient de la zone de mesure au cours de celle-ci. La distance entrefer a donc été adaptée de manière à avoir une homogénéité des morceaux d'hydrogels en taille et en répartition sur la surface et sans trous d'air, afin d'effectuer les mesures les plus reproductibles possibles et sans erreurs annoncées par le logiciel. Le diamètre maximum de la source UV utilisée étant de 15 mm, il n'a pas été possible d'augmenter le diamètre de l'hydrogel. Des tests avec un hydrogel gonflé et imprimé de même diamètre que celui du mobile ont été réalisés avec une distance entrefer égale à celle de l'épaisseur de l'hydrogel. Cependant, dans ce cas, des erreurs de mesures ont été détectées car l'oscillation se faisait seulement sur la surface de l'hydrogel et non sur l'ensemble de la structure. En diminuant légèrement le gap, l'hydrogel sortait de l'entrefer. Il n'était par ailleurs pas envisageable de diminuer l'épaisseur des hydrogels sans rendre leur manipulation délicate. Il serait possible d'utiliser un plateau et un mobile dentelés pour accrocher et maintenir l'hydrogel [31]. Cette méthode a déjà été reportée dans la littérature mais a été envisagée trop tard au cours de ce projet.

Les méthodes d'indentations n'ayant pas pu être réalisées sur les hydrogels, la méthode de mesures viscoélastiques utilisée ici sur des morceaux individuels **pourrait potentiellement** permettre d'analyser les propriétés rhéologiques locales des hydrogels. Les hydrogels étant

souvent utilisés comme matrices pour la culture cellulaire ou pour la régénération tissulaire. Dans ces applications, les cellules et les tissus ne sont pas en contact avec des hydrogels continus, mais plutôt avec des fragments ou des morceaux d'hydrogels. Dans ce cas, il pourrait être intéressant d'étudier les propriétés mécaniques locales de ces fragments pour mieux définir et comprendre leur interaction avec les cellules et les tissus [32].

RÉFÉRENCES

1. Reza, A.T.; Nicoll, S.B. Characterization of Novel Photocrosslinked Carboxymethylcellulose Hydrogels for Encapsulation of Nucleus Pulposus Cells. *Acta Biomaterialia* 2010, 6, 179–186, doi:10.1016/j.actbio.2009.06.004.
2. Qian, H.; Wang, X.; Yuan, K.; Xie, C.; Wu, W.; Jiang, X.; Hu, L. Delivery of Doxorubicin in Vitro and in Vivo Using Bio-Reductive Cellulose Nanogels. *Biomater. Sci.* 2014, 2, 220–232, doi:10.1039/C3BM60176E.
3. Gupta, M.S.; Nicoll, S.B. Functional Nucleus Pulposus-like Matrix Assembly by Human Mesenchymal Stromal Cells Is Directed by Macromer Concentration in Photocrosslinked Carboxymethylcellulose Hydrogels. *Cell Tissue Res* 2014, 358, 527–539, doi:10.1007/s00441-014-1962-1.
4. Varma, D.M.; Gold, G.T.; Taub, P.J.; Nicoll, S.B. Injectable Carboxymethylcellulose Hydrogels for Soft Tissue Filler Applications. *Acta Biomaterialia* 2014, 10, 4996–5004, doi:10.1016/j.actbio.2014.08.013.
5. Lin, H.A.; Gupta, M.S.; Varma, D.M.; Gilchrist, M.L.; Nicoll, S.B. Lower Crosslinking Density Enhances Functional Nucleus Pulposus-like Matrix Elaboration by Human Mesenchymal Stem Cells in Carboxymethylcellulose Hydrogels: Crosslinking Density Impacts HMSC Chondrogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.* 2016, 104, 165–177, doi:10.1002/jbm.a.35552.
6. Hossen, M.R.; Dadoo, N.; Holomakoff, D.G.; Co, A.; Gramlich, W.M.; Mason, M.D. Wet Stable and Mechanically Robust Cellulose Nanofibrils (CNF) Based Hydrogel. *Polymer* 2018, 151, 231–241, doi:10.1016/j.polymer.2018.07.016.
7. Melilli, G.; Carmagnola, I.; Tonda-Turo, C.; Pirri, F.; Ciardelli, G.; Sangermano, M.; Hakkarainen, M.; Chiappone, A. DLP 3D Printing Meets Lignocellulosic Biopolymers: Carboxymethyl Cellulose Inks for 3D Biocompatible Hydrogels. *Polymers* 2020, 12, 1655, doi:10.3390/polym12081655.
8. Prasad, A.S.; Wilson, J.; Thomas, L.V. Designer Injectable Matrices of Photocrosslinkable Carboxymethyl Cellulose Methacrylate Based Hydrogels as Cell Carriers for Gel Type Autologous Chondrocyte Implantation (GACI). *International Journal of Biological Macromolecules* 2023, 224, 465–482, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.137.
9. Cafiso, D.; Septevani, A.A.; Noè, C.; Schiller, T.; Pirri, C.F.; Roppolo, I.; Chiappone, A. 3D Printing of Fully Cellulose-Based Hydrogels by Digital Light Processing. *Sustainable Materials and Technologies* 2022, 32, e00444, doi:10.1016/j.susmat.2022.e00444.
10. Zhang, J.; Huang, D.; Liu, S.; Yang, Z.; Dong, X.; Zhang, H.; Huang, W.; Zhou, S.; Wei, Y.; Hua, W.; et al. Water Soluble Photocurable Carboxymethyl Cellulose-based Bioactive Hydrogels for Digital Light Processing. *J of Applied Polymer Sci* 2022, 52155, doi:10.1002/app.52155.
11. Dutta, S.; Samanta, P.; Dhara, D. Temperature, PH and Redox Responsive Cellulose Based Hydrogels for Protein Delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016, 87, 92–100, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.042.
12. Revol, J.-F.; Bradford, H.; Giasson, J.; Marchessault, R.H.; Gray, D.G. Helicoidal Self-Ordering of Cellulose Microfibrils in Aqueous Suspension. *International Journal of Biological Macromolecules* 1992, 14, 170–172, doi:10.1016/S0141-8130(05)80008-X.
13. Nishiyama, Y.; Langan, P.; Chanzy, H. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-Ray and Neutron Fiber Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 9074–9082, doi:10.1021/ja0257319.
14. Eyley, S.; Thielemans, W. Surface Modification of Cellulose Nanocrystals. 2014, 16.
15. Azzam, F.; Frka-Petesic, B.; Semeraro, E.F.; Cousin, F.; Jean, B. Small-Angle Neutron Scattering Reveals the Structural Details of Thermosensitive Polymer-Grafted Cellulose Nanocrystal Suspensions. *Langmuir* 2020, 36, 8511–8519, doi:10.1021/acs.langmuir.0c01103.

16. Tomal, W.; Ortyl, J. Water-Soluble Photoinitiators in Biomedical Applications. *Polymers* 2020, 12, 1073, doi:10.3390/polym12051073.
17. Niskanen, I.; Suopajarvi, T.; Liimatainen, H.; Fabritius, T.; Heikkilä, R.; Thungström, G. Determining the Complex Refractive Index of Cellulose Nanocrystals by Combination of Beer-Lambert and Immersion Matching Methods. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 2019, 235, 1–6, doi:10.1016/j.jqsrt.2019.06.023.
18. Sisson, W.A. X-Ray Diffraction Behaviour of Cellulose Derivatives. *Ind. Eng. Chem.* 1938, 30, 530–537, doi:10.1021/ie50341a012.
19. Darpentigny, C.; Molina-Boisseau, S.; Nonglaton, G.; Bras, J.; Jean, B. Ice-Templated Freeze-Dried Cryogels from Tunicate Cellulose Nanocrystals with High Specific Surface Area and Anisotropic Morphological and Mechanical Properties. *Cellulose* 2020, 27, 233–247, doi:10.1007/s10570-019-02772-8.
20. Abitbol, T.; Kloser, E.; Gray, D.G. Estimation of the Surface Sulfur Content of Cellulose Nanocrystals Prepared by Sulfuric Acid Hydrolysis. *Cellulose* 2013, 20, 785–794, doi:10.1007/s10570-013-9871-0.
21. Baier Leach, J.; Bivens, K.A.; Patrick Jr., C.W.; Schmidt, C.E. Photocrosslinked Hyaluronic Acid Hydrogels: Natural, Biodegradable Tissue Engineering Scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.* 2003, 82, 578–589, doi:10.1002/bit.10605.
22. Hoti, G.; Caldera, F.; Ceccone, C.; Rubin Pedrazzo, A.; Anceschi, A.; Appleton, S.L.; Khazaei Monfared, Y.; Trotta, F. Effect of the Cross-Linking Density on the Swelling and Rheological Behavior of Ester-Bridged β -Cyclodextrin Nanosponges. *Materials* 2021, 14, 478, doi:10.3390/ma14030478.
23. Xia, Z.; Patchan, M.; Maranchi, J.; Elisseeff, J.; Trexler, M. Determination of Crosslinking Density of Hydrogels Prepared from Microcrystalline Cellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* 2013, 127, 4537–4541, doi:10.1002/app.38052.
24. Torres-Lugo, M.; Peppas, N.A. Molecular Design and in Vitro Studies of Novel PH-Sensitive Hydrogels for the Oral Delivery of Calcitonin. *Macromolecules* 1999, 32, 6646–6651, doi:10.1021/ma990541c.
25. Cleland, R.L. Ionic Polysaccharides. IV. Free-Rotation Dimensions for Disaccharide Polymers. Comparison with Experiment for Hyaluronic Acid. *Biopolymers* 1970, 9, 811–824, doi:10.1002/bip.1970.360090707.
26. Călina, I.; Demeter, M.; Scărișoreanu, A.; Micutz, M. Development of Novel Superabsorbent Hybrid Hydrogels by E-Beam Crosslinking. *Gels* 2021, 7, 189, doi:10.3390/gels7040189.
27. Holtzer, A.M.; Benoit, H.; Doty, P. The Molecular Configuration and Hydrodynamic Behavior of Cellulose Trinitrate. *J. Phys. Chem.* 1954, 58, 624–634, doi:10.1021/j150518a009.
28. Stojkov, G.; Niyazov, Z.; Picchioni, F.; Bose, R.K. Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications. *Gels* 2021, 7, 255, doi:10.3390/gels7040255.
29. Bonino, C.A.; Samorezov, J.E.; Jeon, O.; Alsberg, E.; Khan, S.A. Real-Time in Situ Rheology of Alginate Hydrogel Photocrosslinking. *Soft Matter* 2011, 7, 11510, doi:10.1039/c1sm06109g.
30. Zuidema, J.M.; Rivet, C.J.; Gilbert, R.J.; Morrison, F.A. A Protocol for Rheological Characterization of Hydrogels for Tissue Engineering Strategies: A Protocol for Rheological Characterization of Hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* 2014, 102, 1063–1073, doi:10.1002/jbm.b.33088.
31. Kamkar, M.; Janmaleki, M.; Erfanian, E.; Sanati-Nezhad, A.; Sundararaj, U. Viscoelastic Behavior of Covalently Crosslinked Hydrogels under Large Shear Deformations: An Approach to Eliminate Wall Slip. *Physics of Fluids* 2021, 33, 041702, doi:10.1063/5.0046801.
32. Chaudhuri, O.; Cooper-White, J.; Janmey, P.A.; Mooney, D.J.; Shenoy, V.B. Effects of Extracellular Matrix Viscoelasticity on Cellular Behaviour. *Nature* 2020, 584, 535–546, doi:10.1038/s41586-020-2612-2.

CHAPITRE III.

***Synthèse et mise en forme de
formulations aqueuses de
carboxyméthylcellulose méthacrylate***

III.1. INTRODUCTION

La méthacrylation de la carboxyméthylcellulose (CMC) avec de l'anhydride méthacrylique (AM) a été développée dans la littérature depuis 2010 afin de produire de la carboxyméthylcellulose méthacrylate (mCMC) [1–12] (cf. I.6.2). Les hydrogels de mCMC ont été envisagés pour diverses applications biomédicales telles que l'encapsulation de cellules, l'ingénierie tissulaire ou la délivrance de médicaments [1,6,11,12]. En revanche, les cryogels de mCMC n'ont jamais été étudiés. Ces matériaux spongieux ont la capacité d'absorber une grande quantité de liquide grâce à leur porosité élevée, ce qui les rend intéressants pour le transport de nutriments ou de cellules à travers des *scaffolds* [13,14]. Enfin, le groupe de recherche du docteur Chappione a réussi à fabriquer des hydrogels de mCMC par digital light processing (DLP), mais les objets obtenus présentaient une résolution limitée et les méthodes visant à l'améliorer réduisaient les propriétés viscoélastiques de ces derniers [3,10].

Pour obtenir des structures et des propriétés d'hydrogels et de cryogels de mCMC adaptées à des applications biomédicales spécifiques, il est crucial de contrôler le degré de méthacrylation (DM) de la mCMC, comme cela a été démontré pour d'autres polysaccharides tels que le dextrane et la gélatine méthacrylate [15,16]. Une augmentation du DM permet de densifier le réseau réticulé et de renforcer la structure mécaniquement. En conséquence, le gonflement est plus faible et la vitesse de dégradation plus lente. Cependant, dans toutes les études précédentes, le DM de la mCMC a été peu étudié et contrôlé, ce qui limite la compréhension et la capacité à maîtriser les propriétés des hydrogels. De plus, l'influence de la concentration en polymère, qui peut jouer un rôle majeur dans les propriétés structurales et mécaniques des hydrogels et cryogels à base de mCMC, a également été peu explorée jusqu'à présent.

Ce chapitre III présente le développement et les méthodes employées afin de contrôler le degré de méthacrylation des mCMC sur une large gamme. Cette étude examine également l'influence du DM et de la concentration de la mCMC, sur les propriétés structurales et physiques des matériaux photo-réticulés, qu'ils soient sous forme d'hydrogels ou de cryogels. Une grande majorité de ce travail a fait l'objet d'une publication publiée dans le journal *Cellulose* [17].

III.2. SYNTHÈSE DE LA CARBOXYMÉTHYLCELLULOSE MÉTHACRYLATE

Cette section décrit le greffage de groupements méthacrylates sur la CMC en utilisant la réaction avec l'anhydride méthacrylique (AM), présentée dans la partie I.6.2 (**Figure III-1**). Brièvement, la CMC est solubilisée dans l'eau, puis l'AM est ajouté goutte à goutte à température ambiante. Le pH est ajusté entre 8 et 10 par l'ajout de soude (section II.3.1.1). L'optimisation de chaque paramètre du protocole a permis de contrôler la synthèse et de produire une mCMC avec le DM désiré. L'effet de la masse molaire de la CMC n'a pas été étudié et seul un polymère de 90 kg/mol a été utilisé (Blanose, Ashland). D'après la littérature, une faible masse molaire permet d'obtenir une viscosité de solution plus faible et une meilleure fonctionnalisation [1,6,18]. De même, le degré de substitution des carboxylates (DS) de la CMC n'a pas été étudié. La CMC utilisée présentait un DS de 0,7. Enfin, ce travail d'optimisation a été consolidé par le travail de Flavie Pradalié, stagiaire de M1 sous ma supervision au CERMAV.

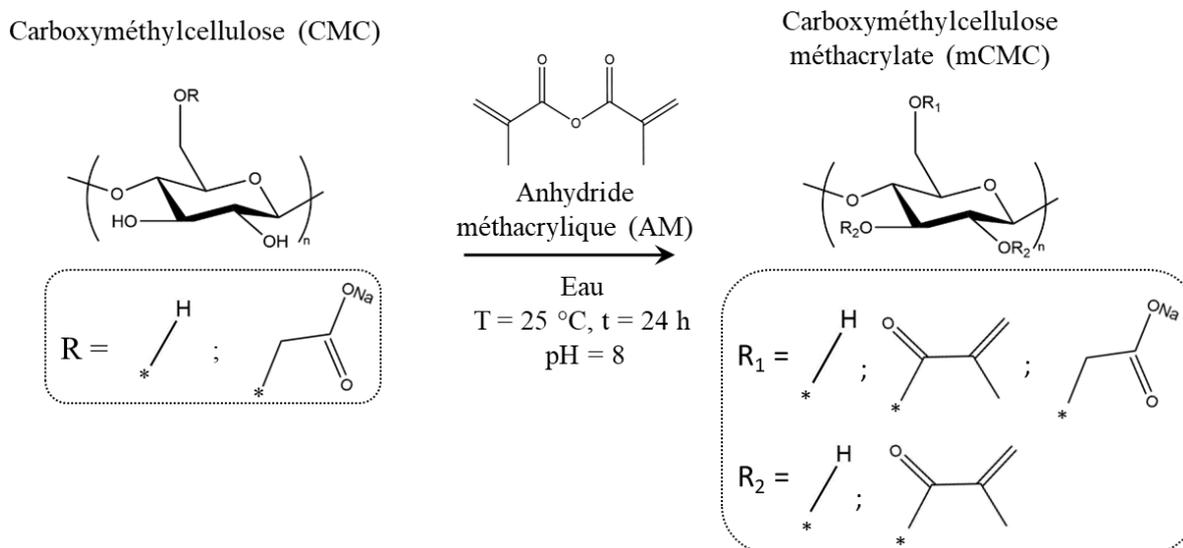


Figure III-1 : Méthacrylation de la carboxyméthylcellulose (CMC) avec de l'anhydride méthacrylique (AM) dans l'eau à 25 °C pour obtenir la carboxyméthylcellulose méthacrylate (mCMC).

III.2.1. DÉTERMINATION DU DEGRÉ DE MÉTHACRYLATION

Dans cette section est décrit les méthodes expérimentales employées pour déterminer le DM. Les résultats des analyses sont décrits dans les sections suivantes.

Tout d'abord, toutes les mCMC produites dans ce travail ont été caractérisées par spectroscopie FT-IR (**Figure III-2**). La CMC possède une large bande entre 3000 et 3650 cm^{-1} correspondant aux groupements OH. La bande de vibration ν des liaisons C-H apparaît à

2907 cm^{-1} . Les bandes de la vibration ν antisymétrique (1590 cm^{-1}), et symétrique (1407 cm^{-1} et 1312 cm^{-1}) correspondent à celle des groupements carboxylates (COO^-). A 1043 cm^{-1} apparaît la bande caractéristique des liaisons C-O-C des unités glucosiques de la CMC et des mCMC [19,20]. Enfin, l'apparition d'une bande correspondant au groupement carbonyle (C=O) du méthacrylate à 1705 cm^{-1} sur les spectres des mCMC par rapport au spectre de la CMC, permet de montrer qualitativement le succès de la méthacrylation [3].

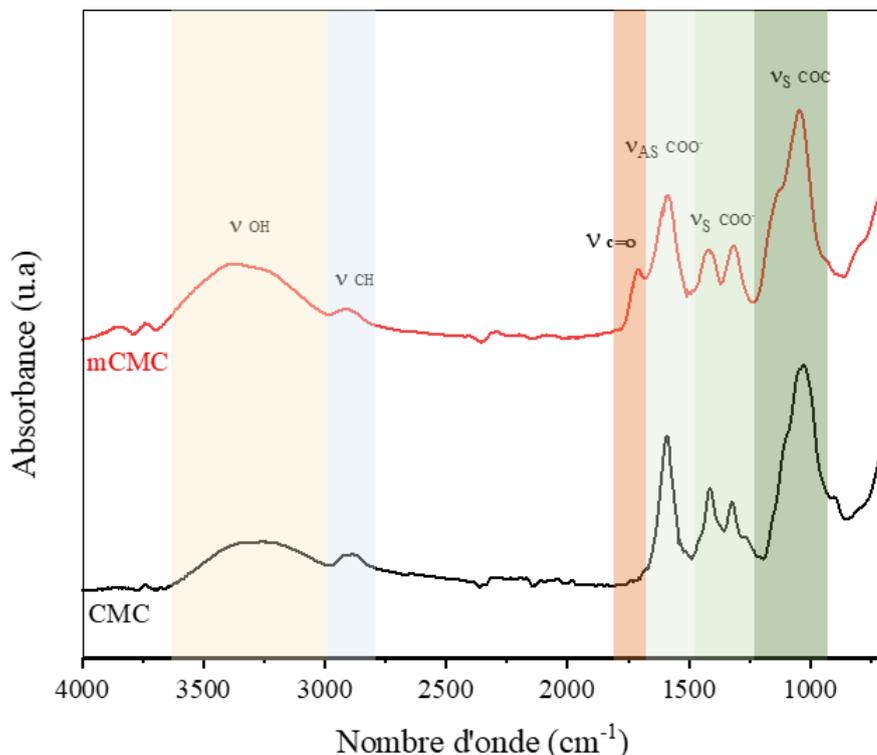


Figure III-2 : Spectres FT-IR de la carboxyméthylcellulose (CMC, en noir) et de la carboxyméthylcellulose méthacrylate (mCMC, en rouge). Sur cet exemple, la méthacrylation a été réalisée avec un ratio molaire en anhydride méthacrylique par groupement hydroxyle de la CMC de 2,48 ($N_{eq} AM/OH_{CMC}$).

Ensuite, les produits sont caractérisés par RMN ^1H liquide et comparés à la CMC brute pour déterminer le degré de méthacrylation (**Figure III-3**). Les protons de l'unité répétitive de la CMC (H_{CMC}) sont situés dans le massif entre 2,8 et 4,7 ppm et représentent 8,4 protons en considérant le DS de 0,7 (**Figure III-3a**) [2,3]. Dans le cas des mCMC, trois pics supplémentaires correspondant aux protons vinyliques (H_a : 6,0 - 6,4 ppm, H_b : 5,65 - 6,0 ppm) et aux protons des méthyles (H_c : 1,7 - 2,2 ppm) des groupes méthacrylates sont également présents après purification, indiquant que la méthacrylation s'est produite dans les conditions expérimentales (**Figure III-3b**) [21]. Enfin, l'intensité des pics des protons des groupements méthacrylates augmente avec le nombre d'équivalents en AM par groupement hydroxyle de la CMC, indiquant que la méthacrylation augmente. Pour le confirmer, le degré de méthacrylation

(DM) des mCMC est calculé à partir des intégrales respectives des protons du vinyle ($H_a + H_b$) et de ceux de la CMC (H_{CMC}), selon l'équation III-1.

$$DM (\%) = \frac{H_a + H_b}{H_{CMC}} \times \frac{8.4}{2} \times 100 \quad (\text{Equation III-1})$$

Dans ce calcul du DM, l'incertitude provient du nombre de synthèses réalisées, de la résolution des spectres RMN des produits obtenus, mais aussi de traitement de ces derniers et notamment de l'intégration des protons de la CMC avec lesquels le signal du H_2O (4,7 ppm) présent dans le D_2O ou adsorbée par les chaînes de mCMC est confondu (Annexe III-1).

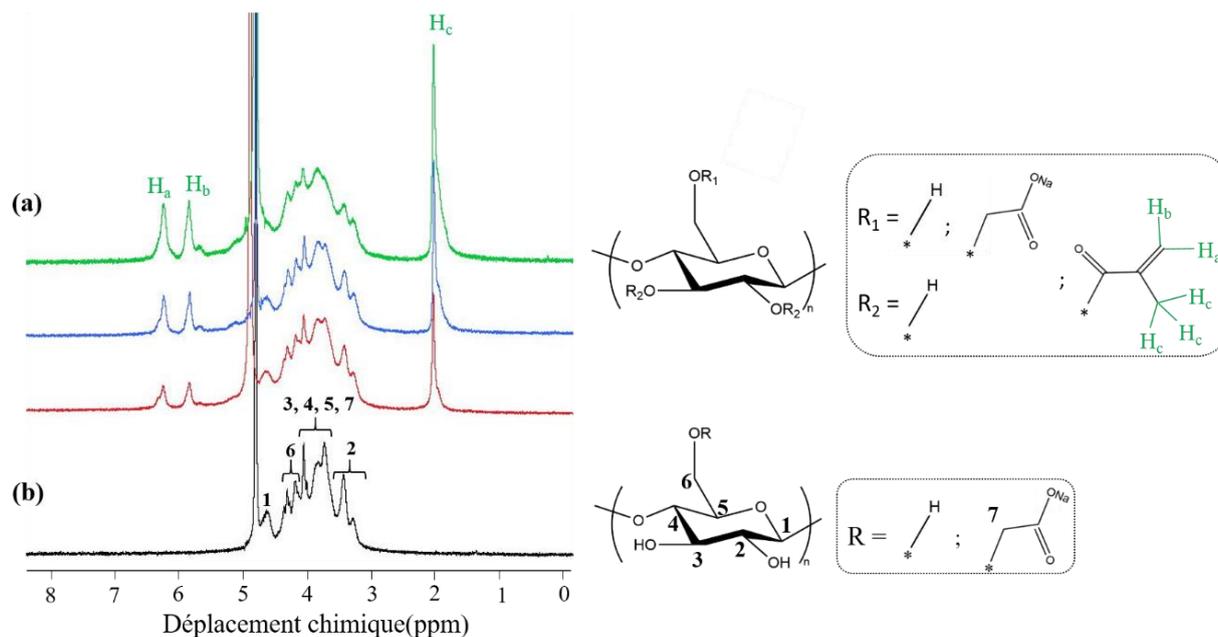


Figure III-3 : Spectres RMN liquide du proton (a) de la mCMC synthétisée avec un nombre d'équivalents en anhydride méthacrylique par groupe hydroxyle de la CMC du bas vers le haut de, 1,24 (rouge), 2,48 (bleu) et 4,96 (vert) et (b) de la CMC (noir).

L'estérification de la CMC a lieu grâce à la déprotonation des groupements hydroxyyles par l'ajout de NaOH (Figure III-4). L'ion alcoolate résultant réagit avec l'un des carbones des groupements carbonyles de l'AM, conduisant à la libération de l'ion méthacrylate. Ce mécanisme est celui d'une addition suivie d'une élimination. La méthacrylation de la CMC devrait d'abord se produire de manière préférentielle sur les groupes hydroxyyles primaires en C6 restants, qui sont plus réactifs [22]. Une fois que tous ces groupements sont consommés, la méthacrylation se produit alors sur les hydroxyyles secondaires en C2 et C3. La réaction entre le groupe carboxylate de la CMC et l'AM est peu probable, car le groupe carboxylate est stabilisé par des effets mésomères. De plus, la mCMC reste soluble dans l'eau, ce qui prouve la conservation des carboxylates. Cependant, il est difficile de vérifier ces hypothèses par des caractérisations conventionnelles. Néanmoins, des avancées récentes en RMN à polarisation

nucléaire dynamique (RMN DNP) peuvent permettre de déterminer la régiosélectivité de la réaction, comme l'ont fait Berruyer *et al.* avec une méthylcellulose substituée [23].

Cette réaction de méthacrylation est en compétition avec une réaction secondaire d'hydrolyse de l'AM. En effet, l'ion hydroxyle peut venir directement réagir sur les groupements carbonyles de l'AM amenant à la libération de l'ion méthacrylate. Il est donc nécessaire d'ajouter le réactif en excès par rapport aux groupements hydroxyles de la CMC.

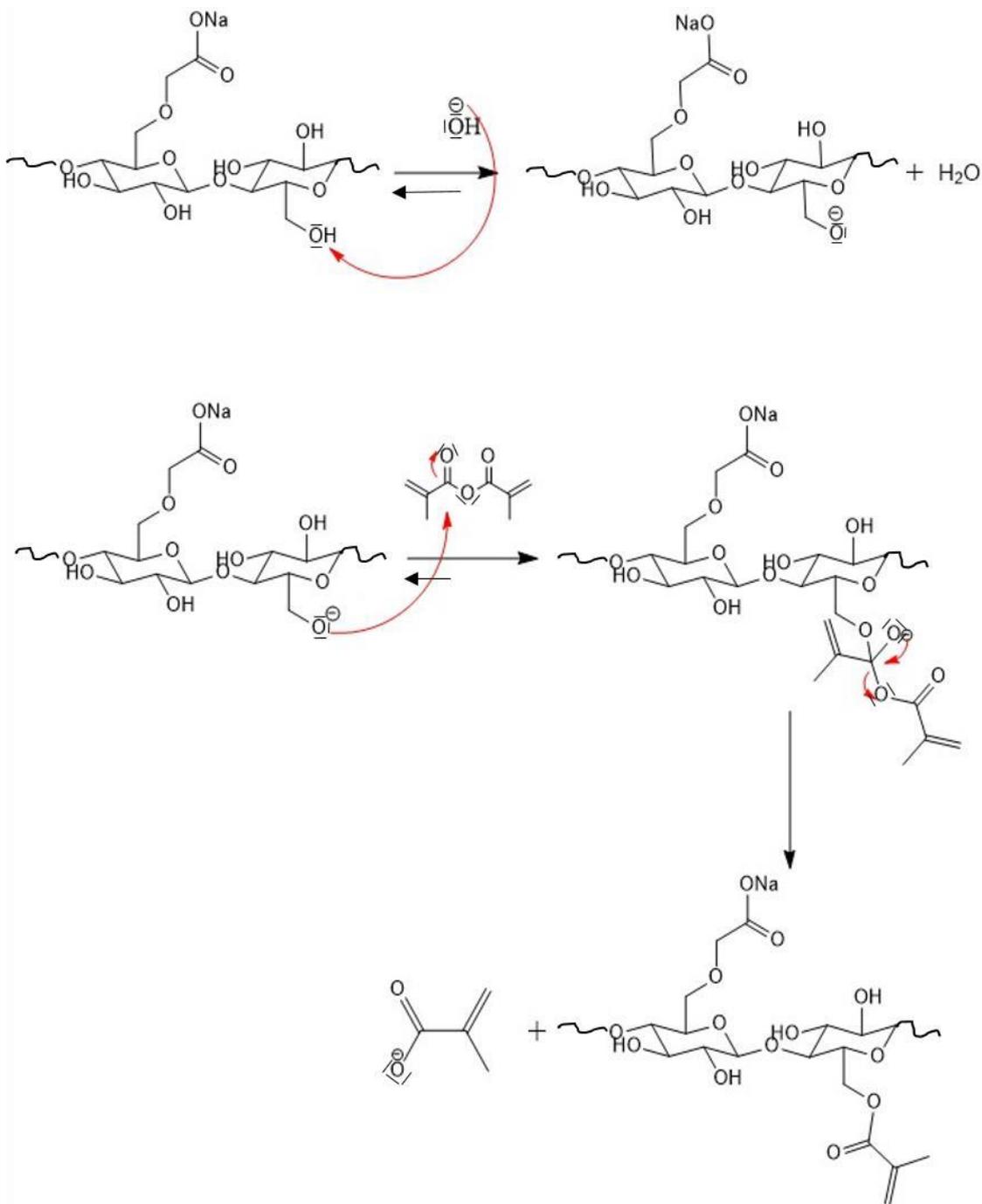


Figure III-4 : Mécanisme réactionnel proposé pour la réaction entre la CMC et l'AM en milieu aqueux en conditions basiques ($\text{pH} = 8-10$). La CMC avec un $\text{DS} = 0,7$ est majoritairement substituée en C6 par les groupements carboxylates.

III.2.2. INFLUENCE DES PARAMÈTRES DU PROTOCOLE SUR LE DM

III.2.2.1. Effet de la température et du nombre d'équivalents en AM/OH_{CMC}

Dans la littérature, la réaction de méthacrylation de la CMC n'a été réalisée qu'à basse température (0 ou 4 °C) [1–12]. Cependant, aucune influence de la température n'a été observée dans cette étude en comparant les DM obtenus après 24 h, pour des réactions effectuées à 0 °C ou à température ambiante et avec une agitation de 700 tr/min, en faisant varier le nombre d'équivalents en AM par rapport aux groupements hydroxyles de la CMC (N_{eq} AM/OH_{CMC}) jusqu'à 2,48 (**Figure III-5**). En revanche, le nombre d'équivalents présente un effet important sur le DM obtenu, ce qui n'était pas observable dans les résultats issus de la littérature (**Tableau I-5**). En effet, ce dernier augmente avec l'augmentation de la quantité d'AM ajoutée. A 25 °C, le DM augmente linéairement jusqu'à 4,96 équivalents d'AM et atteignant un DM de 47 ± 4 % et ensuite un plateau est atteint. Il apparaît un DM maximal autour de 50 %, qui ne dépend plus de la quantité d'anhydride méthacrylique ajoutée. Une synthèse réalisée avec $N_{eq} = 7,42$ pendant 48 h a ainsi donné un DM de 53 ± 5 %. Ce résultat indique que la réaction est bien terminée après 24h. A faible agitation (700 tr/min), l'hydrolyse de l'AM est prédominante et ne permet plus l'évolution du DM après l'ajout d'une quantité importante d'AM. En ce sens, le paramètre « agitation » est étudié dans la partie III.2.2.4. Enfin, il convient aussi de noter qu'un nombre d'équivalents élevé n'est pas convenable pour correspondre aux conventions d'économie d'atome. **Les réactions décrites dans la suite ont été plus commodément effectuées à température ambiante.**

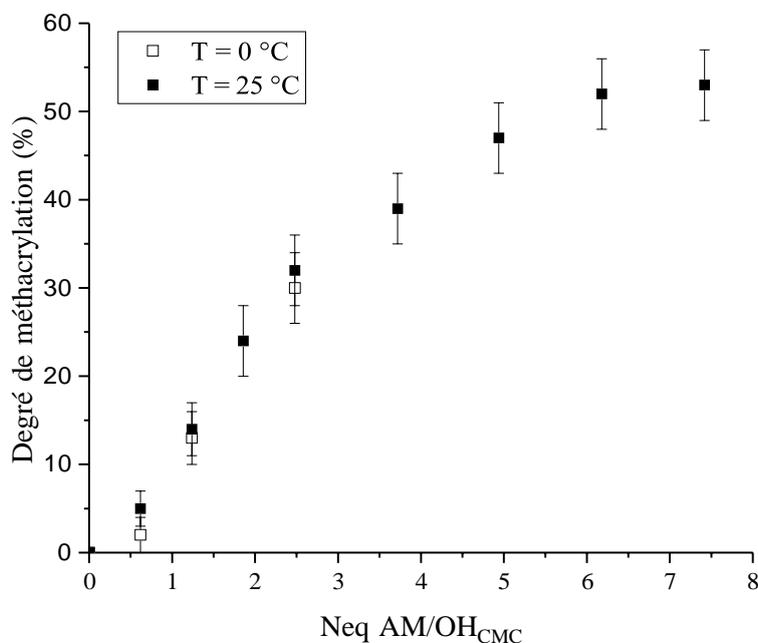


Figure III-5 : Evolution du DM après 24 h de réaction avec l'augmentation du nombre d'équivalents d'anhydride méthacrylique par fonction hydroxyle de la CMC à 25 °C et 0 °C avec une agitation magnétique de 700 tr/min. La concentration initiale en CMC était de 2 %m et de la soude à 10 M a été ajoutée.

III.2.2.2. Effet du pH

Dans les protocoles décrits dans la littérature, le pH doit continuellement être ajusté au plus proche de 8 avec de la soude. Cette étude se concentre sur l'effet du pH sur la méthacrylation de la CMC. L'histogramme de la **Figure III-6** représente le degré de méthacrylation obtenu après 24 h de réaction en fonction du pH auquel s'est déroulé la synthèse. Tout d'abord, le pH de la solution non tamponnée de la CMC utilisée, est de 6,5 (pKa CMC = 4,3). Lorsque de la soude est ajoutée de manière à contrôler le pH autour de 8, le DM atteint est de 53 ± 5 % et lorsque le pH fixé est supérieur à 10, le DM est de 6 ± 1 %. Dans le dernier cas, l'ajout de soude est plus important augmentant l'hydrolyse de l'AM en compétition avec la méthacrylation.

Quand de la soude n'est pas ajoutée, le milieu réactionnel devient très vite acide (pH = 4,53) et aucune méthacrylation de la CMC n'est constatée. Cette diminution rapide du pH est causée probablement par la libération de l'acide méthacrylique (pKa = 4,7) et donc par l'hydrolyse de l'AM. Ces résultats permettent de convenir d'un pH de synthèse optimum autour de 8, et confirmerait l'hypothèse qu'en dessous et au-dessus de l'intervalle de valeurs pH = 8-10, l'hydrolyse de l'anhydride méthacrylique prédominerait sur l'activation des groupes hydroxyles de la CMC permettant la réaction avec l'anhydride. Pour éviter de devoir ajouter fréquemment du NaOH lors de la synthèse et afin d'améliorer la précision du pH, une alternative serait d'utiliser une solution tampon à pH = 8. Cependant, cela pourrait réduire la solubilité de la CMC en présence des sels du tampon, entraînant ainsi un changement de réactivité. De plus, la présence d'ions HO⁻ est essentielle pour déprotoner les groupements hydroxyles de la CMC. Dans une solution tamponnée, la base pourrait ne pas être suffisamment forte pour effectuer cette étape, rendant impossible la réalisation de la méthacrylation.

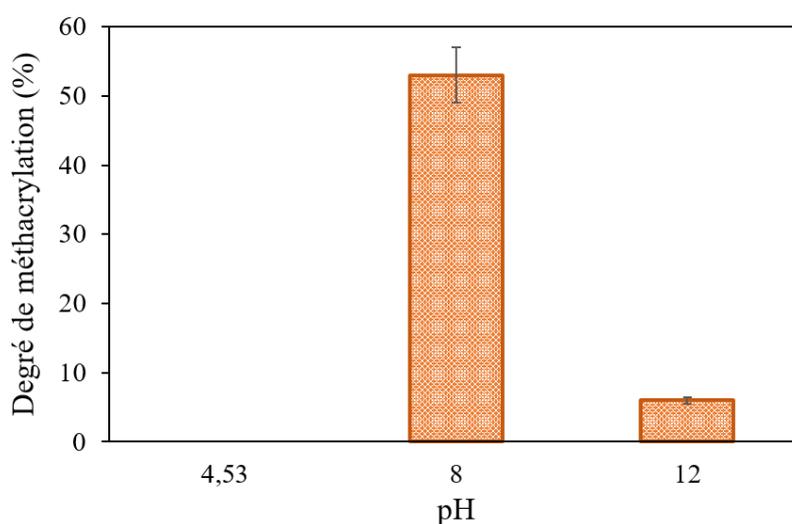


Figure III-6 : Influence du pH du milieu réactionnel sur le DM de la mCMC après 24 h à 700 tr/min et avec 4,96 équivalents. La concentration initiale en CMC était de 2 %m et de la soude à 10 M a été ajoutée.

III.2.2.3. Effet de la concentration initiale en CMC

Toutes les synthèses précédentes ont été réalisées avec une concentration initiale de CMC constante de 2 %m. Dans la littérature, cette concentration initiale est généralement de 1 ou 2 %m indépendamment de la masse molaire de la CMC et de son DS. Dans cette partie, l'objectif est d'étudier l'importance de la concentration en CMC sur le DM tout en augmentant le nombre d'équivalents d'AM engagés dans la réaction (**Figure III-7**). Pour un même nombre d'équivalents, la réaction avec 4 %m de CMC ne permet pas d'obtenir des DM significativement supérieurs qu'avec 2 %m de CMC. Cette faible différence peut s'expliquer par la contrebalance exercée entre l'augmentation du nombre de collisions possibles entre les groupements hydroxyles de la CMC et l'AM à 4 %m par rapport à 2 %m, et l'augmentation de la viscosité qui diminue ce même nombre à concentration plus élevée. Cependant, en augmentant encore la concentration, la viscosité devient trop importante et la diffusion de l'AM ne peut pas se faire correctement dans les conditions d'agitation utilisées (agitation magnétique 700 tr/min). En conséquence, à 6 %m de CMC, le DM est plus faible que pour les réactions à 2 et 4 %m. Dans cette étude, des concentrations en CMC inférieures à 2 %m n'ont pas été étudiées. Par la suite, toutes les réactions ont été réalisées avec une concentration de 2 %m de CMC dans l'eau.

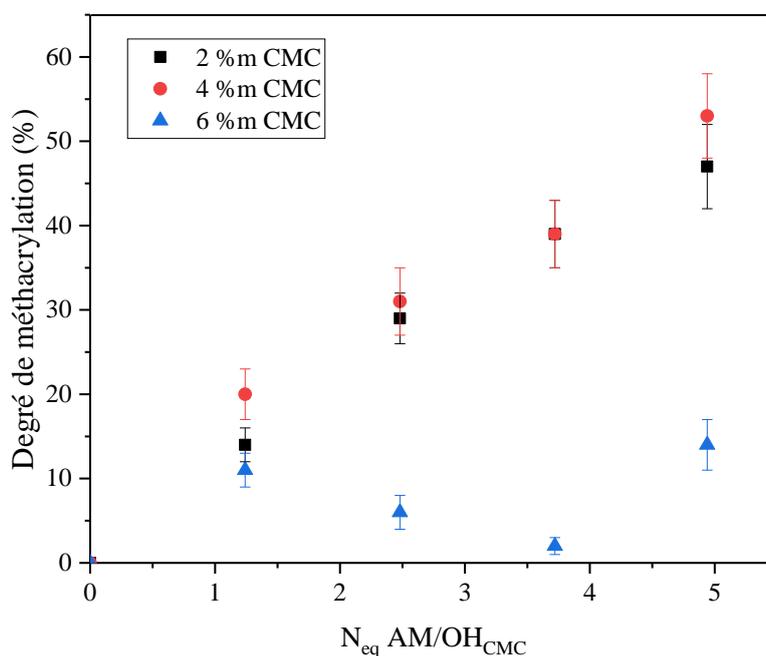


Figure III-7 : Evolution du DM de mCMC obtenues après 24 h de réaction sous agitation magnétique de 700 tr/min, en fonction de la concentration initiale de CMC (de 2 à 6 %m) et du nombre d'équivalents d'anhydride méthacrylique par fonction hydroxyle (de 0 à 4,96 eq).

III.2.2.4. Effet de la vitesse et du type d'agitation

La vitesse d'agitation et le type d'agitation utilisés ont une influence sur le DM (**Figure III-8**). Ces deux paramètres n'ont jamais été discutés dans la littérature. Dans le cas des synthèses à petite échelle « *lab-scale* » (100 mL), l'agitation est magnétique et est effectuée avec un barreau aimanté. Dans des conditions similaires de réaction, la taille du barreau aimanté de la même forme n'a pas d'influence sur la valeur moyenne DM final (**Annexe III-2**). Un barreau aimanté de 4 cm a donné un DM de $53 \pm 5 \%$ alors qu'un barreau de 2 cm a permis d'obtenir un DM de $47 \pm 5 \%$. L'agitation est donc plus efficace et la diffusion se fait mieux avec un barreau plus grand. Pour ce même type d'agitation, en augmentant la vitesse d'agitation de 700 à 1400 tr/min le DM augmente pour des N_{eq} AM/OH_{CMC} de 4,96 et 6,18 (**Figure III-8**). Pour un nombre d'équivalents de 4,96, une agitation magnétique à 700 tr/min ou 1400 tr/min mène à un DM de $47 \pm 5 \%$ ou de $58 \pm 5 \%$, respectivement. De même, avec un nombre d'équivalents de 6,18, les DM obtenus sont de $50 \pm 5 \%$ et $74 \pm 5 \%$.

Dans le cas de l'agitation mécanique réalisée lors du changement d'échelle (2,5 L), la vitesse d'agitation est augmentée jusqu'à 2000 tr/min et la forme de la pale utilisée est étudiée (**Figure III-8**). La forme de l'agitateur utilisé (pale ancre ou pale droite) possède une influence non négligeable sur le DM. Tout d'abord, pour les deux conditions, le DM augmente avec l'augmentation du N_{eq} AM/OH_{CMC}, de même que la viscosité du milieu de synthèse. En effet, la fonctionnalisation de la CMC par des groupements méthacrylates augmente la masse molaire du polymère. En conséquence, la viscosité augmente avec le DM. La pale ancre (agitation radiale) couvre davantage de volume de solution que la pale droite (agitation tangentielle), l'agitation est donc plus efficacement menée et permet d'atteindre un DM de $76 \pm 6 \%$ pour la pale ancre et de $62 \pm 5 \%$ avec une pale droite pour 4,94 équivalents. Le passage à grande échelle « *scale-up* » (2,5 L) et à l'utilisation d'une agitation mécanique par une pale ancre a ainsi produit des mCMC possédant un DM plus important que dans les conditions de l'échelle laboratoire. En somme, l'AM n'étant pas soluble dans l'eau, il est nécessaire de cisailer au mieux les gouttelettes non miscibles pour atteindre des DM élevés. Pour cela, une agitation importante et de type adapté est nécessaire pour que la réaction soit la plus efficace possible. Enfin, il est possible qu'un DM maximal soit atteignable en augmentant le nombre d'équivalents en AM. En effet, la solubilité de la mCMC produite diminue avec l'augmentation du DM au cours de la synthèse, étant donné que les groupements méthacrylates sont hydrophobes. L'influence de la concentration en CMC n'a pas été étudiée avec une agitation mécanique.

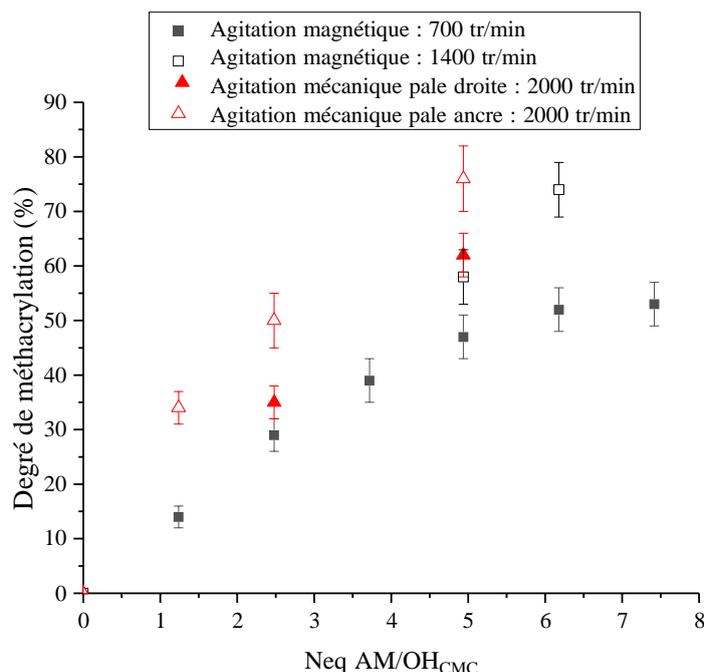


Figure III-8 : Evolution du DM après 24 h de réaction avec l'augmentation du nombre d'équivalents d'anhydride méthacrylique par fonction hydroxyle, pour des vitesses et des types d'agitation différents dans les conditions « échelle laboratoire » ($V = 100$ mL, agitation magnétique) et « grande échelle » ($V = 2,5$ L, agitation mécanique).

En conclusion, les paramètres les plus influents sur la méthacrylation sont le nombre d'équivalents en AM par rapport aux groupes hydroxyles de la CMC, la vitesse d'agitation et le type d'agitation employé ainsi que la concentration en CMC. Le pH est un paramètre essentiel mais celui-ci a toujours été ajusté autour de 8 dans la littérature. La température n'a pas d'influence.

Il convient de noter que le DM maximal obtenu dans ce travail est de 76 ± 6 %, soit 7 % de plus que le DM maximal rapporté dans la littérature (DM = 69 %) par Prasad *et al.* [8]. Les conditions utilisées dans leurs travaux, avec une quantité de 20 mL d'AM ajoutée dans 2 %m de CMC solubilisée dans l'eau sont proches de la réaction à 1400 tr/min et $N_{eq} AM/OH_{CMC} = 6,18$ (24 mL d'AM) dans ce travail, où le DM obtenu est de 74 ± 5 %. Cependant, le spectre RMN présenté dans la publication de Prasad *et al.* ne correspond pas à celui d'une mCMC tel qu'obtenu dans d'autres publications ou dans ce travail [3,7].

Melilli *et al.* ont obtenu un DM de 60 % avec une quantité d'AM de 8 mL dans une solution de CMC (250 kg/mol) à 2 %m dans l'eau [3]. Dans les mêmes conditions de concentration et de volume en AM et en CMC (90 kg/mol), le DM maximal obtenu dans ce travail est de 29 ± 3 %. En revanche, il est difficile de comparer ces deux valeurs car les masses molaires des CMC sont différentes, induisant une viscosité et une réactivité qui ne sont certainement pas les mêmes. De plus, l'équipe de Melilli *et al.* n'indique pas la vitesse d'agitation dans leur publication.

Lin *et al.* décrivent des mCMC avec trois DM (10, 15 et 25 %) différents, sans indication claire sur leurs des conditions de réactions [6]. De plus, dans leurs travaux, en utilisant un volume d'AM de 40 mL pour un volume de synthèse de 100 mL, ce qui correspond à une quantité supérieure à 7,42 équivalents présentée dans cette étude, les DM obtenus sont plus faibles que ceux obtenus dans ce travail (> 60 %). De même, avec la quantité d'AM ajoutée (20 mL) par le groupe de recherche du docteur Nicoll, les DM obtenus sont compris entre 2,87 % et 8,15 % [1,5,12]. Avec ce volume d'AM, équivalent à $N_{eq} AM/OH_{CMC} = 6,18$, le DM est ici supérieur à 50 %.

De plus, comme expliqué dans la partie I.6.2, il est possible que ces auteurs aient réalisés des erreurs ou des différences dans les méthodes d'intégration des protons des spectres RMN des CMC expliquant les différences de rendement.

En revanche, Hossen *et al.* ainsi que Qian *et al.* ont obtenu des DM de 21 % et 11,8 % avec des conditions similaires à celles présentées dans les sections précédentes [4,7]. Le premier a ajouté 3,3 mL à une solution de 2 ‰ de CMC (90 kg/mol) dans l'eau [7]. Ces conditions s'approchent de celles avec 1,24 équivalents (4 mL) où un DM de 14 ± 2 % a été obtenu pour une agitation magnétique à 700 tr/min, et de 34 ± 4 % pour une agitation mécanique avec une pale ancre. Même si une impureté est présente dans leur spectre, Qian *et al.* ont rapporté un DM de 11,8 % en ajoutant 4 mL d'AM à une solution de 2 ‰ de CMC (90 kg/mol) dans l'eau ; proche du DM obtenu dans ce travail avec 1,24 équivalents et une vitesse d'agitation de 700 tr/min. La mCMC obtenue avec une agitation de 1400 tr/min et un $N_{eq} AM/OH_{CMC}$ de 7,42 aurait potentiellement un DM plus important.

En conclusion, les DM obtenus dans cette étude sont du même ordre de grandeur que ceux rapportés dans la littérature. Cependant, les paramètres de réaction ont été soigneusement optimisés pour rendre la synthèse reproductible et permettant ainsi d'obtenir une large gamme de DM, atteignant 76 %.

III.2.3. INFLUENCE DES PARAMÈTRES DU PROTOCOLE SUR LES CINÉTIQUES DE MÉTHACRYLATION

Dans la littérature, la grande majorité des études utilisent des durées de méthacrylation de 24 h. Seule une étude reporte l'utilisation d'une durée plus courte (5,5 h) [7]. Cette partie discute de l'influence des différents paramètres du protocole sur les cinétiques de méthacrylation de la CMC.

III.2.3.1. Effet de la concentration en soude

Tout d'abord, dans la littérature, la concentration en soude ajoutée est dans la plupart des cas est 3 ou 10 M. L'impact de ces deux concentrations sur les cinétiques de méthacrylation a donc été comparé (**Figure III-9**). Tout d'abord, aucune différence sur le DM n'est observée après 24 h de réaction pour les deux concentrations de sodes utilisées. En revanche, pour des temps de réaction inférieurs à 5 h, la méthacrylation est plus lente avec 10 M. En effet, l'ajout de soude concentrée à 3 M entraîne une viscosité du système réactionnel de la CMC plus faible qu'avec 10 M, car le système est plus dilué. En conséquence, la diffusion des réactifs devient moins rapide et la cinétique de réaction ralentit. L'utilisation de soude à 10 M permet de limiter l'effet de dilution, c'est pourquoi cette concentration a été choisie pour la synthèse des mCMC.

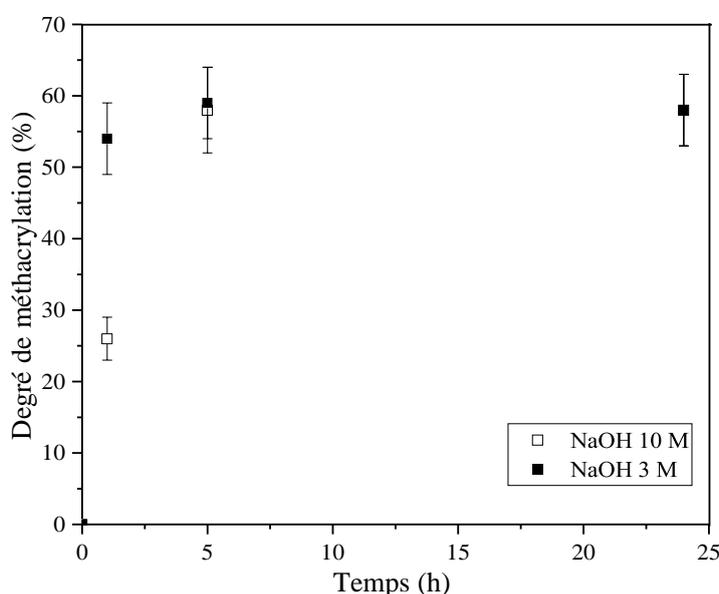


Figure III-9 : Evolution du DM avec la durée de la réaction de méthacrylation, en fonction de la concentration de la soude (3M ou 10M) utilisée pour ajuster le pH à 8-10. Le mélange réactionnel contient 4,96 équivalents de AM/OH_{CMC} et a été agité à 1400 tr/min.

III.2.3.2. Effet de la vitesse et du type d'agitation

L'objectif de cette partie est d'étudier les cinétiques de réaction pour $N_{eq} AM/OH_{CMC} = 4,96$ en fonction de la vitesse et du type d'agitation. En dehors de cette plage de pH, la méthacrylation n'a pas lieu. La **Figure III-10a** montre que pour une agitation magnétique de 700 tr/min, le volume de soude à ajouter, est important lors des trois premières heures car le pH est continuellement en évolution pendant cette période durant laquelle le DM augmente très rapidement de 4 à 41 % dans l'intervalle de temps compris entre 1 et 3 h de réaction. Ensuite, la réaction entre la CMC et l'AM se poursuit plus lentement, jusqu'à un DM de 50 %. Pendant ce temps, l'ajout de soude est beaucoup moins important après 8 h, le pH évoluant faiblement. La même évolution du volume de soude au cours du temps a été observée

dans un milieu réactionnel ne contenant pas de CMC, ce qui démontre bien que l'hydrolyse de l'AM a lieu en parallèle de la méthacrylation. En augmentant la vitesse d'agitation à 2000 tr/min et le type d'agitation (pale droite), la cinétique de méthacrylation devient plus rapide (**Figure III-10b**). Après seulement une heure de réaction, le DM maximal de $62 \pm 5 \%$ est atteint. On observe une évolution plus rapide du volume de soude ajouté que précédemment, en quelques minutes seulement. Dans le cas d'un ratio AM/OH_{CMC} élevé (4,96 équivalents) et d'une forte agitation (2000 tr/min), la température peut par exemple atteindre 50 °C. Des études complémentaires ont prouvé que le DM maximal ($34 \pm 4 \%$) a été atteint après 1 h de réaction pour $N_{eq} \text{ AM/OH}_{CMC} = 1,24$ pour une agitation mécanique réalisée avec la pale encre.

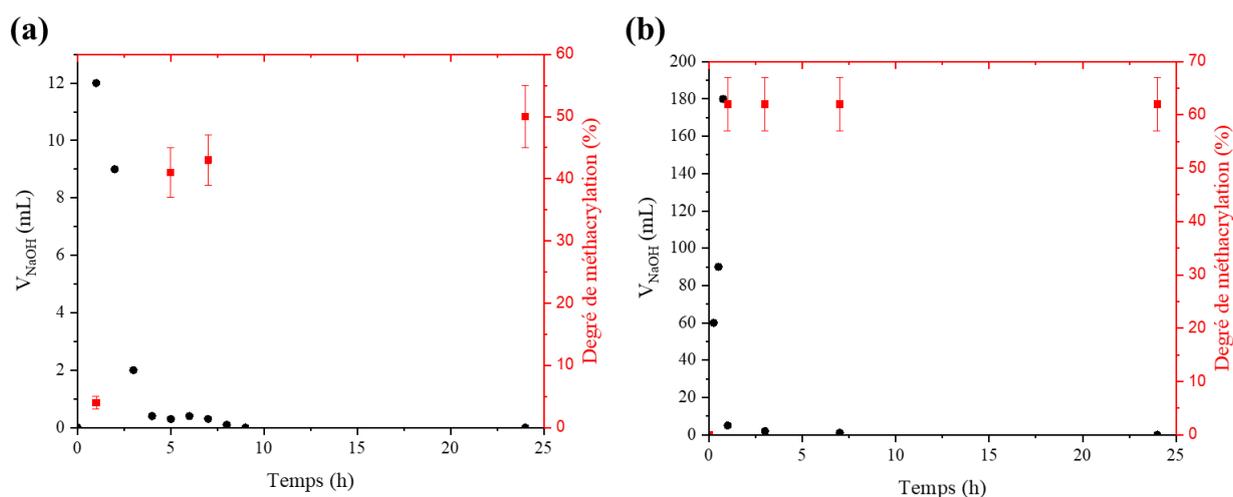


Figure III-10 : Evolution du DM et de l'ajout de soude au cours du temps pour des synthèses réalisées avec 4,96 équivalents d'AM/OH_{CMC} (a) à l'échelle laboratoire (100 ml) avec une agitation magnétique de 700 tr/min et (b) à plus grande échelle (2,5 L) avec une agitation mécanique de 2000 tr/min avec une pale droite. La concentration en CMC est de 2 %m.

L'agitation est donc un paramètre essentiel pour contrôler les cinétiques de méthacrylation. La **Figure III-11a** représente l'évolution du DM en fonction du temps pour deux vitesses d'agitation magnétique. En augmentant la vitesse d'agitation de 700 à 1400 tr/min, le DM augmente plus rapidement au cours du temps. Après 1 h de réaction, le DM est de $26 \pm 3 \%$ à 1400 tr/min alors qu'il est seulement de $4 \pm 1 \%$ à 700 tr/min. De plus, le DM est maximal atteint avant 5 h pour une vitesse d'agitation de 1400 tr/min, alors qu'à 700 tr/min, le DM évolue encore dans l'intervalle de temps compris entre 7 h et 24 h de réaction. Une agitation plus rapide dans des conditions de réaction similaires permet ainsi d'améliorer la diffusion des réactifs et donc d'augmenter le nombre de collisions. La fonctionnalisation est plus efficace sur une courte durée et permet d'atteindre un taux de greffage maximum plus rapidement. Ce phénomène est aussi observé en augmentant le $N_{eq} \text{ AM/OH}_{CMC}$ pour une même vitesse d'agitation (**Figure III-11b**). Pour un ratio AM/OH_{CMC} de 7,42 équivalents, le DM maximal de $51 \pm 5 \%$ est atteint dans la première heure de réaction, alors que la fonctionnalisation n'est que de $4 \pm 1 \%$ pour 4,96 équivalents au même temps de prélèvement. Une quantité plus importante d'AM permet d'augmenter le nombre de collisions avec les

alcoolates de la CMC en même temps que s'effectue l'hydrolyse de l'AM. Enfin, à 700 tr/min et avec 4,96 équivalents, la cinétique de réaction est plus rapide avec un barreau de 4 cm en comparaison à celui de 2 cm, grâce à une meilleure homogénéité apportée par un barreau plus grand (**Annexe III-2**).

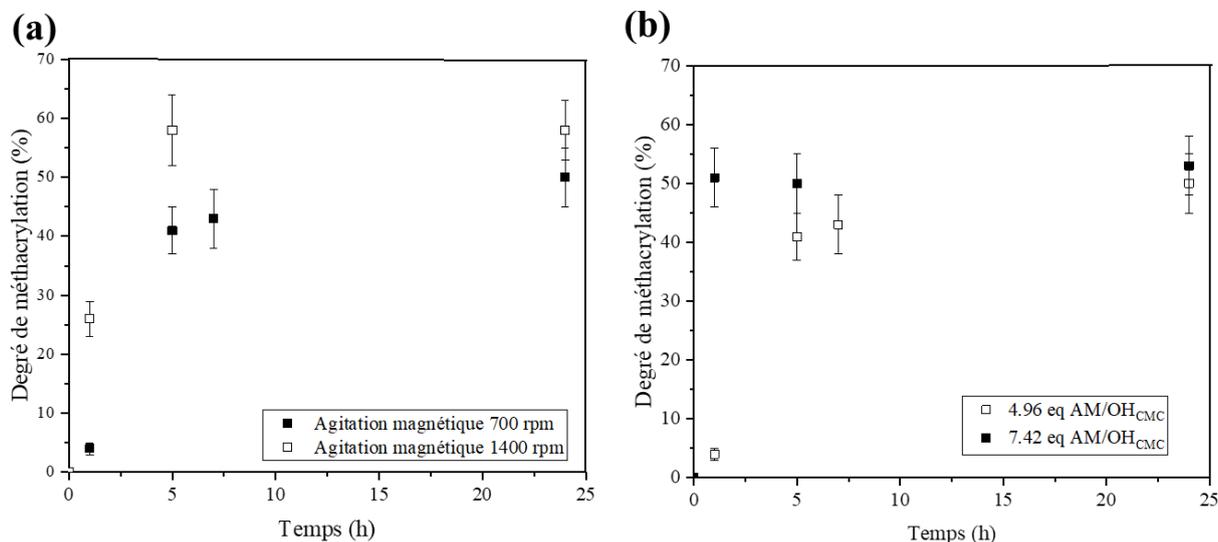


Figure III-11 : (a) Evolution du DM en fonction de la durée de la réaction de méthacrylation, pour un mélange réactionnel contenant un ratio MA/OH de 4,96 équivalents, agité magnétiquement à 700 ou 1400 tr/min et (b) Evolution du DM en fonction du temps de réaction pour une agitation magnétique à 700 tr/min pour des synthèses à 4,96 et 7,42 équivalents. La concentration en CMC est de 2 %m.

En conclusion, selon les conditions d'agitation, il peut être nécessaire de prolonger la réaction jusqu'à 24 h. Des durées plus courtes, de 5 h voire 1 h, peuvent être suffisantes. Hossen *et al.* sont les seuls à avoir utilisé une durée de réaction de 5,5 h, mais ont obtenu un DM de 21 % avec 3,3 mL d'AM, peut-être grâce à une agitation efficace [7].

III.2.4. CONCLUSIONS INTERMÉDIAIRES

Dans les parties précédentes, il a été démontré que le nombre d'équivalents en AM/OH_{CMC} et la vitesse d'agitation sont les paramètres les plus influents pour faire évoluer les cinétiques de méthacrylation et le DM. En effet, le DM final obtenu en fin de réaction est plus élevé lorsque le N_{eq} AM/OH_{CMC} est plus important et lorsque la vitesse d'agitation augmente. De plus, il a été montré que la réaction se fait de manière optimale à pH = 8 et à une concentration initiale en CMC de 2 %m. L'un des objectifs de cette étude était d'évaluer la possibilité d'augmenter le volume de réaction, passant de 100 mL à 2,5 L. L'augmentation d'échelle a démontré qu'elle permettait d'obtenir des DM plus élevés pour un même nombre d'équivalents en AM/OH_{CMC} qu'à l'échelle laboratoire grâce à une agitation plus rapide et efficace. Cela ouvre la possibilité d'envisager un volume encore plus important pour des applications futures. Ensuite, cette augmentation d'échelle a permis de préparer une quantité de

mCMC suffisamment importante pour réaliser différentes formulations permettant la caractérisation des propriétés des hydrogels et cryogels, ainsi que pour la fabrication additive de ces matériaux.

III.3. CARACTÉRISATIONS AVANCÉES DES CMC ET MCMC

Cette partie vise à présenter les propriétés structurales et thermiques de la CMC et des mCMC synthétisées en utilisant une agitation mécanique avec une pale ancre, avec des ratios AM/OH_{CMC} de 1,24, 2,48 et 4,96 équivalents. Les DM respectifs de ces mCMC sont de $34 \pm 4 \%$, $50 \pm 5 \%$, et $76 \pm 6 \%$.

Tout d'abord, la cristallinité des matériaux a été déterminée par diffraction des rayons X (DRX), dont le protocole est décrit dans la section II.4.2. La CMC possède un pic caractéristique à $2\theta = 20,43^\circ$ correspondant à un plan cristallographique d'ordre 1 (200) ($d_{200} = 4,36 \text{ \AA}$) faisant d'elle un polymère semi-cristallin (**Figure III-12**) [24,25]. Après greffage des groupements méthacrylates sur la mCMC, une diminution importante de ce pic avec la présence des méthacrylates est observée. Ce pic diminue ensuite avec l'augmentation du DM de la mCMC. Au contraire, la fonctionnalisation n'a aucune influence sur la largeur du pic. L'ajout de groupements méthacrylates hydrophobes, et induisant de la gêne stérique, diminue la cohésion et l'organisation des chaînes de mCMC. Ces résultats sont en accord avec les valeurs de densité déterminées sur les mêmes pastilles (**Annexe III-1**). La densité du polymère diminue fortement avec l'ajout des méthacrylates, puis diminue légèrement avec l'augmentation du DM, traduisant une diminution de l'organisation entre les chaînes. En revanche, une légère diminution de la distance interplanaire est observée après méthacrylation par rapport à la CMC ($d_{200}(\text{mCMC } 34 \%) = 4,19 \text{ \AA}$, $d_{200}(\text{mCMC } 50 \%) = 4,12 \text{ \AA}$ et $d_{200}(\text{mCMC } 76 \%) = 4,16 \text{ \AA}$). Ce phénomène peut être expliqué par le processus de lyophilisation, qui permet de récupérer les mCMC et faisant s'agréger les chaînes entre elles [26].

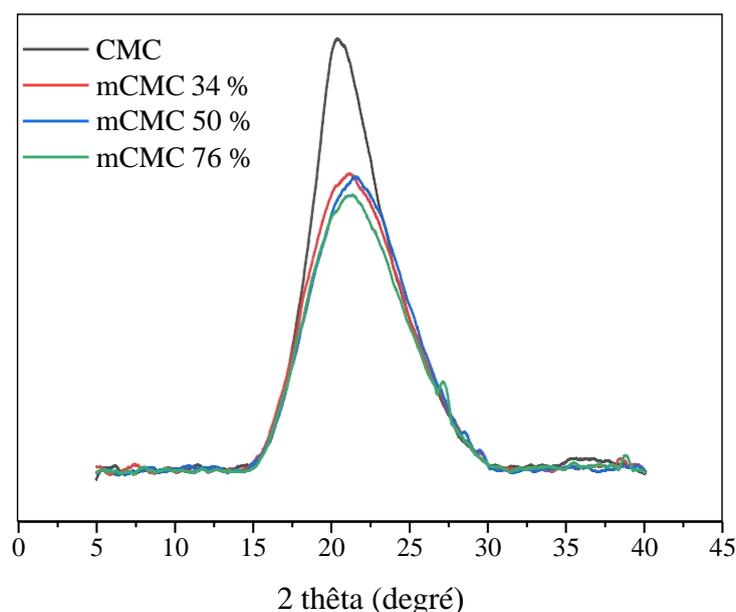


Figure III-12 : Diffractogramme DRX de pastilles des différentes CMC et mCMC avec des DM de 34, 50 et 76 % sur une plage de 2θ de 5 à 40 degrés.

Les échantillons de CMC et mCMC ont également été analysés par des caractérisations thermiques afin de comprendre la structure et l'organisation des chaînes de polymère entre elles. Les courbes de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) effectuées entre 25 et 110 °C, ne permettent pas de déterminer correctement une température de transition vitreuse (T_g) qui devrait se trouver entre 50 et 80 °C pour la CMC (**Annexe III-3**) [27,28]. Pour le vérifier, il peut être envisagé de réaliser des mesures d'analyse dynamique mécanique (DMA). En revanche, les analyses thermogravimétriques (ATG) réalisées sur ces échantillons permettant d'évaluer la perte de masse en fonction de la température ont révélé des différences de comportement entre les polymères (**Figure III-13a**). Tout d'abord, la perte de masse légère intervenant jusqu'à 220 °C correspond à l'évaporation de molécules d'eau adsorbées sur les polymères hydrophiles et de certaines impuretés [25]. Aucune conclusion ne peut donc être faite sur cette plage de température. Au-delà de 220 °C, une première dégradation (D1) intervient à une température supérieure pour la CMC ($T_{D1}(\text{CMC}) = 271$ °C) que pour les mCMC ($T_{D1}(\text{mCMC } 34\%) = 241$ °C, $T_{D1}(\text{mCMC } 50\%) = 240$ °C, $T_{D1}(\text{mCMC } 76\%) = 232$ °C). La diminution de cette température de dégradation avec l'augmentation du DM indique une stabilité moins importante des mCMC en comparaison à la CMC (**Figure III-13b**). En effet, le pic correspondant à la D1 pour la CMC indique la fin du processus vers 650 °C après une longue stabilisation. Dans le cas des mCMC, un épaulement et une bosse apparaissent et augmentent avec le DM. Cela pourrait potentiellement indiquer que les unités glycosidiques des mCMC se décomposent, suivi d'une dégradation des groupements méthacrylates à une température supérieure à 300 °C [24,25,27]. Cette dégradation est la principale perte de masse et est comprise entre 46 et 57 % selon l'échantillon. Aucune conclusion ne peut être faite à partir de ces valeurs car aucune tendance n'est observée. La deuxième dégradation (D2) correspond à la combustion des résidus carbonés [25]. Celle-ci intervient d'autant plus vite après la D1 que le DM de la CMC est important, indiquant une stabilité moins importante (**Figure III-13a, b**). La température de dégradation 2 (T_{D2}) de la mCMC 76 % se réalise à 352 °C puis semble augmenter avec la diminution du DM ($T_{D2}(\text{mCMC } 50\%) = 440$ °C, $T_{D2}(\text{mCMC } 34\%) = 461$ °C). En conclusion, en augmentant le DM, les mCMC sont moins organisés et moins stables.

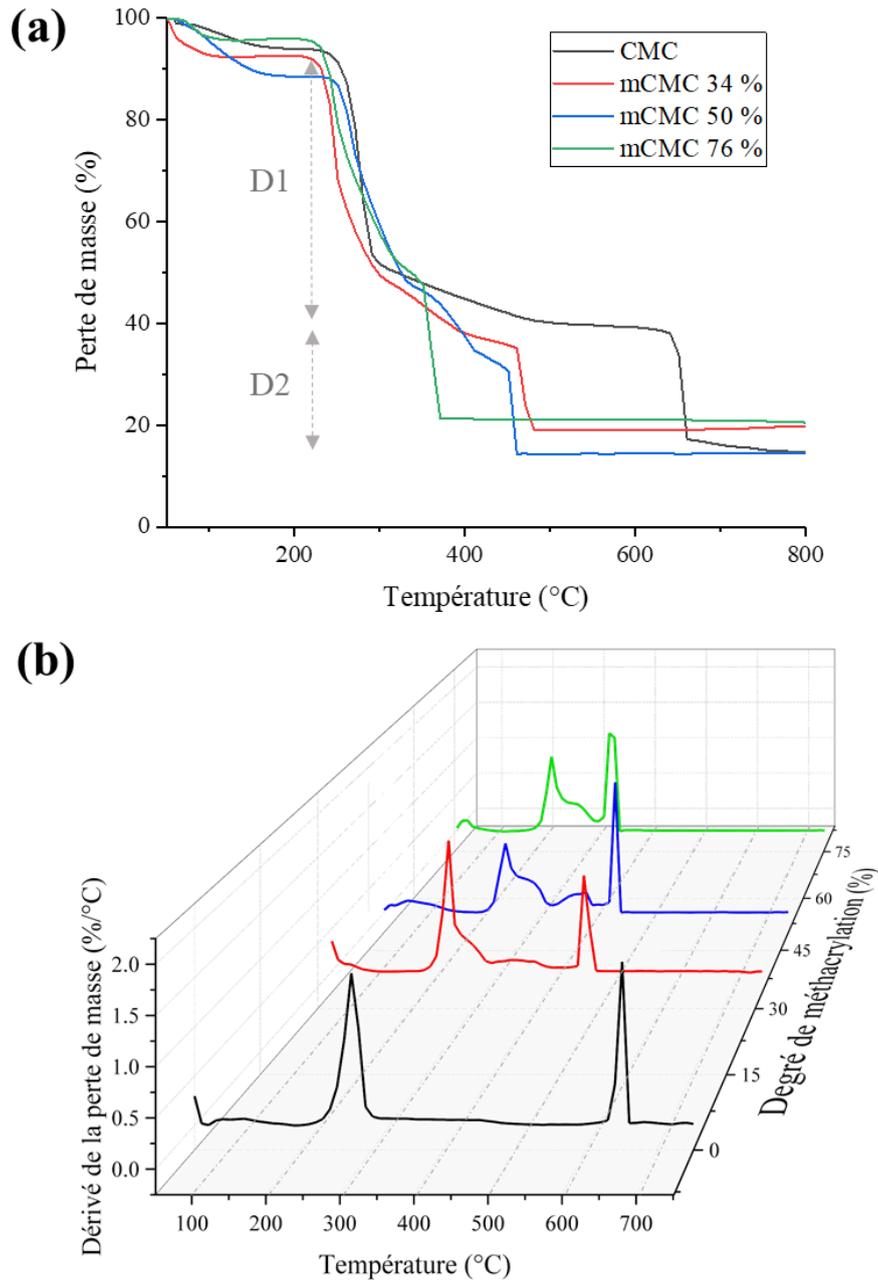


Figure III-13 : (a) Courbes ATG représentant la perte de masse des échantillons de CMC et mCMC en fonction de la température (50 – 750 °C) (b) dérivés des courbes ATG représentés dans un graphique 3 axes en fonction de la température, du DM.

III.4. FORMULATIONS ET MISE EN FORME D'HYDROGELS ET DE CRYOGELS

Cette partie discute du développement de plusieurs formulations aqueuses de mCMC synthétisées dans la section précédente avec des **DM** et des **concentrations** différentes. L'influence de ces deux paramètres sur les propriétés structurelles et physiques des matériaux sous forme d'hydrogels ou de cryogels après lyophilisation a été étudiée. Ces caractérisations sont nécessaires dans le but de développer une ou plusieurs formulations imprimables par DLP, et de déterminer les caractéristiques utiles des objets imprimés.

III.4.2. CHOIX DES FORMULATIONS ET DES PARAMÈTRES DE MISE EN FORME

Trois mCMC présentant des DM respectifs de $34 \pm 4 \%$ (A), $50 \pm 5 \%$ (B), et $76 \pm 6 \%$ (C) ont été utilisées pour préparer huit formulations liquides photo-réliculables avec des concentrations de mCMC comprises entre 2 et 4 %m (**Tableau III-1**). En raison de sa plus faible solubilité dans l'eau, l'échantillon C (DM = $76 \pm 6 \%$) n'a été solubilisée qu'à 2 et 3 %m.

Le photo-amorceur est primordial pour pouvoir amorcer la photo-réliculation des groupements méthacrylates. Comme décrit dans la partie I.5.2.2 du chapitre I, le photo-initiateur doit être biocompatible, absorber à 365 nm et être soluble dans l'eau. Trois photo-initiateurs potentiels de type I ont été identifiés pour ces travaux de thèse : le LAP, l'I2959 et le VA-086 [29]. Les dérivés du BAPO n'ont pas été retenus car ils doivent être synthétisés.

Dans le cas des technologies de fabrication additive de type « vat photopolymerization », nécessitant une consommation en grande quantité de formulation, le LAP devient économiquement non viable car son prix est de 675 € pour 5 g (Sigma Aldrich). Quant au VA-086, son prix est abordable (55 USD les 25 g), mais il libère du diazote lors de sa décomposition. Cette réaction a été vérifiée expérimentalement : des bulles restent piégées dans la matrice lors de la photo-réliculation, entraînant une porosité plus importante et une diminution des propriétés mécaniques des matériaux obtenus en comparaison de ceux formés en présence d'I2959. Par conséquent, l'I2959 (72 € les 10 g) a été choisi comme photo-amorceur car il répond à tous les critères. Cependant, il est très peu soluble dans l'eau (sa solubilité maximale est de 0,5 %m). Pour la formulation C3, qui possède la quantité de matière en méthacrylates la plus élevée, 0,5 %m d'I2959 ont été ajoutés, correspondant à un ratio molaire I2959/méthacrylates de 0,55. Ce même rapport molaire a ensuite été appliqué pour l'ajout de photo-amorceur dans les autres formulations afin d'obtenir des réticulations et des propriétés de matériaux comparables (**Tableau III-1**).

Tableau III-1 : Compositions des différentes formulations constituées de 2 à 4 %m de de mCMC possédant un DM de 34, 50 ou 76 % et d'I2959 comme photo-amorceur.

Formulation	Echantillon	mCMC		I2959
		DM (%)	Concentration (%m)	Concentration (%m)*
A2	A	34 ± 4	2	0,12
A3			3	0,18
A3			4	0,25
B2	B	50 ± 5	2	0,20
B3			3	0,30
B4			4	0,41
C2	C	76 ± 6	2	0,32
C3			3	0,50

* l'I2959 a été ajouté avec un ratio molaire I2959/méthacrylates de 0,55.

III.4.3. VISCOSITÉ DES FORMULATIONS DE MCMC

Tout d'abord, l'étude de la viscosité des formulations sans photo-amorceur en fonction du taux de cisaillement a été réalisée entre 0,1 et 100 s⁻¹ (**Figure III-14**). Elle correspond à une mesure de la résistance d'un liquide à l'écoulement. Pour l'impression 3D par DLP ou SLA, la viscosité de la formulation est importante à connaître car elle entraîne une modulation des paramètres d'impression. Une résine trop visqueuse peut entraîner des problèmes de remplissage, des défauts de surface, des détails mal définis et un temps d'impression plus long. Une résine peu visqueuse est généralement préférée [30].

Toutes les formulations possèdent un comportement rhéofluidifiant comme celui de la CMC, décrit dans la partie I.3.2.3 (**Figure III-14**). Sur toute la gamme de taux de cisaillement pour un même DM, la viscosité diminue avec la concentration (effet de dilution). De plus, la viscosité augmente avec le DM pour une même concentration car la masse molaire de la mCMC et l'hydrophobie apportée par les méthacrylates augmentent avec celui-ci (**Annexe II-1**). Malheureusement, la détermination des masses molaires moyennes en masse n'a pas été possible par chromatographie d'exclusion stérique, car le recouvrement des CMC et mCMC n'était pas intégral et diminuait à mesure que le DM augmentait.

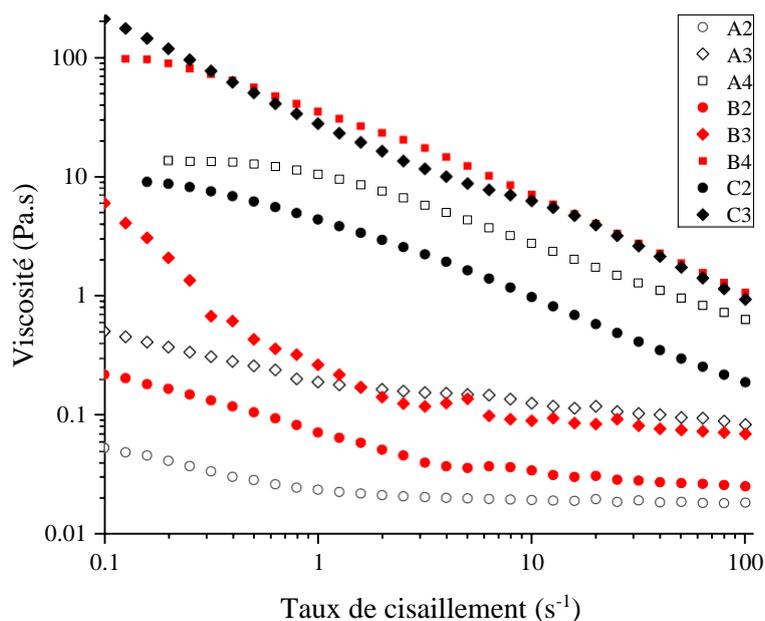


Figure III-14 : Evolution de la viscosité en fonction du taux de cisaillement de 0,1 à 100 s^{-1} à 25 °C pour différentes formulations constituées de 2 à 4 %m de de mCMC possédant un DM de 34, 50 ou 76 % sans photo-amorceur.

III.4.4. INFLUENCE DE LA DURÉE D'INSOLATION SUR LE TAUX DE CONVERSION DES MÉTHACRYLATES

Les formulations ont été exposées à une longueur d'onde de 365 nm pour induire la réticulation de la mCMC et former des hydrogels. Ces hydrogels peuvent ensuite être soumis à un processus de lyophilisation pour préparer des cryogels. Le protocole est décrit dans la section II.3.2.1. De manière originale, des techniques de RMN du solide du carbone ^{13}C par polarisation croisée et rotation à l'angle magique (CP-MAS) et par suppression non quaternaire (NQS) ont été employées pour identifier les pics des carbones et déterminer le taux de réticulation des groupements méthacrylates en utilisant les cryogels (**Figure III-15**). Du fait de la difficulté de suivre la bande de vibration des liaisons C=C des méthacrylates, masqués par le spectre de la CMC, il n'a pas été possible d'étudier l'évolution du spectre infrarouge de l'hydrogel en fonction du temps de réticulation, par spectroscopie infrarouge en temps réel.

Tout d'abord, les spectres ^{13}C CP-MAS et NQS de la mCMC (DM = 76 %) avant la réticulation sont utilisés pour attribuer les signaux des différents carbones, comme détaillé dans la littérature par Capitani *et al.* (**Figure III-15**) [31]. Les signaux situés entre 55 et 90 ppm sont attribués aux carbones hétérocycliques (C2 à C5), tandis que le pic à 104 ppm est attribué au carbone anomérique (C1) (**Figure III-15a**). Enfin, le pic à 176 ppm correspond aux groupements carboxylates de la CMC. L'attribution des signaux des méthacrylates a été effectuée à l'aide du spectre ^{13}C NQS de la mCMC 76 % (**Figure III-15b**). Cette méthode RMN ne montre que les carbones quaternaires et les groupements méthyles. En conséquence,

les signaux à 168 et 176 ppm ont été attribués respectivement aux carbones des carbonyles des groupements méthacrylates (C9) et des groupements carboxylates (C8). Enfin, les signaux à 18 et 136 ppm ont été respectivement attribués aux carbones des méthyles (C12) et aux carbones vinyliques (C10) des groupements méthacrylates. Par déduction, le carbone vinylique non quaternaire (C11) est attribué au pic à 126 ppm visible sur les spectres ^{13}C CP-MAS.

Après la réticulation, quelques différences sont observées dans les spectres ^{13}C CP-MAS et NQS des cryogels C3 (**Figure III-15a et b**). Pendant l'insolation de la formulation sous rayonnement UV, les groupements méthacrylates sont progressivement convertis par polymérisation radicalaire vinylique, conduisant à une diminution progressive des intensités de signaux des carbones C9 à C12. Simultanément, l'apparition de nouveaux signaux est observée et attribuée comme suit : C9' (163 ppm), C10' (46 ppm), C11' (115 ppm) et C12' (28 ppm).

A partir des spectres ^{13}C CP-MAS, le taux de conversion des méthacrylates (TCM) peut être calculé à partir des aires des pics des carbones C12' et C12 de la mCMC réticulée, normalisées par l'aire du pic du carbone anomérique (C1), qui n'est pas impactée par la réticulation (**Equation III-2**). Deux carbones de l'I2959 ont également été intégrés à la même position chimique (28 ppm) que les C12 et C12'. Cependant, compte tenu d'un rapport molaire constant entre l'initiateur de photo-polymérisation et les groupes méthacrylates pour chaque formulation (0,55), la contribution de l'I2959 ne modifie pas le calcul de CR (**Annexe III-4**).

$$\text{TCM} = \frac{A(\text{C12}')}{A(\text{C12}) + A(\text{C12}')} \quad (\text{Equation III-2})$$

où A(C12') et A(C12) correspondent respectivement aux intégrales des signaux des carbones C12' (28 ppm) et C12 (18 ppm) de la mCMC réticulée.

Tout d'abord, l'influence de la durée d'irradiation UV (30, 60 et 300 s) est étudiée en caractérisant des cryogels provenant de la réticulation de la formulation C3 (**Figure III-15**). Les taux de conversion des méthacrylates calculé pour les cryogels C3 en fonction du temps sont de 45 %, 54 % et 62 %, respectivement. Ces valeurs semblent indiquer la présence d'une valeur de TCM maximale autour de 60 % (**Annexe III-5**). Sur la base de ces résultats, la réaction de photo-réticulation est considérée terminée après 5 minutes. Cette durée a donc été choisie pour les expériences suivantes sur les cryogels issus des formulations A2-C2. Il semble important de noter que l'homogénéité du taux de réticulation sur l'épaisseur des cryogels n'a pas été obtenue. Les valeurs de TCM fournies sont donc des taux de conversion moyens sur tout le matériau.

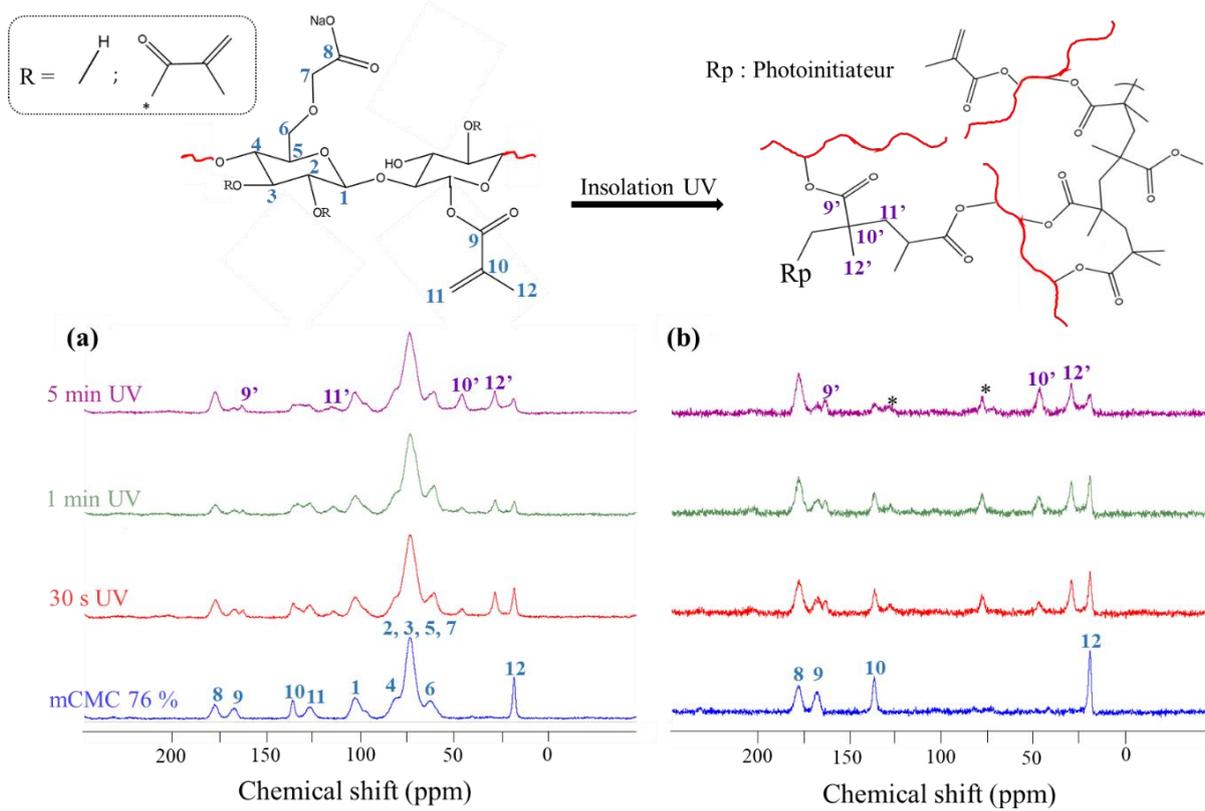


Figure III-15 : Spectres RMN ^{13}C CP-MAS du solide (a) et RMN ^{13}C NQS du solide (b) de la mCMC présentant un DM de 76 % (bleu) et des cryogels C3 obtenus par insolation sous rayonnement UV (365 nm) pendant 30 s (rouge), 1 min (vert) ou 5 min (violet). Les spectres NQS ne montrent que les carbones quaternaires et méthyles et ont permis l'attribution des carbones après la réticulation de la mCMC. *Carbones provenant de l'I2959 (Annexe III-4).

III.5. PROPRIÉTÉS DES HYDROGELS ET DES CRYOGELS

Les 8 hydrogels et cryogels issus des formulations A2 à C3 (**Tableau III-1**), formés après 5 minutes d'insolation sous rayonnement UV (365 nm) ont ensuite été caractérisés dans l'objectif des relations structures/propriétés, permettant de mettre en avant le rôle du DM et de la concentration de la mCMC utilisée, sur la microstructure, et les propriétés de gonflement et de viscoélasticité des matériaux. La détermination de ces propriétés est essentielle pour identifier des applications biomédicales potentielles.

III.5.1 MICROSTRUCTURE

III.5.1.1. Densité de méthacrylates réticulés et porosité

A partir des spectres de RMN du solide du carbone des cryogels issus des formulations A2-C3, le taux de conversion des méthacrylates (TCM) a été calculé afin de déterminer sa dépendance avec le DM et la concentration des mCMC dans les formulations. Le **Tableau III-2** résume les valeurs qui se situent entre $50 \pm 2 \%$ et $62 \pm 2 \%$. Malheureusement, il n'est pas possible d'établir de corrélation directe entre le TCM et le DM ou la concentration. Étant donné le volume constant de tous les cryogels ($V_{\text{cryogel}} = 0,64 \text{ cm}^3$), il est possible de calculer la densité de méthacrylates réticulés (en $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) à partir des quantités de méthacrylates dans la formulation (n_{meth}) et du TCM mesuré par RMN (**Tableau III-2**, **Equation III-3**).

$$\text{Densité en méthacrylate réticulés} = \frac{n_{\text{meth}}(\mu\text{mol}) \times \text{TCM}}{100 \times V_{\text{cryogel}} (\text{cm}^3)} \quad (\text{Equation III-3})$$

Tableau III-2 : Propriétés structurales des hydrogels et cryogels issus des différentes formulations constituées de 2 à 4 %m de de mCMC possédant un DM de 34 (A), 50 (B) ou 76 % (C) et d'I2959 comme photo-amorceur.

Formulation	Cryogel			Hydrogel
	Taux de conversion des méthacrylates (TCM, %)	Densité de méthacrylates réticulés ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$)	Taille moyenne des pores (μm)	Paramètre de maille ξ (nm)
A2	53 ± 2	$4,3 \pm 0,29$	$18,9 \pm 6,55$	$5,4 \pm 1,6$
A3	59 ± 2	$6,4 \pm 0,35$	$15,6 \pm 3,35$	$3,9 \pm 1,2$
A4	50 ± 2	$8,1 \pm 0,41$	$15,3 \pm 5,87$	$2,8 \pm 0,96$
B2	58 ± 2	$6,6 \pm 0,39$	$15,6 \pm 5,33$	$4,2 \pm 1,0$
B3	54 ± 2	$9,1 \pm 0,50$	$14,3 \pm 5,36$	$2,8 \pm 0,50$
B4	53 ± 2	$12 \pm 0,65$	$13,9 \pm 5,32$	$0,79 \pm 0,27$
C2	62 ± 2	$9,9 \pm 0,62$	$13,9 \pm 4,39$	$1,3 \pm 0,38$
C3	54 ± 2	$13 \pm 0,95$	$13,8 \pm 5,94$	$0,56 \pm 0,14$

Cette fois-ci, la densité de méthacrylates réticulés peut être corrélée au DM et à la concentration en mCMC. En effet, elle augmente linéairement avec la concentration pour un DM constant ($R^2 > 0,98$; **Figure III-16a**), ainsi qu'avec le DM pour une concentration constante ($R^2 > 0,99$; **Figure III-16b**). La densité de méthacrylates réticulés des hydrogels peut donc être contrôlée sur une plage significative et présentant une augmentation d'un facteur 3 entre les densités les plus faibles et les plus élevées en modulant le DM initial, mais aussi la concentration de mCMC dans la formulation photo-réliculable.

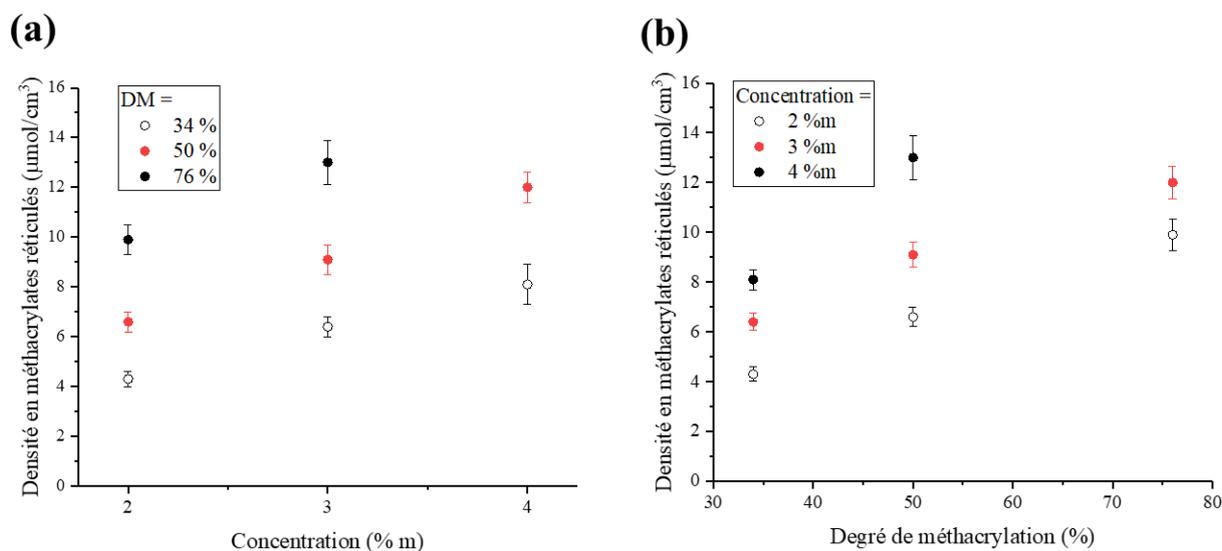


Figure III-16 : Densité de méthacrylates réticulés dans les cryogels, en fonction (a) de la concentration en mCMC dans la formulation initiale pour un DM donné et (b) du DM de la mCMC pour une concentration initiale donnée.

La densité de méthacrylates réticulés a également une influence sur la structure du matériau. La taille de la maille de l'hydrogel après photo-réliculation, représentant la distance moyenne entre deux nœuds de réticulation, a été évaluée pour chaque formulation à l'aide de la théorie de Flory-Rehner présentée dans le chapitre II (II.4.5.2) [32,33]. Comme le prédit la théorie, la taille de la maille diminue à mesure que la concentration et le DM de la mCMC augmente (**Tableau III-2**). Plus le nombre de groupements méthacrylates dans la formulation est élevé, plus la densité de noeuds de réticulation dans l'hydrogel est élevée et plus la taille de maille est petite. Cependant, ces résultats n'ont pas conduit à des variations significatives sur les tailles des pores des cryogels déterminées par imagerie MEB (**Figure III-17**, **Tableau III-2**). En effet, l'échantillon le plus réticulé (B4) a une taille de pore moyenne de $13,9 \pm 5,32 \mu\text{m}$ et l'échantillon le moins réticulé (A2) a une taille de pore moyenne de $18,9 \pm 6,55 \mu\text{m}$. En général, la taille et la direction des pores dans les cryogels sont principalement contrôlées par le processus de lyophilisation et non directement par la densité de noeuds de réticulation des méthacrylates du matériau [14]. En effet, lors de la congélation, des cristaux croissent et collapsent les chaînes cellulosesques entre elles. Ainsi, les variations entre formulations pourraient plutôt se refléter dans l'épaisseur des parois constituant les

pores [34,35]. Pour le vérifier, deux clichés MEB ont pu être réalisés sur des cryogels possédant des densités de méthacrylates réticulés différentes (**Figure III-17d et e**). Les parois présentes sur la **Figure III-17d** sont celle d'un cryogel de mCMC non discuté dans ce travail, possédant une densité de noeuds de réticulation de $3,5 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$ et obtenu à partir d'une formulation contenant 2 %m de mCMC et un DM de 34 % et de nanocristaux de cellulose. Ses parois présentent une épaisseur de $0,21 \pm 0,054 \mu\text{m}$. Le cryogel B4, qui possède une densité de noeuds de réticulation 3 fois supérieure et une concentration en mCMC deux fois supérieures, présente quant à lui des parois trois fois plus épaisses ($0,61 \pm 0,14 \mu\text{m}$). Cette étude qui semble donner des résultats convaincants, n'a cependant pas été menée sur l'ensemble des cryogels car l'acquisition de telles images est difficile et longue.

En ce qui concerne la taille des pores des cryogels ($\approx 15 \mu\text{m}$), ils sont trop petits pour des applications d'ingénierie tissulaire telle que la réparation osseuse, pour lesquelles des pores d'environ 100 - 200 μm sont nécessaires pour permettre aux cellules de pénétrer dans le réseau [36,37]. Pour surmonter ce problème, il peut être possible de façonner des matrices avec une porosité adéquate par impression 3D. Il est par contre intéressant de noter que des pores de 15 μm pourrait permettre la néovascularisation car ils permettent l'infiltration des cellules endothéliales, qui forment les vaisseaux sanguins. Cela peut favoriser la vascularisation du tissu régénéré [38].

A titre de comparaison avec la littérature, seuls Melilli *et al.* ont montré des images MEB de la porosité de cryogels de mCMC et quantifier la taille des pores [3]. La taille des pores déterminée dans cette publication est de l'ordre de 80 μm sur leur cryogel, ce qui est 5 fois plus que ceux mesurés dans ce travail. Cependant, aucune information n'est donnée sur le procédé utilisé pour la congélation des hydrogels formés, qui possède un impact important sur la taille de ces derniers.

Enfin, pour compléter cette étude sur la porosité, des mesures BET (Brunauer-Emmett-Teller) ont été envisagées. Cette technique permet de déterminer la surface spécifique d'un matériau poreux, c'est-à-dire la surface totale des pores à l'intérieur du matériau par unité de masse. Cette valeur aurait pu être comparée à la taille moyenne des pores. Cependant, plusieurs limites à la manipulation du cryogel notamment pour le découper en morceaux sans le déstructurer ni l'écraser, n'ont pas permis de développer cette méthode.

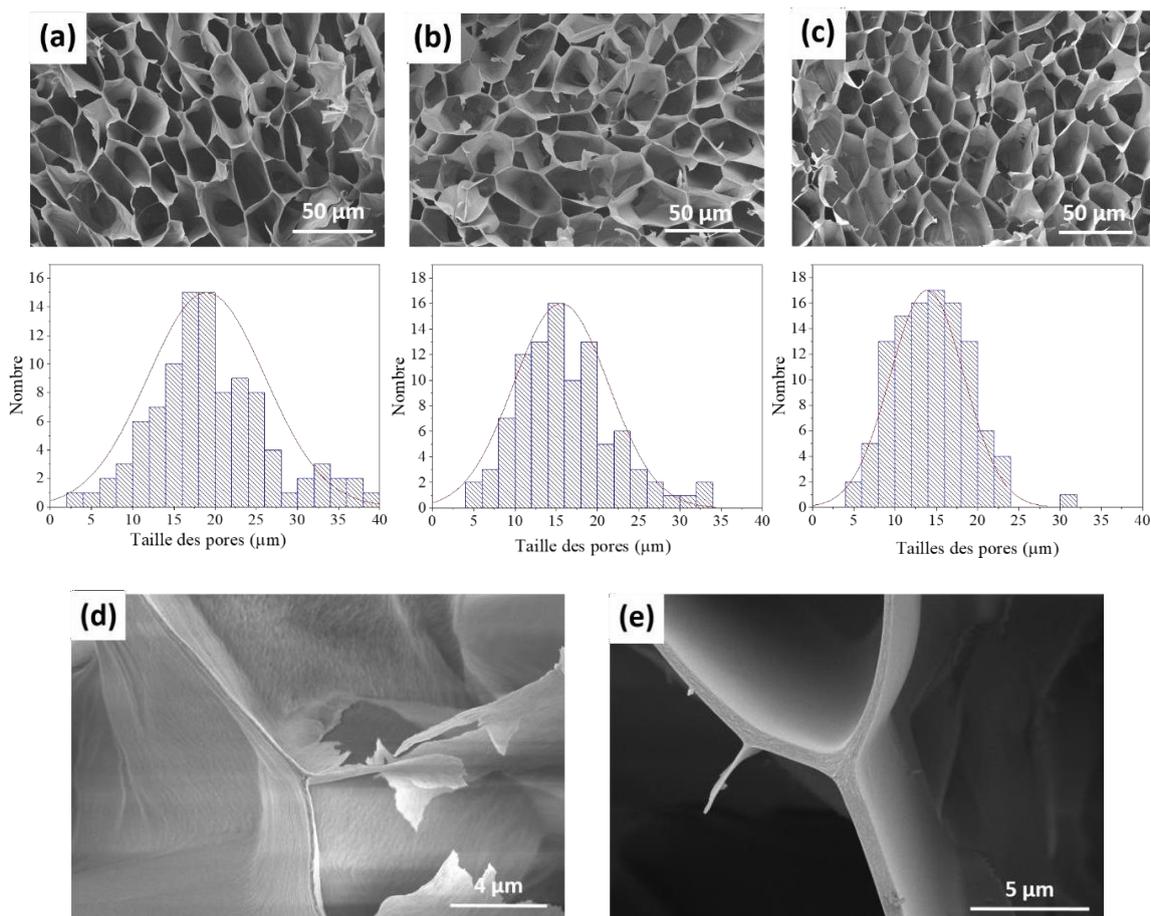


Figure III-17 : Distributions en nombre des tailles de pores mesurées par MEB pour les cryogels A2 (a), B2 (b) et C2 (c). Images MEB montrant l'épaisseur de parois pour un (d) cryogel obtenu à partir d'une formulation à 2 %m en mCMC et possédant une densité de méthacrylates réticulés de $3,5 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$ et pour le (e) cryogel B4, obtenu à partir d'une formulation à 4 %m en mCMC et possédant une densité de méthacrylates réticulés de $12 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$. La taille moyenne des parois a été déterminée après 7 mesures. La taille moyenne des pores a été déterminée après environ 25 mesures sur 4 images par échantillon (100 mesures). Les pores dont les parois ont été brisées par la méthode de section lors de la préparation de l'échantillon n'ont pas été pris en compte.

III.5.2.2. Taux de gonflement

Le taux de gonflement dans l'eau (Q_m) reflète la capacité des cryogels à absorber et retenir l'eau sans se rompre ou se déstructurer. Pour tous les cryogels obtenus après 5 minutes d'insolation, l'équilibre de gonflement a été atteint en moins de 10 heures pour tous les cryogels dans l'eau à 25°C (**Figure III-18**). De manière intéressante, le taux de gonflement final diminue avec l'augmentation de la concentration. Les cryogels A2, A3 et A4, obtenues respectivement à partir des concentrations en mCMC de 2 %m, 3 %m et 4 %m, ont présenté une capacité d'absorption d'eau notable en absorbant respectivement $81 \pm 8,5$, $63 \pm 0,37$ et $37 \pm 2,9$ fois leur propre masse initiale, après 48 heures à température ambiante. De manière similaire, le taux de gonflement diminue avec l'augmentation du DM. Par exemple, les taux de

gonflement de $81 \pm 8,5$, $67 \pm 3,8$ et $46 \pm 1,3$ ont été obtenus pour les cryogels A2 (DM = 34 %), B2 (DM = 50 %) et C2 (DM = 76 %), respectivement.

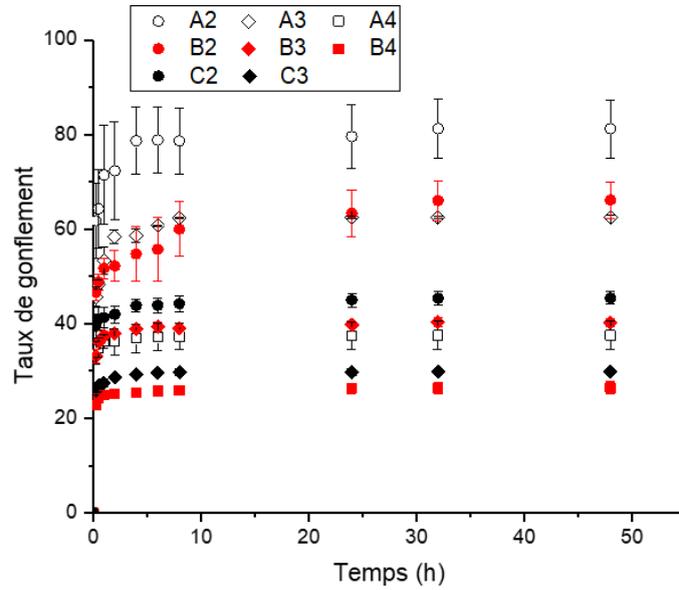


Figure III-18 : Evolution du taux de gonflement en fonction du temps d'immersion dans l'eau à 25 °C pour les huit cryogels (A2-C3).

Les mêmes tendances ont été observées entre le taux de gonflement et la densité de méthacrylates réticulés. En effet, lorsque la densité en méthacrylates réticulés dans le cryogel augmente, le réseau devient plus dense et moins extensible, absorbant ainsi moins d'eau (**Figure III-19a**). Enfin, la capacité d'absorption d'eau des cryogels semble également dépendre de la densité de méthacrylates libres restants après photo-réticulation car les méthacrylates sont hydrophobes (**Figure III-19b**). Il est cependant difficile de définir laquelle des deux densités (méthacrylates réticulés et méthacrylates libres) est la plus influente sur le gonflement.

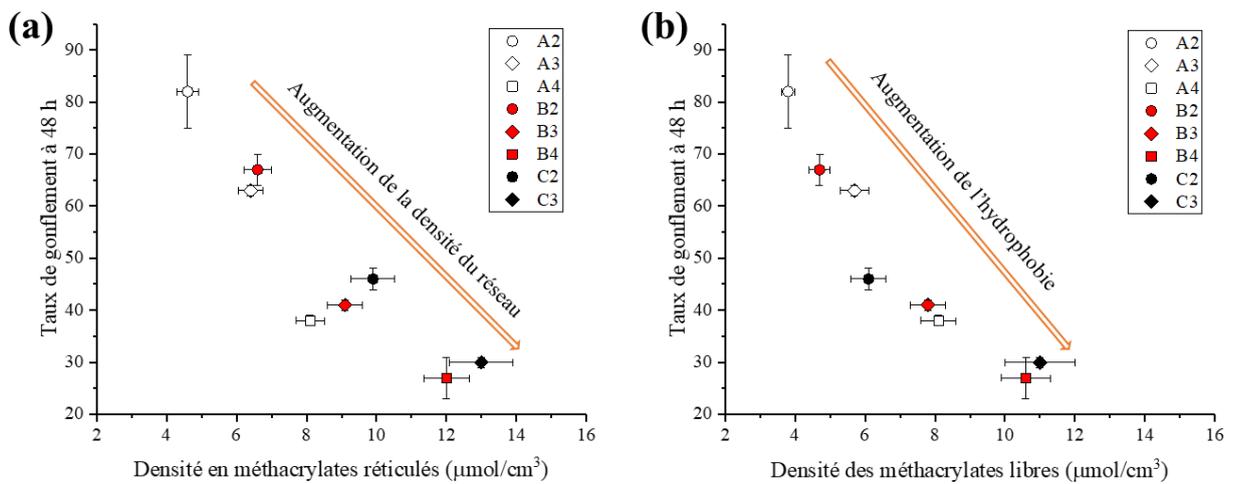


Figure III-19 : Influence de la densité de méthacrylates (a) réticulés et (b) libres dans les cryogels sur le taux de gonflement du cryogel hydraté mesuré après 48h dans l'eau.

Les ratios de gonflement des cryogels hydratés ont ensuite été comparés à la teneur en eau des hydrogels initiaux (**Figure III-20**). Tous les cryogels ont absorbé plus d'eau que celle contenue dans les hydrogels à la fin de la photo-réticulation, car le gonflement a été mené à sa capacité maximale pour les cryogels hydratés, tandis que l'équilibre n'est probablement pas atteint pour les hydrogels initiaux. De manière intéressante, des différences de taux de gonflement entre les deux matériaux ont été observées en fonction de l'échantillon. Par exemple, le cryogel le moins réticulé A2 a absorbé deux fois plus d'eau que l'hydrogel initial A2, tandis que le cryogel le plus réticulé B4 a absorbé seulement 7 % d'eau en plus que l'hydrogel initial B4. Cela peut probablement être expliqué par l'étape de congélation, qui provoque l'agrégation des chaînes polymères pour former les parois des pores [35]. Le taux de gonflement à l'équilibre dépend fortement de la capacité intrinsèque des chaînes polymères à absorber l'eau [33,39]. Dans le cas des cryogels, les chaînes polymères collapsées sont maintenues ensemble par des liaisons hydrogène, ce qui les rend plus difficile à hydrater. Ce phénomène devient encore plus observable lorsque la concentration de mCMC augmente, ce qui pourrait s'expliquer par l'élargissement de la taille des parois des pores, comme observé par Cassanelli *et al.* avec des cryogels de gomme gellane [35].

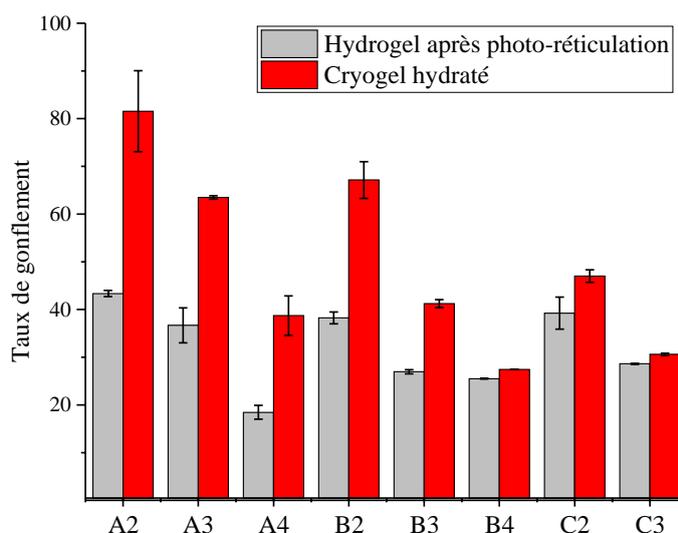


Figure III-20 : Comparaison de la teneur en eau des hydrogels après photo-réticulation et du taux de gonflement des cryogels réhydratés à l'équilibre, issus des formulations A2 à C3.

La possibilité de régler finement la capacité de gonflement des cryogels hydratés permet d'envisager plusieurs types d'applications médicales. En effet, il a été rapporté que plus la teneur en eau des hydrogels est élevée, plus ils fournissent un environnement fonctionnel pour les cellules (cf. partie I.4.2). Cette propriété, que possèdent les cryogels A2 et B2 serait bénéfique pour des applications telles que la libération de médicaments ou la cicatrisation des plaies même si les taux de gonflement reportés dans la littérature sont très variables (5 – 1000) [40,41].

Cependant, pour d'autres applications telles que la réparation de tissus mous, un taux de gonflement plus faible est recommandé (0,1 - 30) tel que ceux des cryogels B4 et C3 [42–44].

En comparaison à la littérature, des taux de gonflement du même ordre de grandeur ont été obtenus pour des cryogels de mCMC (26 – 81) [1,6,12]. Ces derniers diminuent avec le DM et la concentration. En revanche, les valeurs obtenues par le groupe de recherche du docteur Nicoll et les valeurs présentées dans ce manuscrit ne sont pas comparables car la forme du cryogel et la méthode de photo-réticulation (durée et puissance d'insolation, quantité d'I2959) ne sont pas les mêmes. Par ailleurs, des comparaisons peuvent être réalisées lorsque la densité en méthacrylates réticulés a été calculée. Par exemple, pour une densité de nœuds de réticulation de $11,3 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$, Gupta *et al.* ont mesuré un taux de gonflement de 35, alors que pour $12 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$ un taux de gonflement de 26 a été mesuré pour B4 [12]. Cependant, ce n'est pas le cas pour Lin *et al.* où les densités de nœuds de réticulation sont inférieures à celles obtenues dans ce travail pour des taux de gonflement mesurés comparables [6]. Par exemple, pour une densité de nœuds de réticulation de $3 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$, ces auteurs obtenaient $Q_m = 75$ alors que pour A2 le taux de gonflement est de 81 pour $4,3 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$. Cette différence pourrait provenir de la valeur de la densité de la mCMC utilisée faible ($\rho = 0,52 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) dans le calcul de la densité de nœuds de réticulation par $\rho/\overline{M_c}$.

III.5.2. PROPRIÉTÉS VISCOÉLASTIQUES

L'impact de la densité de nœuds de réticulation sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels a été étudié par rhéologie. L'évolution du module élastique (G') et du module visqueux (G''), sur la plage de fréquences 0,1 – 10 Hz est représentée dans la **Figure III-21a,b** et l'amortissement $\tan(\delta)$ en **Annexe III-6**. Sur l'ensemble de cette gamme de fréquences, à 1 % de déformation et à 25 °C, G' est toujours supérieur à G'' , ce qui montre le comportement majoritairement solide des hydrogels. De plus, indépendamment de leur formulation, le même comportement a été observé pour tous les hydrogels ; le module G' augmente et le module G'' diminue lorsque la fréquence augmente. Les mêmes résultats sont observés pour le comportement viscoélastique des cryogels hydratés (**Figure III-21 c et d, Annexe III-6**). Par conséquent, la comparaison des propriétés rhéologiques solides des matériaux a été effectuée en considérant G' (1 % de déformation). La même étude pourrait être effectuée avec G'' pour le comportement visqueux.

Sur la gamme de fréquences 0,1 -10 Hz à 1 % de déformation, le module élastique G' des hydrogels semble augmenter avec le DM pour une même concentration en mCMC, et avec la concentration pour un même DM (**Figure III-21a**). Cette observation est en accord avec les résultats précédents, indiquant qu'avec une augmentation du DM et de la concentration, le réseau formé est plus dense et moins déformable.

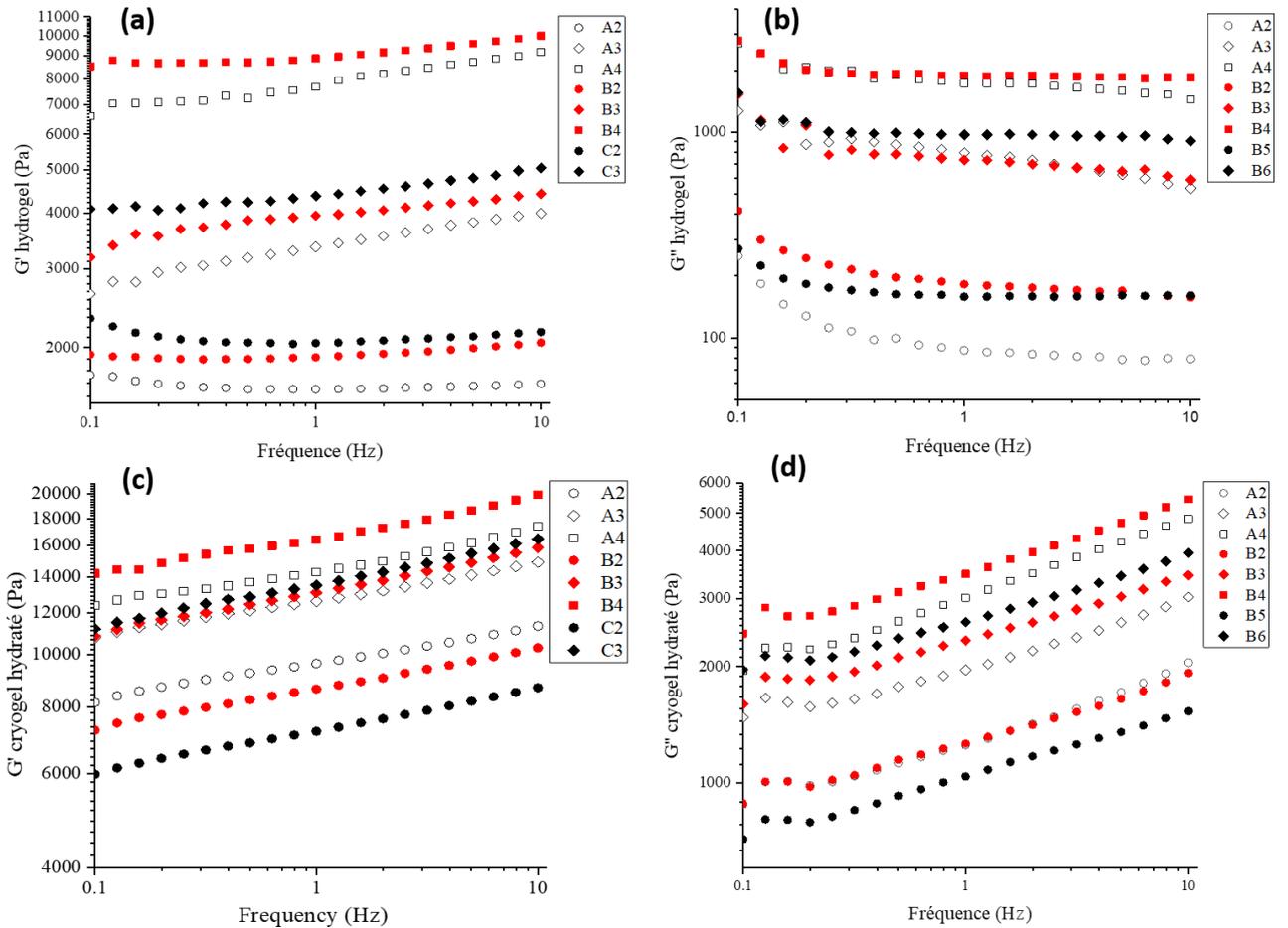


Figure III-21 : Modules élastiques (G') et visqueux (G'') en cisaillement des hydrogels initiaux (a, b) et des cryogels hydratés (c, d), mesurés par rhéologie plan-plan, entre 0,1 et 10 Hz, à 1 % de déformation et à 25 °C. Les barres d'incertitudes n'ont volontairement pas été mises pour une meilleure lisibilité des graphiques.

La **Figure III-22** représente les valeurs des modules élastiques G' avec les incertitudes correspondantes, mesurées à 1 Hz, en fonction de la concentration initiale en mCMC dans la formulation photo-réliculable. Pour les hydrogels, le module élastique $G'_{(1 \text{ Hz})}$ augmente avec la concentration en mCMC (**Figure III-22a**). En effet, les valeurs de $G'_{(1 \text{ Hz})}$ des hydrogels de B2, B3 et B4 sont respectivement de $1,8 \pm 0,51$, $3,5 \pm 0,92$ et $8,9 \pm 1,0$ kPa. Les mêmes résultats sont observés pour les cryogels hydratés (**Figure III-22b**). En effet, les valeurs de $G'_{(1 \text{ Hz})}$ des cryogels hydratés de B2, B3 et B4 sont respectivement de $8,6 \pm 2,2$, $13,1 \pm 0,8$ et $16,7 \pm 1,7$ kPa. Aucune évolution significative de $G'_{(1 \text{ Hz})}$ n'a été observée avec le DM, pour les deux types d'échantillons.

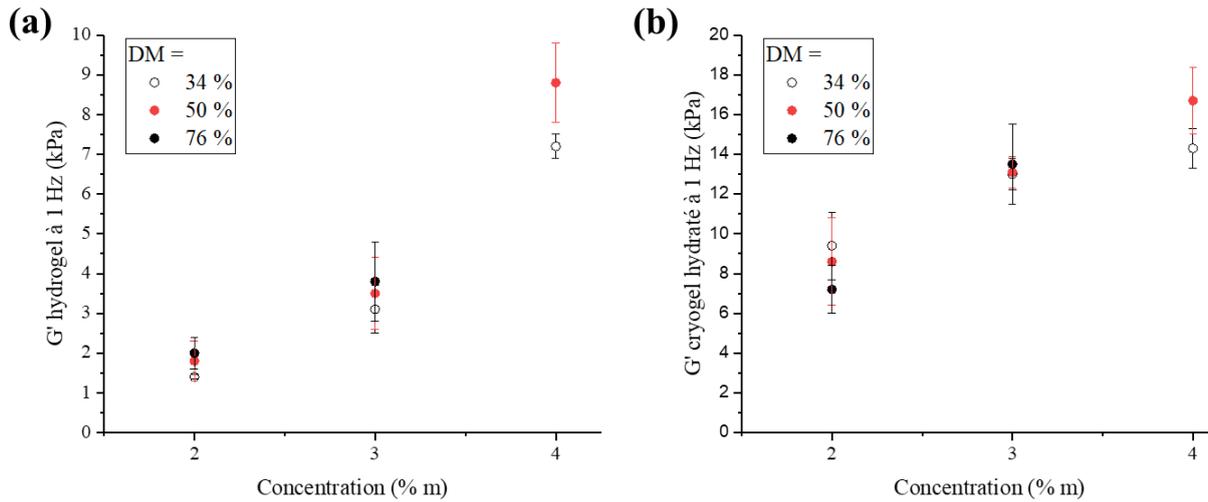


Figure III-22 : Evolution des modules élastiques en cisaillement G' des hydrogels initiaux (a) et des cryogels hydratés (b), mesurés à 1 Hz, 1% de déformation et à 25°C, en fonction de la concentration initiale de mCMC dans chaque formulation photo-récurable.

À 1 Hz, le rapport des modules élastiques (G' (cryogel hydraté)/ G' (hydrogel initial)) est supérieur à 1 pour chaque formulation comme déjà observé par Heger *et al.* sur des hydrogels et des xérogels hydratés d'agarose (**Figure III-23a**) [45]. Il est remarquable, que même s'ils contiennent plus d'eau, les modules élastiques des cryogels hydratés sont plus élevés que ceux des hydrogels initiaux (**Figure III-23b**). Ce rapport diminue à mesure que la concentration en mCMC augmente. Par ailleurs, pour une concentration de 2 %m de mCMC, le rapport de $G'_{(1\text{ Hz})}$ augmente avec la diminution du DM. Toutefois, aucune évolution significative du rapport de $G'_{(1\text{ Hz})}$ avec le DM n'a été observée pour des concentrations de 3 %m et 4 %m (**Figure III-23a**). La différence observée sur les propriétés rhéologiques entre les hydrogels et les cryogels pourrait être due à l'étape de congélation sous azote liquide avant la lyophilisation. Comme observé sur les images MEB en coupe transversale (**Annexe III-7**), les pores des cryogels sont orientés le long de l'axe de congélation (du bas vers le haut) après la lyophilisation, tandis qu'ils pouvaient être orientés de manière aléatoire dans les hydrogels. Il est concevable que cette orientation implique une organisation du réseau plus résistante dans le cryogel que dans l'hydrogel initial. En effet, le gonflement du cryogel n'affecte pas l'évolution du module élastique $G'_{(1\text{ Hz})}$ des cryogels hydratés en fonction de la concentration et du DM de la mCMC par rapport à ceux des hydrogels (**Figure III-23**). Les modules élastiques des deux matériaux augmentent avec la concentration de mCMC et n'ont pas montré de variation significative avec le DM. Cependant, en fonction de la concentration en mCMC dans la formulation, et d'autres paramètres possibles (légère évaporation, hydrophobie des méthacrylates libres induisant la rétraction du réseau), la quantité d'eau contenue dans l'hydrogel initial évolue et n'est pas la même dans chaque hydrogel (**Figure III-19**). Il est possible que lors de la congélation, l'orientation des pores et l'organisation du réseau soient en partie régies par la quantité d'eau dans l'hydrogel initial. En d'autres termes, les cristaux formés pourraient être plus volumineux

en présence de plus grandes quantités d'eau. Le réseau aurait pu se déformer plus facilement et devenir plus robuste lors de la lyophilisation lorsque plus d'eau est piégée dans l'hydrogel initial. En effet, le rapport $G'_{(1\text{ Hz})}$ diminue avec la diminution en eau dans l'hydrogel (**Figure III-23b**). Pour B2, B3 et B4, les rapports des $G'_{(1\text{ Hz})}$ sont respectivement de $4,7 \pm 0,10$, $3,8 \pm 0,61$ et $2,1 \pm 0,10$ pour une teneur en eau de l'hydrogel de $38 \pm 1,2$, $28 \pm 0,43$ et $24 \pm 0,010$, respectivement. Sur l'évolution du rapport des modules élastiques $G'_{(1\text{ Hz})}$ des cryogels hydratés et des hydrogels, il aurait pu être envisagé d'étudier l'impact de l'épaisseur des parois du réseau induit aussi par la congélation. L'agrégation des chaînes implique des épaisseurs de parois plus importante et une meilleure résistance de ces dernières lorsqu'elles sont soumises à une contrainte. Ce phénomène pourrait aussi expliquer la différence entre les modules élastiques des deux matériaux.

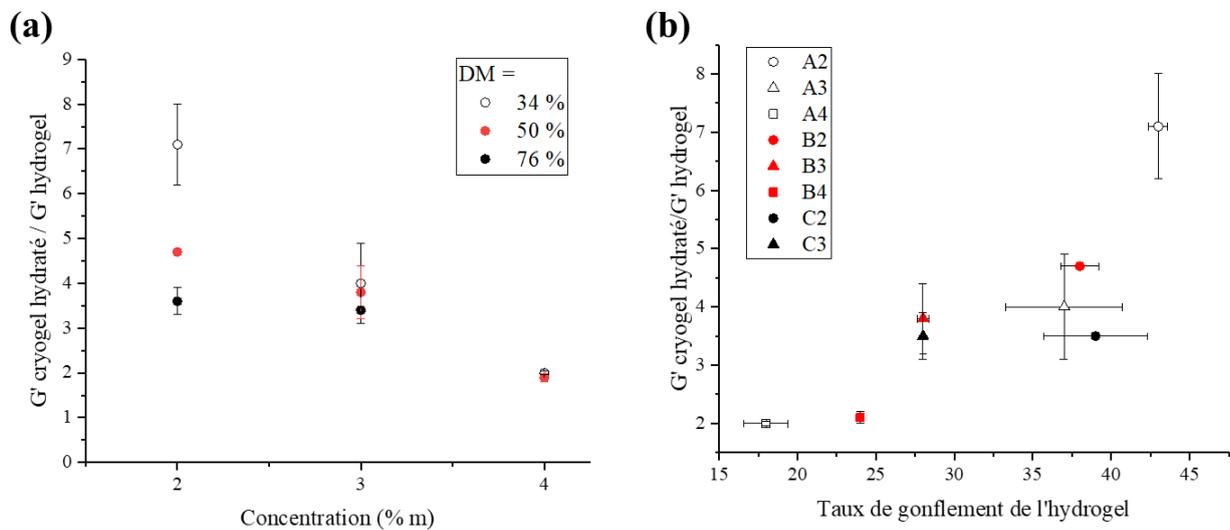


Figure III-23 : Evolution des rapports des modules élastiques des cryogels hydratés sur ceux des hydrogels initiaux correspondants en fonction (a) de la concentration de mCMC, (b) du taux de gonflement de l'hydrogel. Les valeurs des G' sont prises à 1 Hz et 1 % de déformation à 25 °C.

Enfin, ces résultats montrent que le module élastique $G'_{(1\text{ Hz})}$ des hydrogels initiaux et des cryogels hydratés peut être ajusté en faisant varier la concentration de mCMC, plutôt que le DM. De plus, la transformation des hydrogels en cryogels permet d'augmenter le module élastique après réhydratation. Selon l'application visée du matériau, un DM et une concentration spécifiques peuvent être sélectionnés pour obtenir une microstructure et des propriétés mécaniques adaptées. Il est difficile de comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus dans la littérature car les protocoles de mesures sont différents et aucune étude n'a été réalisée pour comparer les valeurs de modules de cryogels et hydrogels issus de mêmes formulations. Il est montré ici qu'il est possible par la lyophilisation d'augmenter les propriétés viscoélastiques des hydrogels avec une augmentation négligeable du gonflement, comme dans le cas des cryogels hydratés B4 et C3. Cependant, les modules élastiques obtenus sont trop faibles pour les tissus squelettiques. Les hydrogels utilisés pour les applications de réparation osseuse sont

généralement résistants mécaniquement [37,46]. En revanche, les matériaux préparés pourraient être considérés pour la réparation de tissus mous, tels que les poumons, les reins, le foie, la moelle voir le tissu adipeux [47].

En comparaison avec des mesures rhéologiques sur des hydrogels de mCMC, seul le groupe de recherche du docteur Chiappone a déterminé des valeurs de modules élastiques G' d'hydrogels préparés à partir d'une mCMC présentant un DM de 60%, une masse molaire en poids de 250 kg/mol, à une concentration de 2 %m dans l'eau [3,10]. Dans les deux publications, les modules élastiques G' des hydrogels obtenus sont de 0,5 et 3,3 kPa à 1 Hz et 1 % de cisaillement pour de hydrogels formés avec du BAPO et du LAP comme photo-amorceurs. Cependant, les modules élastiques obtenus correspondent à des mesures sur des hydrogels formés par rhéologie en temps réel, qui ne possèdent pas la même structure qu'un hydrogel formé sans contrainte.

III.6. CONCLUSIONS

Dans cette étude, la réaction entre la carboxyméthylcellulose et l'anhydride méthacrylique a été étudiée de manière approfondie pour la première fois afin de former la carboxyméthylcellulose méthacrylate (mCMC). Le contrôle des paramètres du protocole de synthèse a permis d'obtenir une large gamme d'échantillons de mCMC avec des degrés de méthacrylation compris entre 0 et 76 ± 6 %. Huit formulations aqueuses avec différents DM et concentrations de mCMC ont été utilisées pour préparer des hydrogels après photo-réticulation sous rayonnement UV (365 nm). Ces hydrogels ont ensuite été transformés en cryogels par lyophilisation. Une méthode innovante utilisant la RMN ^{13}C à l'état solide a été utilisée pour mesurer le taux de conversion des méthacrylates (TCM, de 50 à 62 %) et en déduire la densité de méthacrylates réticulés dans les cryogels finaux (de 4,3 à $13 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$). Cette dernière s'est avérée être corrélée à la fois au DM et à la concentration initiale en mCMC dans la formulation. En outre, des corrélations entre la densité de méthacrylates réticulés et le taux de gonflement des cryogels, d'une part, et la microstructure, d'autre part, ont ensuite été mises en évidence. De plus, ces résultats permettent d'expliquer l'évolution des modules élastiques en cisaillement des hydrogels et des cryogels hydratés, qui dépendent principalement de la concentration initiale de mCMC dans la formulation. En conclusion, il a été mis en évidence la possibilité d'affiner la microstructure (densité de méthacrylates réticulés ; distance entre deux points de réticulation entre 0,56 et 5,4 nm) ainsi que le taux de gonflement des cryogels ($Q_m = 25 - 80$) et les propriétés rhéologiques ($G'_{(1\text{ Hz})} = 2-8$ kPa pour les hydrogels, 4,5-17 kPa pour les cryogels hydratés à 1 % de déformation) des hydrogels et cryogels de mCMC, en contrôlant les conditions de méthacrylation d'une. En fonction des propriétés sélectionnées, ces hydrogels et cryogels de mCMC réticulés pourraient servir à différents usages en biomédecine. Par exemple, ils pourraient être employés comme *scaffolds* pour la régénération des tissus mous ou l'encapsulation de cellules. Pour prouver la potentielle biocompatibilité nécessaire à de telles applications, des tests de cytotoxicité auraient pu être réalisés. Ces tests ont été réalisés par Béatrice Labat (Université de Rouen Normandie) sur les formulations présentées dans le chapitre IV. De plus, afin de se rapprocher le plus précisément des conditions physiologiques, les caractérisations présentés dans ce chapitre pourraient être réalisées dans le PBS à 37 °C. Il pourrait être intéressant de mesurer les propriétés mécaniques des matériaux développés. Cependant, certaines études corréler le module élastique G' au module d'Young E en compression par l'approximation $E \approx 3G'$ [48]. Avec cette dernière hypothèse, le module E suit la même évolution que le module G' . De plus, des caractérisations par nano-indentation ont été envisagées sur les hydrogels et cryogels hydratés. Cependant, les épaisseurs de parois ont été jugées trop fines pour cette étude.

Dans ce travail, les mCMC ont été solubilisées jusqu'à la concentration maximale qu'il est possible d'atteindre pour chaque DM, et la mCMC avec le DM maximal a été utilisée pour

façonner les hydrogels. En conséquence, les propriétés des hydrogels et des cryogels sont limitées par ces deux phénomènes physiques. Dans ce contexte, l'ajout de nanocristaux de cellulose fonctionnalisés par des méthacrylates et non fonctionnalisés est envisagé dans le chapitre IV, pour moduler davantage les propriétés rhéologiques et de gonflement des matériaux.

RÉFÉRENCES

1. Reza, A.T.; Nicoll, S.B. Characterization of Novel Photocrosslinked Carboxymethylcellulose Hydrogels for Encapsulation of Nucleus Pulposus Cells. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 179–186, doi:10.1016/j.actbio.2009.06.004.
2. Kono, H. Characterization and Properties of Carboxymethyl Cellulose Hydrogels Crosslinked by Polyethylene Glycol. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *106*, 84–93, doi:10.1016/j.carbpol.2014.02.020.
3. Melilli, G.; Carmagnola, I.; Tonda-Turo, C.; Pirri, F.; Ciardelli, G.; Sangermano, M.; Hakkarainen, M.; Chiappone, A. DLP 3D Printing Meets Lignocellulosic Biopolymers: Carboxymethyl Cellulose Inks for 3D Biocompatible Hydrogels. *Polymers* **2020**, *12*, 1655, doi:10.3390/polym12081655.
4. Qian, H.; Wang, X.; Yuan, K.; Xie, C.; Wu, W.; Jiang, X.; Hu, L. Delivery of Doxorubicin in Vitro and in Vivo Using Bio-Reductive Cellulose Nanogels. *Biomater. Sci.* **2014**, *2*, 220–232, doi:10.1039/C3BM60176E.
5. Varma, D.M.; Gold, G.T.; Taub, P.J.; Nicoll, S.B. Injectable Carboxymethylcellulose Hydrogels for Soft Tissue Filler Applications. *Acta Biomaterialia* **2014**, *10*, 4996–5004, doi:10.1016/j.actbio.2014.08.013.
6. Lin, H.A.; Gupta, M.S.; Varma, D.M.; Gilchrist, M.L.; Nicoll, S.B. Lower Crosslinking Density Enhances Functional Nucleus Pulposus-like Matrix Elaboration by Human Mesenchymal Stem Cells in Carboxymethylcellulose Hydrogels: Crosslinking Density Impacts HMSC Chondrogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.* **2016**, *104*, 165–177, doi:10.1002/jbm.a.35552.
7. Hossen, M.R.; Dadoo, N.; Holomakoff, D.G.; Co, A.; Gramlich, W.M.; Mason, M.D. Wet Stable and Mechanically Robust Cellulose Nanofibrils (CNF) Based Hydrogel. *Polymer* **2018**, *151*, 231–241, doi:10.1016/j.polymer.2018.07.016.
8. Prasad, A.S.; Wilson, J.; Thomas, L.V. Designer Injectable Matrices of Photocrosslinkable Carboxymethyl Cellulose Methacrylate Based Hydrogels as Cell Carriers for Gel Type Autologous Chondrocyte Implantation (GACI). *International Journal of Biological Macromolecules* **2023**, *224*, 465–482, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.137.
9. Zhang, J.; Huang, D.; Liu, S.; Yang, Z.; Dong, X.; Zhang, H.; Huang, W.; Zhou, S.; Wei, Y.; Hua, W.; et al. Water Soluble Photocurable Carboxymethyl Cellulose-based Bioactive Hydrogels for Digital Light Processing. *J of Applied Polymer Sci* **2022**, 52155, doi:10.1002/app.52155.
10. Cafiso, D.; Septevani, A.A.; Noè, C.; Schiller, T.; Pirri, C.F.; Roppolo, I.; Chiappone, A. 3D Printing of Fully Cellulose-Based Hydrogels by Digital Light Processing. *Sustainable Materials and Technologies* **2022**, *32*, e00444, doi:10.1016/j.susmat.2022.e00444.
11. Dutta, S.; Samanta, P.; Dhara, D. Temperature, PH and Redox Responsive Cellulose Based Hydrogels for Protein Delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *87*, 92–100, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.042.
12. Gupta, M.S.; Nicoll, S.B. Functional Nucleus Pulposus-like Matrix Assembly by Human Mesenchymal Stromal Cells Is Directed by Macromer Concentration in Photocrosslinked Carboxymethylcellulose Hydrogels. *Cell Tissue Res* **2014**, *358*, 527–539, doi:10.1007/s00441-014-1962-1.
13. Pacelli, S.; Di Muzio, L.; Paolicelli, P.; Fortunati, V.; Petralito, S.; Trilli, J.; Casadei, M.A. Dextran-Polyethylene Glycol Cryogels as Spongy Scaffolds for Drug Delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2021**, *166*, 1292–1300, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.273.
14. Razavi, M.; Qiao, Y.; Thakor, A.S. Three-dimensional Cryogels for Biomedical Applications. *J Biomed Mater Res* **2019**, *107*, 2736–2755, doi:10.1002/jbm.a.36777.
15. van Dijk-Wolthuis, W.N.E.; Hoogeboom, J.A.M.; van Steenbergen, M.J.; Tsang, S.K.Y.; Hennink, W.E. Degradation and Release Behavior of Dextran-Based Hydrogels. *Macromolecules* **1997**, *30*, 4639–4645, doi:10.1021/ma9704018.

16. Chen, Y.-C.; Lin, R.-Z.; Qi, H.; Yang, Y.; Bae, H.; Melero-Martin, J.M.; Khademhosseini, A. Functional Human Vascular Network Generated in Photocrosslinkable Gelatin Methacrylate Hydrogels. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 2027–2039, doi:10.1002/adfm.201101662.
17. Soullard, L.; Bayle, P.-A.; Lancelon-Pin, C.; Rolere, S.; Texier, I.; Jean, B.; Nonglaton, G. Optimization of the Methacrylation of Carboxymethylcellulose and Use for the Design of Hydrogels and Cryogels with Controlled Structure and Properties. *Cellulose* **2023**, doi:10.1007/s10570-023-05266-w.
18. Rahman, Md.S.; Hasan, Md.S.; Nitai, A.S.; Nam, S.; Karmakar, A.K.; Ahsan, Md.S.; Shiddiky, M.J.A.; Ahmed, M.B. Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose. *Polymers* **2021**, *13*, 1345, doi:10.3390/polym13081345.
19. Singh, R.K.; Khatri, O.P. A Scanning Electron Microscope Based New Method for Determining Degree of Substitution of Sodium Carboxymethyl Cellulose: SEM BASED METHOD FOR DETERMINING DS. *Journal of Microscopy* **2012**, *246*, 43–52, doi:10.1111/j.1365-2818.2011.03583.x.
20. Obele, C.M.; Ewulonu, C.M.; Ogbuagu, J.O. Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Cellulose from Cassava Stem (*Manihot Esculenta*). **2017**.
21. Van Hove, A.H.; Wilson, B.D.; Benoit, D.S.W. Microwave-Assisted Functionalization of Poly(Ethylene Glycol) and On-Resin Peptides for Use in Chain Polymerizations and Hydrogel Formation. *JoVE* **2013**, 50890, doi:10.3791/50890.
22. Fedorova, A.F.; Rogovin, Z.A. A Study of the Relative Reactivity of the Hydroxyl Groups of Cellulose in Esterification in an Acidic Medium. *Polymer Science U.S.S.R.* **1963**, *4*, 1189–1194, doi:10.1016/0032-3950(63)90350-2.
23. Berruyer, P.; Gericke, M.; Moutzouri, P.; Jakobi, D.; Bardet, M.; Karlson, L.; Schantz, S.; Heinze, T.; Emsley, L. Advanced Characterization of Regioselectively Substituted Methylcellulose Model Compounds by DNP Enhanced Solid-State NMR Spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* **2021**, *262*, 117944, doi:10.1016/j.carbpol.2021.117944.
24. Akram, M.; Taha, I.; Ghobashy, M.M. Low Temperature Pyrolysis of Carboxymethylcellulose. *Cellulose* **2016**, *23*, 1713–1724, doi:10.1007/s10570-016-0950-x.
25. Ibrahim, A.A.; Adel, A.M.; El-Wahab, Z.H.A.; Al-Shemy, M.T. Utilization of Carboxymethyl Cellulose Based on Bean Hulls as Chelating Agent. Synthesis, Characterization and Biological Activity. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *83*, 94–115, doi:10.1016/j.carbpol.2010.07.026.
26. Chi, C.; Li, X.; Zhang, Y.; Miao, S.; Chen, L.; Li, L.; Liang, Y. Understanding the Effect of Freeze-Drying on Microstructures of Starch Hydrogels. *Food Hydrocolloids* **2020**, *101*, 105509, doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105509.
27. El-Sayed, S.; Mahmoud, K.H.; Fatah, A.A.; Hassen, A. DSC, TGA and Dielectric Properties of Carboxymethyl Cellulose/Polyvinyl Alcohol Blends. *Physica B: Condensed Matter* **2011**, *406*, 4068–4076, doi:10.1016/j.physb.2011.07.050.
28. Gupta, S.; Varshney, P.K. Effect of Plasticizer on the Conductivity of Carboxymethyl Cellulose-Based Solid Polymer Electrolyte. *Polym. Bull.* **2019**, *76*, 6169–6178, doi:10.1007/s00289-019-02714-1.
29. Tomal, W.; Ortyl, J. Water-Soluble Photoinitiators in Biomedical Applications. *Polymers* **2020**, *12*, 1073, doi:10.3390/polym12051073.
30. Ligon, S.C.; Liska, R.; Stampfl, J.; Gurr, M.; Mühlaupt, R. Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10212–10290, doi:10.1021/acs.chemrev.7b00074.
31. Capitani, D.; Del Nobile, M.A.; Mensitieri, G.; Sannino, A.; Segre, A.L. ¹³C Solid-State NMR Determination of Cross-Linking Degree in Superabsorbing Cellulose-Based Networks. *Macromolecules* **2000**, *33*, 430–437, doi:10.1021/ma9914117.
32. Flory, P.J.; Rehner, J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks. **9**.

33. Ganji, F.; Vasheghani-Farahani, S.; Vasheghani-Farahani, E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iranian Polymer Journal* **2010**, *5*, 375–398.
34. Plieva, F.M.; Karlsson, M.; Aguilar, M.-R.; Gomez, D.; Mikhalovsky, S.; Galaev, I.Y. Pore Structure in Supermacroporous Polyacrylamide Based Cryogels. **2005**, *7*.
35. Cassanelli, M.; Norton, I.; Mills, T. Role of Gellan Gum Microstructure in Freeze Drying and Rehydration Mechanisms. *Food Hydrocolloids* **2018**, *75*, 51–61, doi:10.1016/j.foodhyd.2017.09.013.
36. Abbasi, N.; Hamlet, S.; Love, R.M.; Nguyen, N.-T. Porous Scaffolds for Bone Regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* **2020**, *5*, 1–9, doi:10.1016/j.jsamd.2020.01.007.
37. Sindhu, K.A.; Prasanth, R.; Thakur, V.K. Medical Applications of Cellulose and Its Derivatives: Present and Future. In *Nanocellulose Polymer Nanocomposites*; Thakur, V.K., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2014; pp. 437–477 ISBN 978-1-118-87224-6.
38. Annabi, N.; Nichol, J.W.; Zhong, X.; Ji, C.; Koshy, S.; Khademhosseini, A.; Dehghani, F. Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **2010**, *16*, 371–383, doi:10.1089/ten.teb.2009.0639.
39. Schott, H. Kinetics of Swelling of Polymers and Their Gels. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1992**, *81*, 467–470, doi:10.1002/jps.2600810516.
40. Capanema, N.S.V.; Mansur, A.A.P.; de Jesus, A.C.; Carvalho, S.M.; de Oliveira, L.C.; Mansur, H.S. Superabsorbent Crosslinked Carboxymethyl Cellulose-PEG Hydrogels for Potential Wound Dressing Applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *106*, 1218–1234, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.124.
41. Chang, C.; Duan, B.; Cai, J.; Zhang, L. Superabsorbent Hydrogels Based on Cellulose for Smart Swelling and Controllable Delivery. *European Polymer Journal* **2010**, *46*, 92–100, doi:10.1016/j.eurpolymj.2009.04.033.
42. Park, H.J.; Min, K.D.; Lee, M.C.; Kim, S.H.; Lee, O.J.; Ju, H.W.; Moon, B.M.; Lee, J.M.; Park, Y.R.; Kim, D.W.; et al. Fabrication of 3D Porous SF/β-TCP Hybrid Scaffolds for Bone Tissue Reconstruction: Fabrication of 3D Porous SF/β-TCP. *J. Biomed. Mater. Res.* **2016**, *104*, 1779–1787, doi:10.1002/jbm.a.35711.
43. Means, A.K.; Grunlan, M.A. Modern Strategies To Achieve Tissue-Mimetic, Mechanically Robust Hydrogels. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8*, 705–713, doi:10.1021/acsmacrolett.9b00276.
44. Stalling, S.S.; Akintoye, S.O.; Nicoll, S.B. Development of Photocrosslinked Methylcellulose Hydrogels for Soft Tissue Reconstruction. *Acta Biomaterialia* **2009**, *5*, 1911–1918, doi:10.1016/j.actbio.2009.02.020.
45. Heger, R.; Kadlec, M.; Trudicova, M.; Zinkovska, N.; Hajzler, J.; Pekar, M.; Smilek, J. Novel Hydrogel Material with Tailored Internal Architecture Modified by “Bio” Amphiphilic Components—Design and Analysis by a Physico-Chemical Approach. *Gels* **2022**, *8*, 115, doi:10.3390/gels8020115.
46. Bai, X.; Gao, M.; Syed, S.; Zhuang, J.; Xu, X.; Zhang, X.-Q. Bioactive Hydrogels for Bone Regeneration. *Bioactive Materials* **2018**, *3*, 401–417, doi:10.1016/j.bioactmat.2018.05.006.
47. Chaudhuri, O.; Cooper-White, J.; Janmey, P.A.; Mooney, D.J.; Shenoy, V.B. Effects of Extracellular Matrix Viscoelasticity on Cellular Behaviour. *Nature* **2020**, *584*, 535–546, doi:10.1038/s41586-020-2612-2.
48. Caliarì, S.R.; Burdick, J.A. A Practical Guide to Hydrogels for Cell Culture. *Nat Methods* **2016**, *13*, 405–414, doi:10.1038/nmeth.3839.

CHAPITRE IV.

***Renforcement d'hydrogels de mCMC par
l'ajout de nanocristaux de cellulose avec
et sans méthacrylates***

IV.1. INTRODUCTION

Les hydrogels de mCMC exposés dans le chapitre précédent présentent des propriétés de viscoélasticité et de gonflement qui les rendent prometteurs pour diverses applications médicales, telles que la délivrance de principes actifs ou la réparation de tissus mous. Cependant, lorsque la concentration en groupements méthacrylates dans les formulations demeure trop faible, les hydrogels formés après photo-réticulation présentent une résistance mécanique limitée. Pour améliorer cette propriété, l'idée d'incorporer des nanocristaux de cellulose (NCC) en tant que charge dans ces hydrogels a été envisagée. Cette approche a déjà été mise en œuvre avec succès dans différents hydrogels à base de biopolymères, ainsi que dans le domaine des nanocomposites en général [1,2]. De plus, les NCC peuvent être fonctionnalisés de manière à participer activement à la réticulation et ainsi renforcer le réseau, ce qui permet d'améliorer encore davantage les propriétés mécaniques. Lors de la réalisation de cette étude, en 2022, Cafiso *et al.*, ont publié un article où ils ont ajouté des NCC et des NCC méthacrylate (mNCC) dans une formulation de mCMC [3]. Dans ce dernier travail, les formulations contenant des NCC ou des mNCC, ont conduit à la formation d'hydrogels présentant une plus grande résistance par rapport à ceux élaborés uniquement avec de la mCMC. Ces hydrogels ont été imprimés par DLP et la présence des mNCC a permis d'obtenir des hydrogels avec des parois fines. Cependant, la fidélité de leur forme était limitée en raison d'une polymérisation non maîtrisée [3].

Ces dernières années, plusieurs méthodes de méthacrylation des NCC ont été développées, notamment par réaction avec l'anhydride méthacrylique (AM) [4–7]. Dans ce chapitre, les NCC seront méthacrylés avec de l'AM dans les mêmes conditions qu'avec la CMC. Cette réaction particulière a déjà été appliquée aux nanofibrilles de cellulose (NFC) et, une seule fois, aux NCC, mais de manière très peu détaillée dans ce dernier cas [7,8]. En effet, dans cet article, le protocole de méthacrylation est bien décrit mais aucune caractérisation des matériaux fonctionnalisés obtenus n'a été présentée [7]. Dans cette étude, suite au développement de la méthacrylation des NCC, l'influence des NCC ou des mNCC dans l'une des formulations de mCMC présentées dans le chapitre III, a été examinée du point de vue de l'imprimabilité et des propriétés des hydrogels. De plus, étant donné que la CMC et les NCC sont reconnus pour leur biocompatibilité, une évaluation de la cytotoxicité a été menée sur les cryogels de différentes compositions, dont les résultats seront résumés. Une partie de ces travaux fait actuellement l'objet d'un article en cours de soumission.

IV.2. MÉTHACRYLATION DES NCC

Cette partie est consacrée à l'étude de la méthacrylation et la quantification du degré de méthacrylation (DM) des mNCC produits. Dans ce contexte, il sera développé l'influence du nombre d'équivalent en anhydride méthacrylique (AM) ajouté par rapport aux groupements hydroxyles en surface des NCC, sur le DM, sur la cristallinité et sur le degré de sulfatation (DS) des mNCC. Enfin une étude cinétique de la réaction sera menée.

IV.2.1. DÉTERMINATION DU DEGRÉ DE MÉTHACRYLATION

De la même manière que la fonctionnalisation de la CMC, des groupements méthacrylates ont été greffés sur les hydroxyles en surface des NCC en utilisant la réaction d'estérification avec l'anhydride méthacrylique (AM) (**Figure IV-1**). Pour des questions de temps, la réaction à la surface des NCC n'a pas été optimisée. Étant donné que la méthacrylation sur les CMC n'a pas été impactée par la température, celle sur les NCC a été conduite à température ambiante, au lieu de 50 °C comme proposé par Ma *et al.*, seule publication référencée sur cette réaction avec les NCC en milieu aqueux [7].

Dans ce travail, l'influence du rapport molaire entre l'AM et les groupements hydroxyles à la surface des NCC (AM/OH_{surf}) ainsi que la cinétique de méthacrylation ont été étudiées.

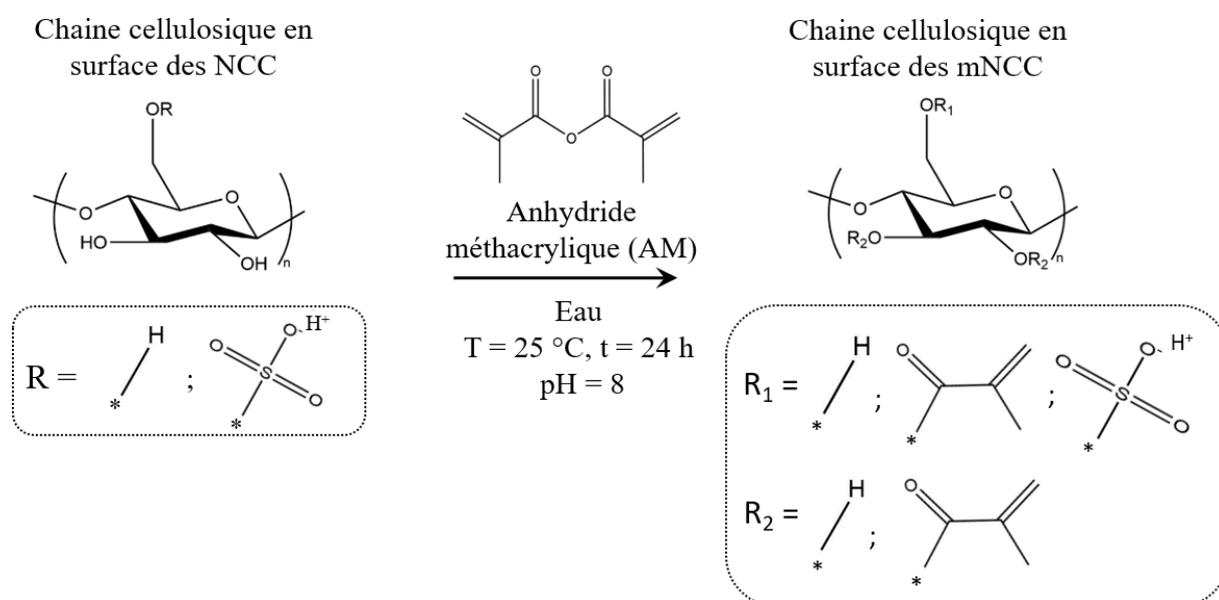


Figure IV-1 : Méthacrylation des nanocristaux de cellulose (NCC) avec de l'anhydride méthacrylique (AM) dans l'eau à 25 °C pour obtenir des nanocristaux de cellulose méthacrylate (mNCC). Étant donné que la réaction ne se produit qu'en surface car les conditions de synthèse ne sont pas celles de gonflement ou de coupures des chaînes, il n'est pas possible d'avoir simultanément $R_1 = R_2 =$ groupement méthacrylate.

Tout d'abord, les mNCC produits ont été caractérisés par spectroscopie FT-IR et comparés au spectre des NCC non modifiés (**Figure IV-2**). Plusieurs bandes caractéristiques sont partagées par les deux matériaux. Les bandes des liaisons C-H apparaissent autour de 2900 cm^{-1} et 1335 cm^{-1} et proviennent des groupes CH_2 présents dans la structure de la cellulose [9]. Les bandes de vibrations présentes entre 850 et 1200 cm^{-1} sont caractéristiques des monomères de glucose et la bande à 1060 cm^{-1} est caractéristique de la liaison glycosidique C-O-C. Les spectres sont normalisés par cette bande qui n'évolue pas suite à la réaction. L'apparition de la bande à 1713 cm^{-1} sur les spectres des mNCC, correspond au groupement carbonyle (C=O) du méthacrylate et prouve qualitativement le succès de la méthacrylation [5,10]. Les bandes caractéristiques des alcènes C=C des méthacrylates, normalement situées autour de $1600 - 1640\text{ cm}^{-1}$ présentent souvent une intensité plus faible de celle des C=O. Il est donc difficile de déterminer la présence des alcènes sur le spectre des mNCC dont le pic caractéristique est confondu avec le signal à 1644 cm^{-1} attribué à la vibration O-H de l'eau absorbée [9,11]. Enfin, la bande la plus significative est celle des liaisons O-H, située dans la plage de 3200 à 3600 cm^{-1} avec l'absorption maximale à 3338 cm^{-1} correspondant aux liaisons hydrogène intermoléculaires [12–14]. Cette bande diminue après la méthacrylation, prouvant qu'un certain nombre des groupements hydroxyles ont été substitués.

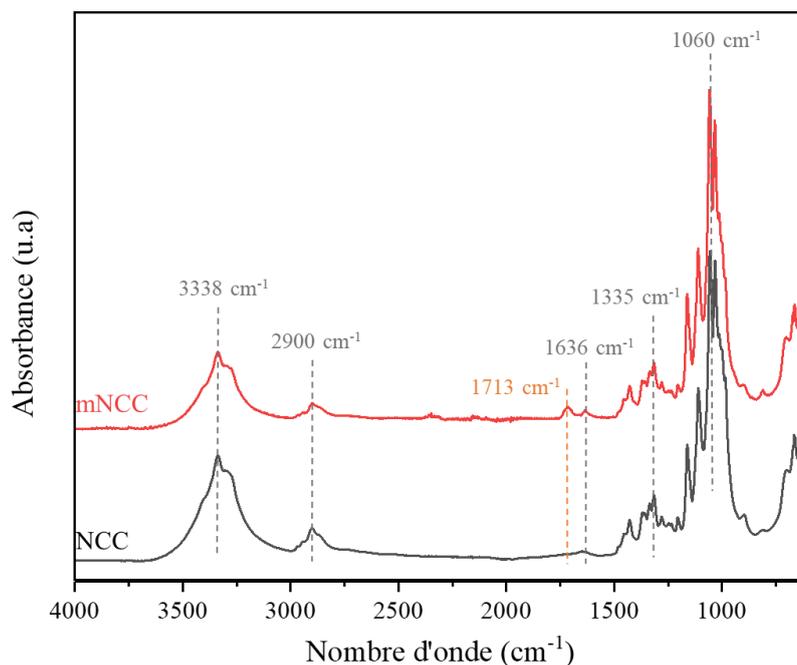


Figure IV-2 : Spectres FT-IR des nanocristaux de cellulose (NCC, en noir) et des nanocristaux de cellulose méthacrylate (mNCC, en rouge). Sur cet exemple, la méthacrylation a été réalisée avec un ratio molaire en anhydride méthacrylique par groupement hydroxyle de la surface des NCC égal à 12.

Tous les mNCC synthétisés ont été caractérisés par spectroscopie RMN ^{13}C CP-MAS à l'état solide et comparés aux NCC d'origine pour déterminer le degré de méthacrylation (DM) (**Figure IV-3**). D'après la littérature, les carbones des NCC (C1-C6) se situent entre 56 ppm et

110 ppm (**Figure IV-3a**) [15]. Le carbone C1 présente le déplacement chimique le plus élevé à 104 ppm, et le dédoublement du pic à son sommet correspond à la structure monoclinique I β du réseau des chaînes de cellulose au sein des NCC de coton [16]. Le signal à 89 ppm est attribué aux carbones C4 situés à l'intérieur de la structure cristalline des NCC, tandis que le signal à 84 ppm correspond aux carbones C4 à la surface des NCC [17]. Les signaux des carbones C2, C3 et C5 sont situés entre 68 et 80 ppm, et le signal du C6 à 65 ppm. Pour ce dernier, comme pour le C4, un signal correspondant aux zones amorphes de surface apparaît sous la forme d'un épaulement à droite du signal à 65 ppm. Il nécessiterait d'effectuer une déconvolution du signal pour mieux les identifier. Dans le cas des mNCC, quatre pics supplémentaires correspondant aux carbones des carbonyle (C7 : 167 ppm), vinyle (C8 : 136 ppm et C9 : 127 ppm) et méthyle (C10 : 18 ppm) des groupes méthacrylates ont également été observés après purification, ce qui indique que la méthacrylation s'est produite en surface dans les conditions expérimentales réalisées comme l'ont démontré Wang *et al.* sur la méthacrylation des NCC avec l'acide méthacrylique (**Figure IV-3b**) [10]. Enfin, à partir de ces spectres de RMN ^{13}C CP-MAS, en utilisant l'intégration du carbone C1 comme référence avec une valeur de 1, l'intégration du carbone C4 a été évaluée à une aire de 1 et celle des carbones C2, C3, C5 et C6 entre 50 et 94 ppm a conduit à une aire de 4, ce qui indique une optimisation de la polarisation de ces carbones selon les paramètres d'acquisition. Le degré de méthacrylation (DM) des échantillons de mNCC est ensuite calculé à partir du signal C10. Le carbone C10 correspondant aux CH_3 des groupements méthacrylates, répond à son maximum d'intensité dans les conditions de mesures et par conséquent est le plus adapté à la quantification du DM que les carbones insaturés C7-9 (**Annexe IV-1**) [18].

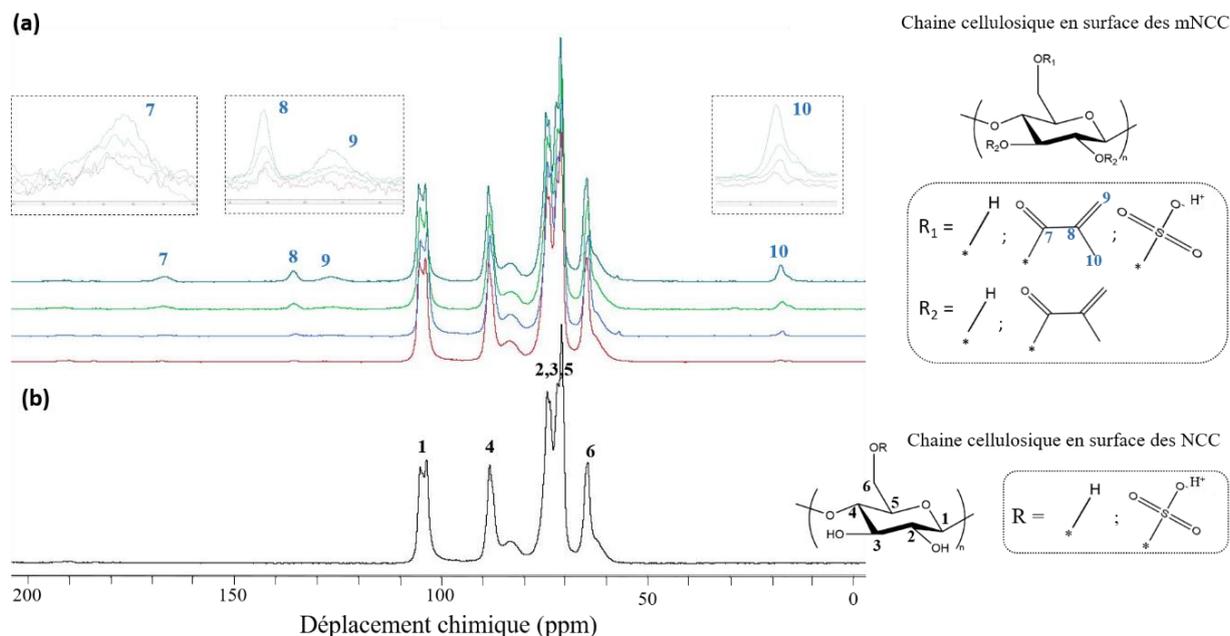


Figure IV-3 : Spectres RMN ^{13}C CP-MAS à l'état solide (a) des mNCC obtenus après méthacrylation avec du bas vers le haut, 3,0, 6,0, 12 et 24 équivalents en anhydride méthacrylique par groupement hydroxyle présent en surface des NCC et (b) des NCC.

Le seul paramètre qui a été varié pour la réaction de méthacrylation des NCC est le rapport molaire $N_{eq} AM/OH_{surf}$. En augmentant ce rapport de 0 à 24, une augmentation continue des intégrales de tous les pics du méthacrylate (C7-10) est observée, conduisant à une augmentation linéaire du DM (**Figure IV-4**; $R^2 = 0,99$). Une valeur maximale du DM atteint $12,6 \pm 0,50$ % pour les mNCC obtenus en utilisant un rapport $N_{eq} AM/OH_{surf}$ de 24. D'après ces résultats et étant donné qu'aucune valeur plateau n'a été atteinte, il est très probable qu'un DM plus élevé puisse être obtenu en utilisant un rapport AM/OH_{surf} initial plus important. Cependant, l'étude de rapports molaires supérieurs à 24 n'a pas été entreprise étant donné que ce nombre d'équivalents excède déjà ce que l'on pourrait qualifier de chimie respectueuse de l'économie d'atome. En effet, il correspond à un volume d'AM d'un tiers (32 mL) par rapport à celui des NCC en suspension dans l'eau ($100\text{ g} \approx 100\text{ mL}$). A titre de comparaison avec la même réaction réalisée sur les NFC, Kelly *et al.* ont obtenu un maximum de 0,07 groupe méthacrylate par anhydroglucose (DM = 7 %) après méthacrylation avec l'AM en milieu aqueux, tandis que Brusentsev *et al.* ont obtenu un DM de 3 % dans le DMF [8,19]. Ma *et al.* sont les seuls à avoir appliqué un tel protocole de méthacrylation aux NCC. Malheureusement, les auteurs n'ont pas fourni d'informations sur le DM obtenu [7]. En revanche, en utilisant la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), Bai *et al.* ont obtenu un DM de 0,68 % [5].

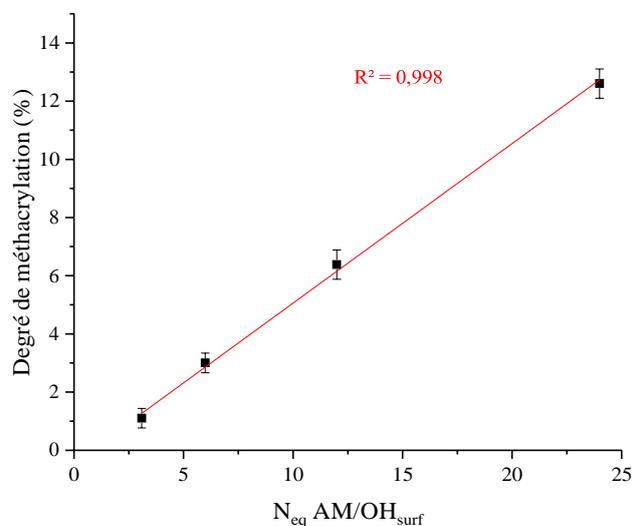


Figure IV-4 : Évolution du degré de méthacrylation (DM) des mNCC en fonction du rapport molaire entre l'AM et les groupements hydroxyles en surface des NCC après 24 heures de réaction.

IV.2.3. TAUX DE CRISTALLINITÉ

Dans ces travaux, la cristallinité des nanocristaux a été caractérisée par RMN ^{13}C CP-MAS du solide sur les NCC ainsi que sur les mNCC possédants un DM de 6,3 % et 12,6 %. Cette méthode consiste à étudier le pic caractéristique du C4 à 89 ppm correspondant

à la partie cristalline des NCC et celui à 84 ppm correspondant à la partie amorphe. Le taux de cristallinité (TC) peut être calculé par l'**Equation IV-1** [20,21]:

$$TC = \frac{I_{Cr}}{I_{Cr} + I_{am}} \quad (\text{Equation IV-1})$$

Où I_{Cr} est la valeur de l'intégration du signal du C4 cristallin (85 – 92 ppm) et I_{am} est la valeur de l'intégration du signal du C4 amorphe (79 – 85 ppm). L'intégration est effectuée en considérant le carbone anomérique C1 comme référence (intégrale = 1). La superposition des spectres des différents nanocristaux n'indique aucune modification visuelle sur la cristallinité. Cette constatation est confirmée en calculant le TC. En effectuant directement l'intégration sur les spectres, les taux de cristallinité sont estimés à 73 % pour les NCC et les mNCC avec un DM de 12,8 % et de 75 % pour les mNCC (DM = 6,3 %). Cependant, cette intégration peut être biaisée en raison du chevauchement des deux pics du C4. En utilisant la déconvolution du logiciel TopSpin pour isoler et intégrer séparément les deux pics du C4, les TC sont évalués à 68 % pour les NCC, 67 % pour les mNCC (DM = 12,6 %) et de 69 % pour les mNCC (DM = 6,3 %) (**Figure IV-5**). Il est intéressant de noter que le calcul du TC n'a pas mis en évidence de variation significative du rapport amorphe/cristallin des NCC, ce qui indique que la structure cristalline n'a pas été modifiée au cours de la méthacrylation. De plus, les taux de cristallinité obtenus sont cohérents avec ceux déterminés dans la littérature pour les nanocristaux de cellulose issus du coton [20,22]. Ce résultat indique que le rapport surface sur volume des particules a été préservé au cours de la réaction. Autrement dit, la réaction de méthacrylation ne s'opère qu'en surface des NCC. Quantitativement, la fraction amorphe (32 %) correspond au pourcentage de chaîne cellulosiques en surface des NCC par rapport au nombre de chaînes total. Cette valeur permet la détermination du DM surfacique (DM_{surf}). En rapportant la valeur du DM à un DM_{surf} par l'**Equation IV-2**, 39 % des unités glycosidiques en surface ont été fonctionnalisées avec $N_{eq} AM/OH_{surf} = 24$ soit 26 % des hydroxyles présents en surface (1,5 OH par unité). Il est probable que la réaction se fasse préférentiellement sur les groupements hydroxyles primaires du C6 qui sont plus réactifs, puis lorsque tous ces hydroxyles sont consommés, l'estérification peut se poursuivre sur les alcools secondaires en C2 et C3.

$$DM_{surf} = \frac{DM}{0,32} \quad (\text{Equation IV-2})$$

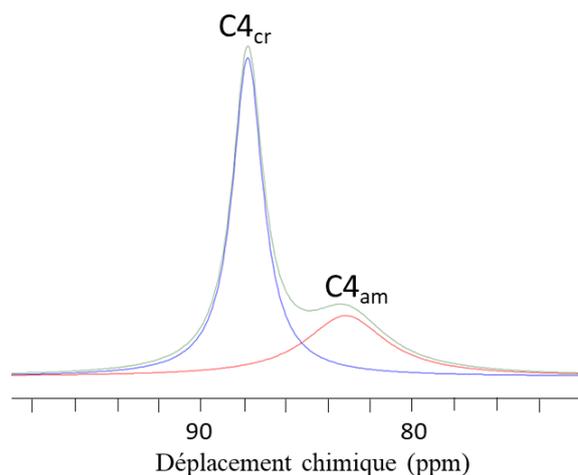


Figure IV-5 : Déconvolution effectuée sur le carbone C4 des NCC utilisés, entre 74 et 94 ppm pour la quantification des phases cristalline ($C4_{cr}$) et amorphe ($C4_{am}$) du C4.

IV.2.4. EVOLUTION DU DS

Il est intéressant de noter que la méthacrylation des NCC semble, dans certaines conditions, diminuer leur stabilité colloïdale dans l'eau comme le témoigne l'observation d'un précipité lors de la dialyse (**Annexe IV-1**). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cet effet. La dispersion des nanocristaux est possible grâce aux répulsions électrostatiques entre les groupes ester-sulfates chargés négativement présents à la surface des NCC et greffés de manière covalente sur les OH du C6 lors du processus d'hydrolyse [23]. Ainsi, toute diminution du taux de sulfate au cours du processus de méthacrylation est nuisible à une dispersion sous forme de particules individuelles et pourrait conduire à la formation d'agrégats. De plus, les méthacrylates greffés en surface des NCC sont hydrophobes et pourraient favoriser des interactions attractives entre NCC. Dans ce contexte, le dosage conductimétrique a été utilisé pour déterminer la teneur en groupement esters sulfates présents à la surface des NCC et des mNCC. Les NCC ont un degré de sulfatation (DS) de $3,40 \pm 0,21$ % ($DS_{surf} = 21,2$ %). Après méthacrylation, le DS diminue progressivement avec l'augmentant du rapport molaire en AM/OH_{surf} (**Figure IV-6**). A titre d'exemple, pour des nombres d'équivalents en AM/OH_{surf} de 3,0 et 24, une perte de 35 % ($DS = 2,20 \pm 0,07$ %) et 77 % de sulfates ($DS = 0,78 \pm 0,03$ %) est constatée. Il a été montré que l'ajout de NaOH pouvait désulfater les NCC [24]. Kloser et Gray ont ajouté 1,7 M de NaOH à 85 °C pendant 72 h à une dispersion de NCC concentrée à 2,8 %m et ont observé une diminution de 83 % de la teneur en sulfate [25]. Pour vérifier l'impact de l'ajout de NaOH sur le DS et par conséquent sur la stabilité de la suspension de nanocristaux pendant le processus de méthacrylation, 0,05 M de NaOH a été ajouté à 100 mL d'une dispersion aqueuse de NCC à 2,3 %m jusqu'à atteindre pH = 10 puis laissé pendant 24 h sous agitation. Après purification, le DS final était de $1,80 \pm 0,07$ %, soit 47 % de moins que le DS initial. Lors

de la méthacrylation, plus le rapport molaire $N_{eq} \text{ AM/OH}_{surf}$ est élevé, plus le volume de NaOH nécessaire pour réaliser la réaction est important, et donc plus le DS final est faible. Ceci prouve la libération des sulfates avec l'ajout de soude et donc l'instabilité des mNCC résultant. Une quantification par analyse élémentaire a été testée mais les incertitudes élevées obtenues n'ont pas permis de conclure. Enfin, pour un rapport molaire en AM par rapport aux groupements hydroxyles en surface des NCC de 24, le DS en surface (DS_{surf}) est de 4,5 % et le DM_{surf} de 78 %, ce qui équivaut en moyenne à 55 % des hydroxyles en surface qui sont substitués.

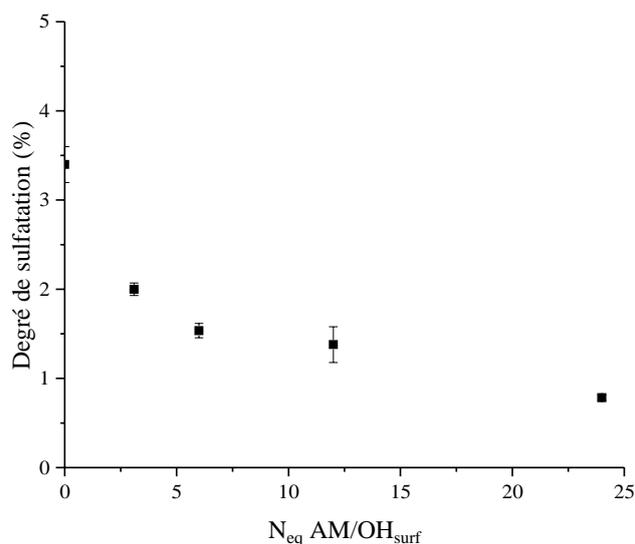


Figure IV-6 : Évolution du degré de sulfatation (DS) des mNCC en fonction du rapport molaire entre l'AM et les hydroxyles de surface des NCC après 24 heures de réaction.

IV.2.5. CINÉTIQUE DE MÉTHACRYLATION

Afin de mieux comprendre l'évolution du DM et du DS au cours de la réaction, une étude cinétique a été réalisée lors de la méthacrylation des NCC en utilisant un rapport $N_{eq} \text{ AM/OH}_{surf}$ de 12 (**Figure IV-7**). Tout d'abord, dans les conditions de synthèse utilisées, le DM maximal ($6,3 \pm 0,34$ %) est atteint lorsque la réaction est arrêtée après 24 heures. Le DM augmente rapidement au cours des 2 premières heures pour atteindre $4,4 \pm 1,0$ %, puis la vitesse de méthacrylation diminue. En conséquence, après 5 h de réaction, la quantité de NaOH à ajouter pour maintenir le pH à 8 diminue. De même, le DS diminue rapidement les 2 premières heures en perdant 32 % de sulfates puis plus lentement ensuite. Il y a donc une corrélation directe en l'évolution du DS et la quantité de soude ajoutée au cours du temps. Pour éviter la perte de sulfates et conserver la stabilité dans l'eau des mNCC, il pourrait être envisagé de greffer en amont des carboxylates à la surface des NCC via une oxydation TEMPO par exemple [19,26]. Par ailleurs, on peut remarquer qu'à un temps de réaction court (< 2 h), avec le rapport molaire $N_{eq} \text{ AM/OH}_{surf}$ de 12, malgré un DM plus faible, le DS peut être suffisamment élevé pour une stabilisation des mNCC. En utilisant cette stratégie et un rapport $N_{eq} \text{ AM/OH}_{surf}$ de 3,0, des mNCC avec un DM de $0,83 \pm 0,040$ % ($DM_{surf} = 5,5$ %) et un DS de 2,9 % ont été

obtenus en arrêtant la méthacrylation après 30 min. Ce constat renforce l'idée que 24 heures de réaction ne sont pas indispensables, d'autant plus que le DM atteint après cette période est seulement de 1,1 %.

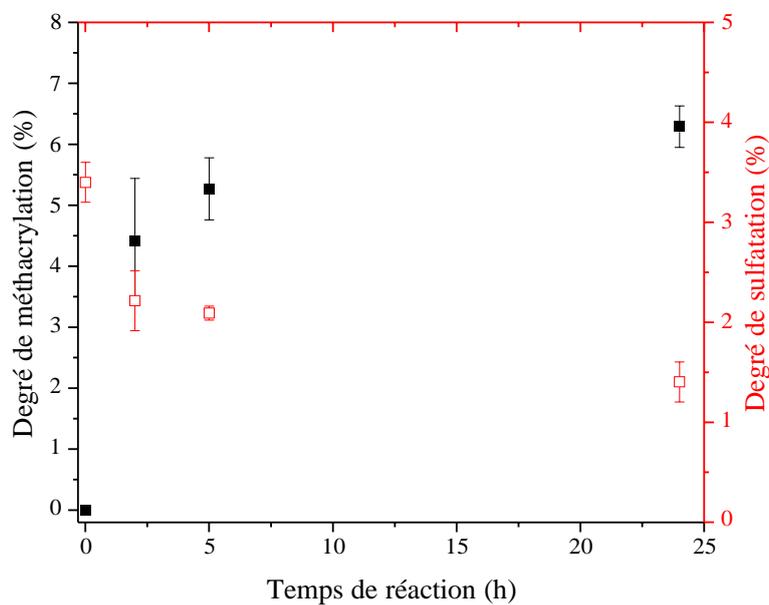


Figure IV-7 : Evolution des degrés de méthacrylation (DM) et de sulfatation (DS) des mNCC pendant la méthacrylation, en utilisant un rapport en AM/OH_{surf} de 12. Les valeurs des DS et DM ont été mesurées par titrations conductimétriques et par spectroscopie RMN du solide ^{13}C CP-MAS, respectivement.

IV.3. DISPERSIONS DES NCC ET MNCC

Cette section aborde l'étude de la dispersion des mNCC et des NCC à différentes concentrations dans l'eau grâce à des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) et par microscopie électronique à transmission (TEM). Ensuite, les NCC seront incorporés dans des solutions de mCMC à une concentration de 2 %m et des DM de 34 % et 50 %. Enfin, la détermination de la composition optimale en mCMC et NCC sera entreprise en vue de créer ultérieurement des formulations contenant des mNCC. Des analyses de viscosité seront réalisées dans cette perspective.

IV.3.1. DISPERSION DES NANOCRISTAUX DANS L'EAU

La plupart des mNCC synthétisés ont subi une agrégation partielle suivie d'une sédimentation lors de la purification par dialyse (**Annexe IV-1**) en raison de la diminution du taux de charges de surface et du greffage de groupements hydrophobes. Seuls les mNCC avec des DM de 1,1 % et de 4,4 % et un DS de 2,05 % et de 2,3 %, respectivement, n'ont pas été affectés par ce phénomène. Cependant, lors de la lyophilisation après la dialyse, tous les mNCC n'ont pas pu être redispersés (**Figure IV-8a**). En effet, lors des étapes de congélation puis de lyophilisation, les nanocristaux s'agrègent les uns aux autres en raison des liaisons hydrogène qu'ils établissent avec les contre-ions H^+ présents en fin de dialyse. En revanche, les mNCC synthétisés après 30 minutes de réaction (DM = 0,83 % et DS = 2,9 %) ont pu être redispersés après la lyophilisation (**Figure IV-8c**). Dans ce cas particulier, la phase de dialyse a été menée suffisamment longtemps pour éliminer les sous-produits de réaction, mais pas assez longtemps pour éliminer tous les contre-ions Na^+ . Pour remettre en dispersion les mNCC lyophilisés sous forme acide, Beck *et al.* ont augmenté le pH jusqu'à 7,0 en utilisant de la soude [27]. Cependant, en ajoutant 5 mM de NaOH jusqu'à atteindre un pH de 7,0 dans une solution de mNCC (DM = 1,1 % et DS = 2,05 %), la dispersion a été partielle (**Figure IV-8b**). Par ailleurs, en conservant une partie des mNCC avec un DM plus élevé en dispersion après la dialyse, il aurait été possible de les conserver dans cet état. Cependant, avant ces découvertes, les mNCC 0,83 % ont été étudiés dans des formulations de mCMC et suffisamment menée pour la recommencer avec d'autres mNCC.

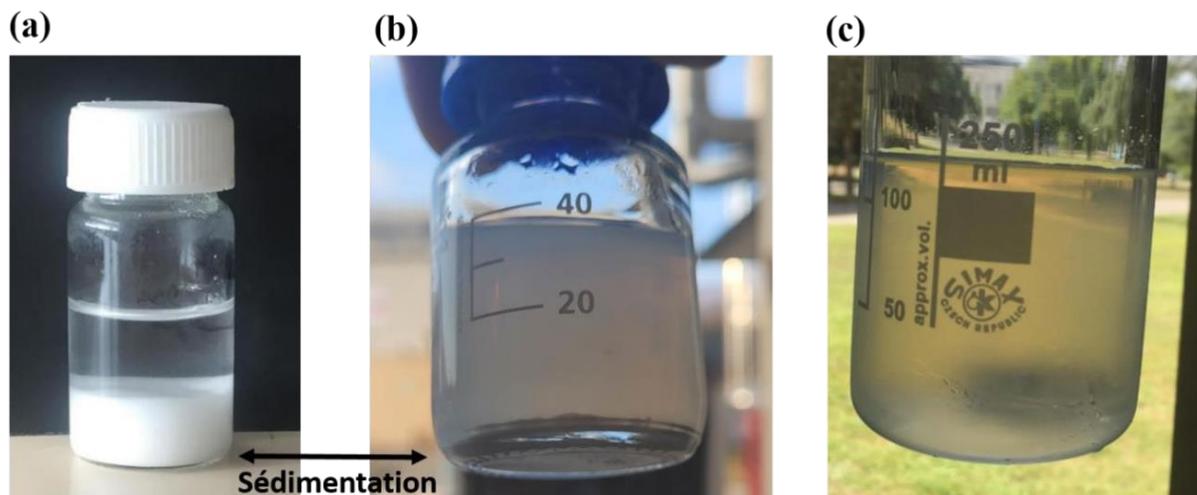


Figure IV-8 : (a) Sédimentation des mNCC possédants un DM de 6,3 % et un DS de 1,2 % après lyophilisation, (b) dispersion partielle des mNCC possédants un DM de 1,1 % et un DS de 2,05 % après lyophilisation suivi d'un ajustement à pH = 7, (c) dispersion des mNCC possédants un DM = 0,83 % et un DS = 2,9 % après lyophilisation.

Avant d'être ajoutées aux formulations de mCMC, les dispersions de mNCC avec un DM de 0,83 % ont été caractérisées par MET et DLS. Les images MET n'ont montré aucune différence entre la morphologie des nanocristaux avant et après la méthacrylation (**Figure IV-9 a et b**). Dans les deux cas des nanocristaux bien individualisés ont été observés. Ils sont constitués de quelques cristallites élémentaires accolées latéralement et présentent une longueur inférieure à 200 nm, en accord avec la littérature [28,29]. Les mesures par DLS ont indiqué des diamètres hydrodynamiques (d_H) comparables de 98 nm et 91 nm, ainsi que des indices de polydispersité (PDI) de 0,14 et 0,24, pour les dispersions de NCC et mNCC, respectivement (**Figure IV-9c**). Les résultats de DLS concordent ainsi parfaitement avec les observations MET et valident la bonne dispersion des mNCC sélectionnés.

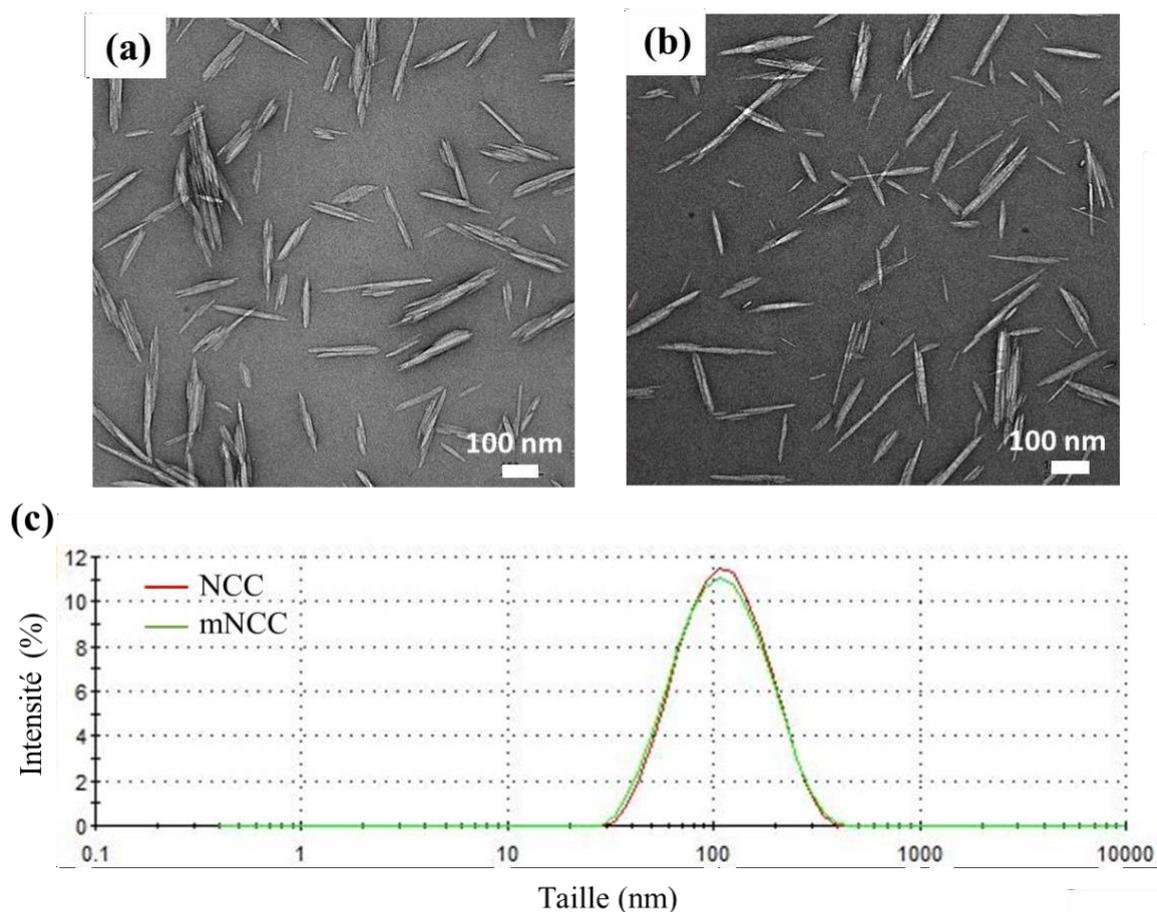


Figure IV-9 : Image MET des (a) NCC, (b) mNCC et (c) distribution de taille en intensité par DLS des NCC et mNCC. Les NCC et les mNCC ont respectivement des DS de 3,4 % et 2,9 % et des DM de 0 % et de 0,83 %. Les mesures de DLS sont réalisées à 25 °C sur des dispersions de 0,1 %m de nanocristaux dans l'eau. Pour les images MET, les dispersions des nanocristaux ont été diluées de manière à obtenir une densité évitant la superposition des particules.

Les deux techniques précédentes ayant nécessité une dilution des suspensions, les hypothèses émises peuvent être vérifiées par de l'absorbance UV-visible dans le cas d'une concentration en nanocristaux plus élevée. Une augmentation de l'absorbance dans l'UV-visible d'une dispersion de nanocristaux de cellulose dans l'eau peut indiquer plusieurs phénomènes. Tout d'abord, une augmentation de la concentration affecte l'absorbance mesurée qui augmente [30]. Ceci est observé **Figure IV-10**, où l'absorbance augmente avec la concentration en NCC et en mNCC sur toute la plage de longueurs d'ondes étudiée (350 - 800 nm). De plus, une augmentation de l'absorbance peut indiquer une taille moyenne de nanocristaux plus importante [30]. Cependant, il n'y a pas de différence notable dans la taille et la polydispersité entre les NCC et les mNCC. En revanche, la dispersion des NCC présente une absorbance plus élevée que celle des mNCC à concentration égale, sur toute la gamme des longueurs d'ondes, potentiellement attribuable à une différence de diffusion liée à la présence des méthacrylates (**Figure IV-10**). Ces deux suspensions de NCC et de mNCC ont ensuite été utilisées dans différentes formulations de mCMC.

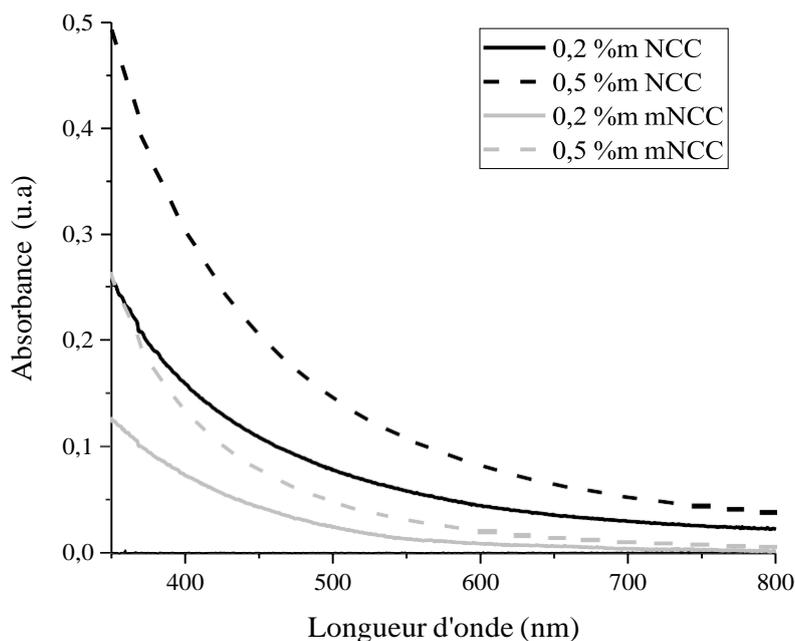


Figure IV-10 : Spectres UV-vis dans la gamme de 350 à 800 nm pour des NCC et mNCC

(DM = 0,83 %) dispersés dans l'eau à des concentrations de 0,2 et 0,5 %m.

IV.3.2. DISPERSION DES NCC DANS UNE SOLUTION DE MCMC

Tout d'abord, les NCC ont été ajoutés dans deux solutions de mCMC concentrées à 2 %m dans l'eau et possédant des DM 34 % et 50 %. Ces concentrations ont été sélectionnées en raison de leur viscosité moindre par rapport aux autres formulations examinées dans cette section III.4.3. Une proportion massique en NCC équivalente à celle de la mCMC (2 %m) a d'abord été étudiée. Les mélanges obtenus sont blanchâtres, ce qui peut indiquer une mauvaise dispersion des NCC dans le milieu. La viscosité de ces mélanges a été comparée aux viscosités des solutions de mCMC pures (**Figure IV-11**). Dans les deux cas, le comportement rhéofluidifiant est conservé en ajoutant les NCC et la viscosité des deux formulations augmente largement comme l'ont déjà observé Hassan *et al.* et da Fonsêca et d'Ávila avec l'incorporation de NCC dans une solution de CMC [31,32]. Cette augmentation est d'autant plus marquée lorsque le DM des mCMC est élevé. Par exemple, à un taux de cisaillement de 1 s^{-1} , la différence de viscosité d'une formulation de 2 %m mCMC (DM = 34 %) avec et sans NCC est de 229 alors qu'elle est de 335 pour un DM de la mCMC de 50 %. En moyenne, sur toute la gamme de taux de cisaillement, le rapport des viscosités pour les mélanges concentrés à 2 %m (DM = 50 %) avec et sans NCC est de 1,89 fois supérieur au rapport des viscosités des mélanges avec un DM de la mCMC de 34 % avec et sans NCC.

Dans une solution combinant de la CMC et des NCC, différents phénomènes physico-chimiques complexes se déploient en raison des interactions intimes entre ces deux matériaux et expliquant ces différences de viscosité. Tout d'abord, les nanocristaux de cellulose (coton)

utilisés ont une longueur moyenne de 150 nm. Les chaînes de mCMC solubilisées sont toutes dans leur forme ionique ($\text{pH} > \text{pK}_{\text{a}_{\text{carboxyle}}}$) et le rayon de giration (R_g) des pelotes statistiques des chaînes est inférieure à la longueur des NCC. En effet, pour une CMC ($M_w = 90 \text{ kg/mol}$), le rayon de giration est de 40 nm [33]. Par ailleurs, de par le caractère hydrophobe des méthacrylates, les chaînes de mCMC sont certainement plus recroquevillées lorsque le DM augmente pour une concentration égale, diminuant le rayon de giration. En présence de NCC, les chaînes de mCMC peuvent s'adsorber sur le long des nanobâtonnets via des interactions de Van der Waals et des liaisons hydrogènes. La forme hexagonale des nanocristaux de cellulose présente un caractère amphiphile [34,35]. Sur les zones en surface où les C-H sont majoritaires, les chaînes de mCMC peuvent s'y adsorber grâce à la présence des groupements méthacrylates. Par ailleurs, la présence des carboxylates sur les chaînes de mCMC et celle des sulfates sur les NCC a probablement tendance à faire se repousser les deux matériaux cellulosiques. Les nanocristaux de cellulose possèdent également une propension à agir comme des points de jonction intrinsèques. Dans une solution de mCMC, les NCC pourraient catalyser la formation de réseaux structurés par des ponts de chaînes de mCMC. Enfin, le phénomène d'intérêt majoritaire observé par Oguzlu *et al.* dans un mélange CMC/NCC est l'effet de déplétion rendu possible par le rayon de giration des mCMC inférieure à la longueur des NCC [33]. En raison de leur volume stérique excluant, les nanocristaux ont la capacité à provoquer une séparation entre les chaînes polymères de la carboxyméthylcellulose. Ces séparations peuvent conduire localement à des systèmes biphasiques où les NCC s'organisent en phase nématique [33].

Au vu de la viscosité des systèmes mCMC/NCC présentés, il semblerait que l'augmentation du DM indique une moins bonne affinité des NCC dans une solution de mCMC. En effet, le taux de méthacrylates (hydrophobes) étant plus important, les mCMC s'adsorbent plus difficilement à la surface des NCC qui sont donc regroupés et proches entre eux, pouvant former des agrégats ou des zones de concentrations élevées amenant des phases cristallines liquide par une organisation des nanocristaux [33]. Ces deux phénomènes, potentiellement plus présents avec un DM de 50 % que de 34 %, impliquent une augmentation de la viscosité [36,37]. Par ailleurs, pour le vérifier des mesures par diffusion des neutrons aux petits angles devraient être réalisées.

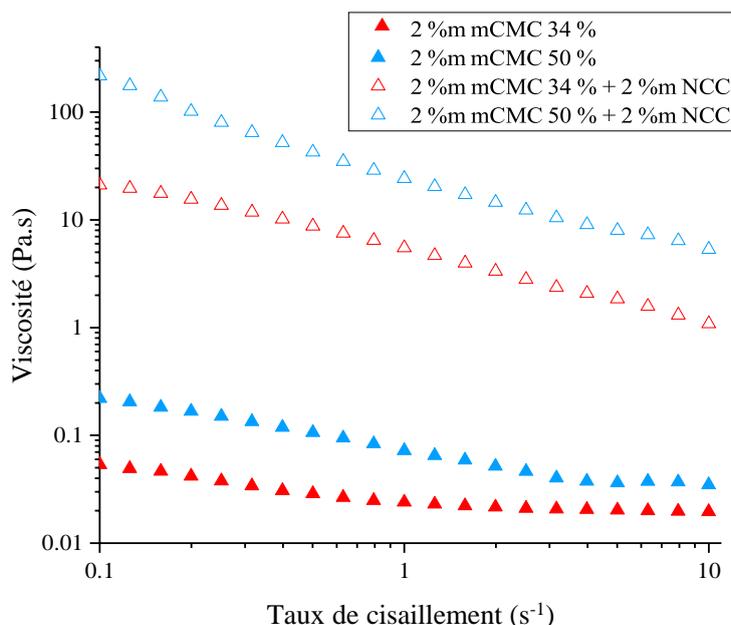


Figure IV-11 : Evolution de la viscosité en fonction du taux de cisaillement de 0,1 à 10 s^{-1} à 25 °C des solutions de mCMC (DM = 34 % et 50 %) à 2 %m dans l'eau et de ces mêmes solutions auxquelles ont été ajoutés 2 %m de NCC.

Afin d'obtenir une meilleure dispersion des NCC dans la solution de mCMC, le DM de 34 % et des concentrations plus faibles en NCC ont été privilégiées (0,2 %m, 0,5 %m et 1,0 %m) (**Figure IV-12**). Les courbes de viscosité conservent le comportement rhéofluidifiant. La viscosité augmente en fonction du taux de cisaillement lorsque la concentration en NCC augmente. Par ailleurs, de 0 %m à 0,5 %m en NCC, la viscosité des mélanges augmente de manière monotone puis augmente de manière importante à 1 %m. Par exemple, à 1 s^{-1} , les ratios entre la viscosité des formulations avec NCC par rapport à celle uniquement composée de mCMC sont de 5,5, 18,4 et 129 pour des concentrations en NCC de 0,2, 0,5 et 1 %m, respectivement. Cette différence d'évolution peut s'expliquer par un changement local de phase des NCC, plus concentrés au même endroit et qui s'alignent (phase nématique) au lieu d'être dans un ordre quelconque (phase isotrope) [33]. Dans ce contexte, les concentrations de 0,2 et 0,5 %m ont été choisies pour la suite de l'étude où les NCC sont potentiellement mieux dispersés dans la solution de mCMC [38].

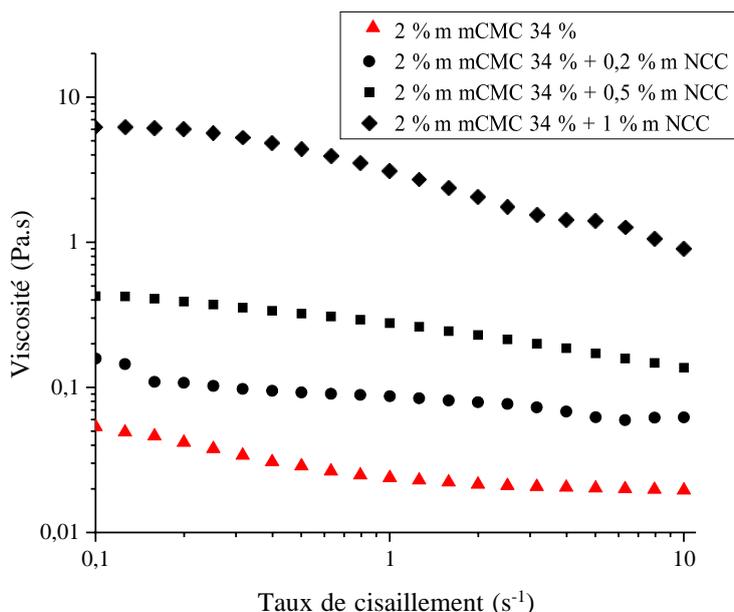


Figure IV-12 : Evolution de la viscosité en fonction du taux de cisaillement de 0,1 à 10 s^{-1} à 25 °C de différentes solutions de 2 %m mCMC (DM = 34 %) contenant des concentrations de 0,2, 0,5 ou 1 %m de NCC.

IV.3.3. FORMULATIONS DE MCMC AVEC NCC OU MNCC

Sur la base de la précédente étude, une formulation photo-réticulable composée de mCMC à 2 %m avec un DM de 34 % a été choisie comme référence pour sa faible viscosité et son faible DM permettant des interactions avec les nanocristaux hydrophiles (**Tableau IV-1**). Les NCC et mNCC ont ensuite été ajoutés à deux concentrations différentes (0,2 et 0,5 %m) dans la formulation de référence afin d'étudier l'influence de leur intégration sur les propriétés des hydrogels obtenus après réticulation aux UV (**Tableau IV-1**).

Tableau IV-1 : Caractéristiques des composants et composition des formulations mCMC / (m)NCC.

Caractéristiques des composants	mCMC	NCC	mNCC	Irgacure 2959 ^a
DS	0 %	3,4 %	2,9 %	
DM	34 %	0 %	0,83 %	
Formulation	Concentration (%m)			
A2	2	-	-	0,12
FNCC _{0,2}	2	0,2	-	0,12
FNCC _{0,5}	2	0,5	-	0,12
FmNCC _{0,2}	2	-	0,2	0,13
FmNCC _{0,5}	2	-	0,5	0,14

^a Le pourcentage de masse d'I2959 est déterminé par rapport à la concentration totale de méthacrylate dans chaque formulation.

Tout d'abord, la viscosité de chaque formulation a été mesurée de 0,1 à 100 s^{-1} et toutes les courbes obtenues présentent un comportement rhéofluidifiant (**Figure IV-13**). L'ajout de NCC ou de mNCC augmente la viscosité des formulations sur l'entièreté de la plage de taux de

cisaillement. A titre d'exemple, à 1 s^{-1} , la formulation de référence (A2) présente une viscosité de $20,0 \pm 7,0 \text{ mPa.s}$, tandis que les formulations FNCC_{0,5} et FmNCC_{0,5} affichent respectivement une viscosité de $280 \pm 66 \text{ mPa.s}$ et $1600 \pm 390 \text{ mPa.s}$. La viscosité de la formulation augmente également avec la concentration en NCC ou en mNCC. À 1 s^{-1} , la viscosité de la formulation est de $86,0 \pm 3,7 \text{ mPa.s}$ avec 0,2 %m de NCC, et de $280 \pm 66 \text{ mPa.s}$ avec 0,5 %m de NCC. De plus, les formulations contenant des mNCC présentent une viscosité plus élevée que celles contenant des NCC non modifiés, vraisemblablement en raison d'interactions plus complexes entre les mNCC et les mCMC. En effet, plusieurs interactions pourraient être impliquées dans ces formulations, expliquant ce phénomène. Tout d'abord, des interactions de van der Waals et des liaisons hydrogène entre la mCMC et les NCC ou les mNCC pourraient survenir, même en présence de charges négatives apportées par les groupes carboxylates sur le squelette de la mCMC [39-41]. La moindre teneur en sulfate de surface des mNCC pourrait probablement faciliter l'adsorption en surface de la mCMC, par rapport aux NCC. Les interactions hydrophobes sont envisageables en raison de la présence de groupes méthacrylates sur la mCMC et les mNCC, ce qui pourrait augmenter la possibilité d'adsorption de la mCMC sur les mNCC. L'adsorption de chaînes de CMC sur les mNCC peut induire une structure en réseau reliant les deux types d'objets, entraînant ainsi une augmentation de la viscosité de la suspension par rapport à celle contenant des NCC, où ce phénomène serait moins marqué (car défavorisé à la fois par les interactions électrostatiques et des interactions hydrophobes plus faibles). Enfin, les NCC ou les mNCC se repoussent mutuellement en raison de la répulsion électrostatique provoquée par la présence de groupes sulfate. La déstructuration des interactions sous l'effet du cisaillement, ainsi que l'orientation des nanocristaux, pourraient probablement expliquer les propriétés de fluidification sous cisaillement de toutes les formulations étudiées.

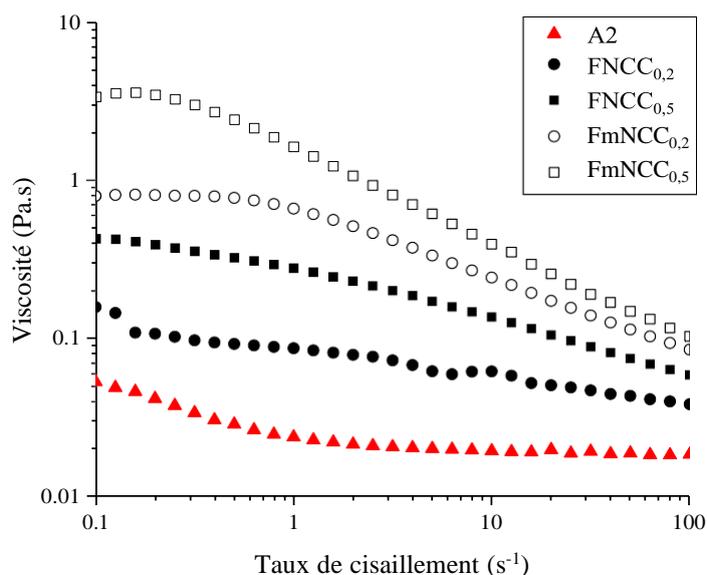


Figure IV-13 : Viscosité en fonction des taux de cisaillement de 0,1 à 100 s^{-1} mesurée à 25 °C pour la formulation de référence de mCMC ($DM = 34 \%$, A2) et pour les formulations de mCMC contenant des NCC et des mNCC à 0,2 et 0,5 %m (Tableau IV-1).

Il est difficile d'obtenir des informations sur la qualité de la dispersion des NCC et des mNCC dans la solution de mCMC. Des mesures par DLS ou par TEM nécessitent une dilution des formulations qui ne sont donc plus représentatives de la réalité. Par conséquent, les spectres d'absorbance des formulations ont été mesurés (**Figure IV-14**). L'incorporation de NCC et de mNCC dans des solutions de mCMC induit une augmentation significative de l'absorbance. De même, celle-ci augmente également avec la concentration en nanocristaux. Contrairement aux suspensions dans l'eau, l'absorbance des mNCC dans la formulation de mCMC est plus élevée que celle des NCC, ce qui pourrait indiquer une meilleure stabilité de la formulation contenant des NCC [42]. Cette augmentation de l'absorbance n'est pas apportée par l'ajout supplémentaire de méthacrylates provenant des mNCC puisque ces derniers absorbent en dessous de 250 nm et que la formulation A2 ne montre aucune absorbance significative dans la gamme de longueur d'onde étudiée [43].

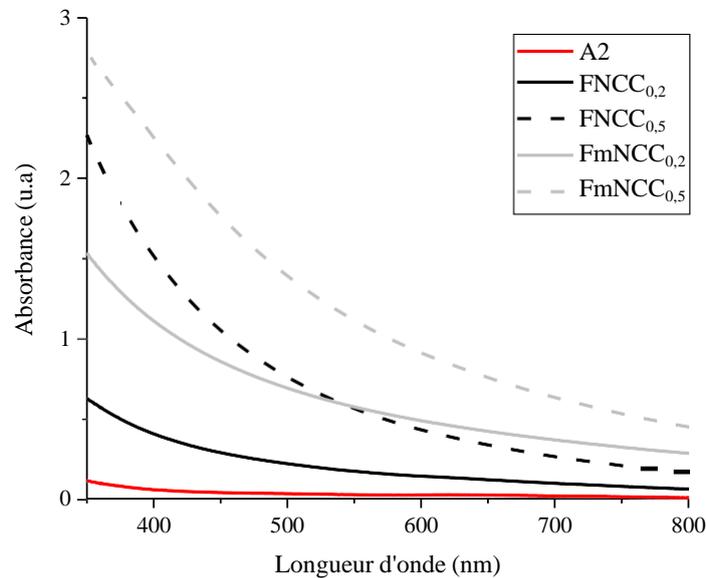


Figure IV-14 : Spectres UV-vis réalisés entre 350 et 800 nm pour les formulations sans photo-amorceur de A2, FNCC_{0,2}, FNCC_{0,5}, FmNCC_{0,2}, et FmNCC_{0,5} composées de mCMC (DM = 34 %) sans et avec 0,2 ou 0,5 %m de NCC ou de mNCC.

IV.4. PROPRIÉTÉS DES HYDROGELS ET CRYOGELS DE MCMC / (M)CNC

L'objectif de cette section consiste à examiner l'impact de la présence des NCC et des mNCC sur les caractéristiques structurales et physiques des hydrogels ainsi que des cryogels de mCMC. Pour ce faire, après l'exposition aux rayons UV des formulations A2, FNCC_{0,2}, FNCC_{0,5}, FmNCC_{0,2} et FmNCC_{0,5} pendant une durée de 5 minutes, des mesures de capacité de gonflement et de rhéologie sont entreprises. Ensuite, ces propriétés sont mises en corrélation avec la densité de méthacrylates réticulés et la porosité des matériaux.

IV.4.1. MICROSTRUCTURE

IV.4.1.1. Densité de méthacrylates réticulés et porosité

De manière similaire au chapitre précédent (section III.4.4), le taux de conversion des méthacrylates (TCM) a été étudié sur les cryogels après 5 minutes d'insolation sous rayonnement ultraviolet et déterminé par RMN ¹³C CP-MAS du solide. Tout d'abord, le réseau réticulé des cryogels pour les formulations avec mNCC est représenté schématiquement **Figure IV-15a**. Lors de la photo-réticulation, les groupements méthacrylates présents sur la mCMC et les mNCC réagissent entre eux pour former un réseau 3D. Cette réaction conduit à la réticulation des chaînes de mCMC entre elles, mais également à leur greffage de manière covalente à la surface des mNCC. Enfin, les nanocristaux de cellulose méthacrylate peuvent réticuler entre eux. En ce qui concerne la formulation A2 de référence contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) et celles des formulations contenant des NCC, le schéma correspond à celui présenté **Figure III-15** étant donné que les NCC ne participent pas de manière covalente au réseau. Dans le cas des formulations avec NCC, seuls quelques chaînes de mCMC sont éventuellement adsorbées à la surface des nanocristaux.

Quelques différences sont observées dans les spectres de RMN ¹³C CP-MAS du solide des cryogels après l'ajout de NCC et de mNCC par rapport à celui de A2 seulement composée de mCMC (**Figure III-15**). En effet, les carbones C4 (84 ppm) et C6 (65 ppm) des mNCC (ou NCC) sont observés, preuve de leur présence dans le réseau mCMC (**Figure IV-15 b et c**). L'attribution des carbones est réalisée à l'aide du spectre des cryogels de FmNCC_{0,5} contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) et 0,5 %m de mNCC (**Figure III-15, Figure IV-15b**).

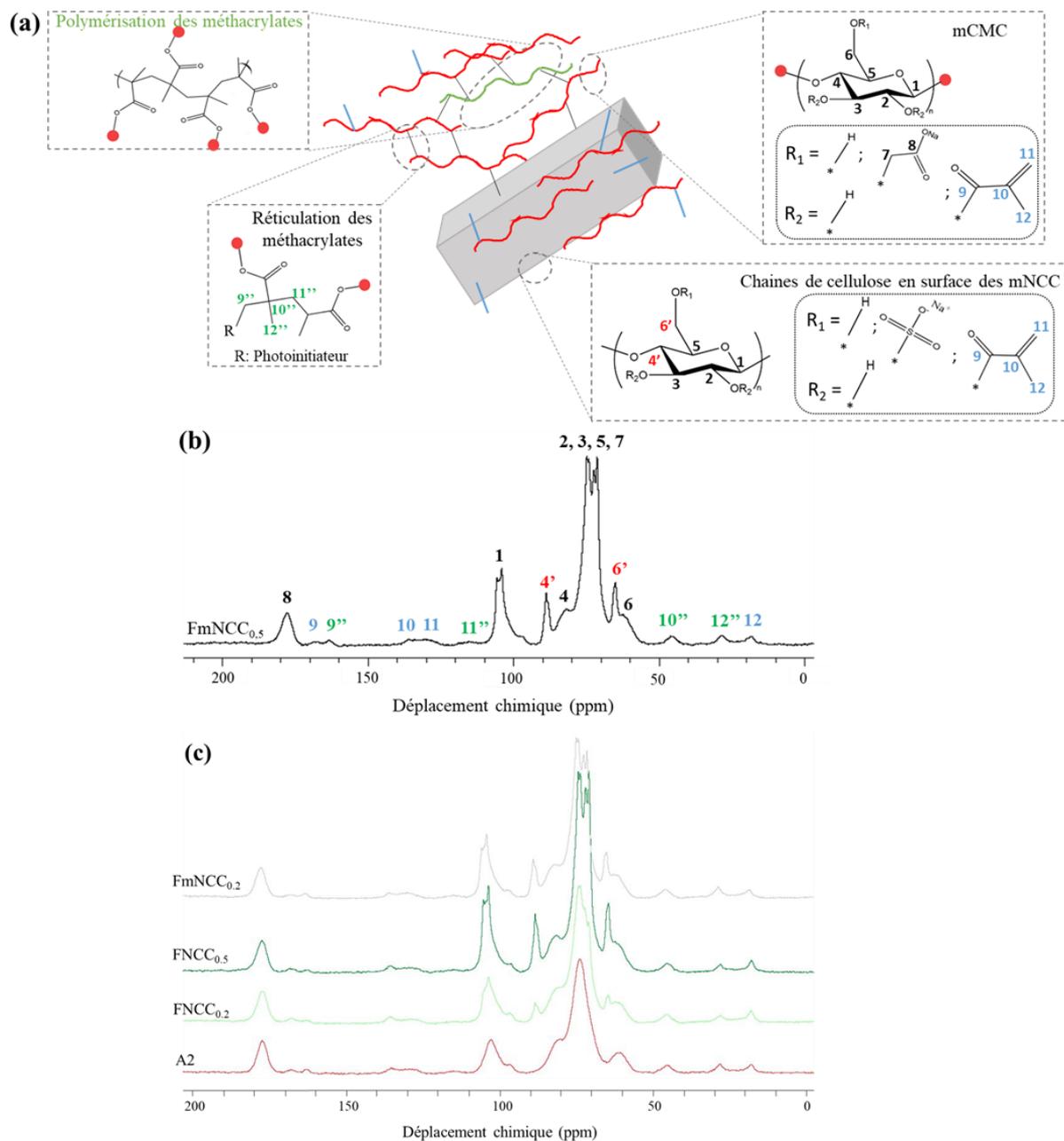


Figure IV-15 : (a) Schéma du réseau réticulé prenant en compte la participation de la mCMC et des mNCC, (b) spectre de RMN ¹³C CP-MAS du solide des cryogels de FmNCC_{0,5} contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) et 0,5 %m de mNCC et (c) Spectres de RMN ¹³C CP-MAS solides des cryogels de A2, FNCC_{0,2}, FNCC_{0,5} et FmNCC_{0,2} contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) sans et avec 0,2 ou 0,5 %m de NCC ou mNCC.

le taux de conversion des méthacrylates (TCM) peut être calculé à partir des aires des pics des carbones C12' et C12 de la mCMC réticulée, normalisées par l'aire du pic du carbone anomérique (C1), qui n'est pas impactée par la réticulation (**Equation III-2**). L'air des carbones C12 et C12' contiennent la participation des mNCC lorsqu'ils sont présents. Les propriétés chimiques des cryogels obtenus après 5 minutes d'exposition sont présentées dans le **Tableau IV-2** pour chaque formulation. L'intégration des NCC non-méthacrylés diminue le

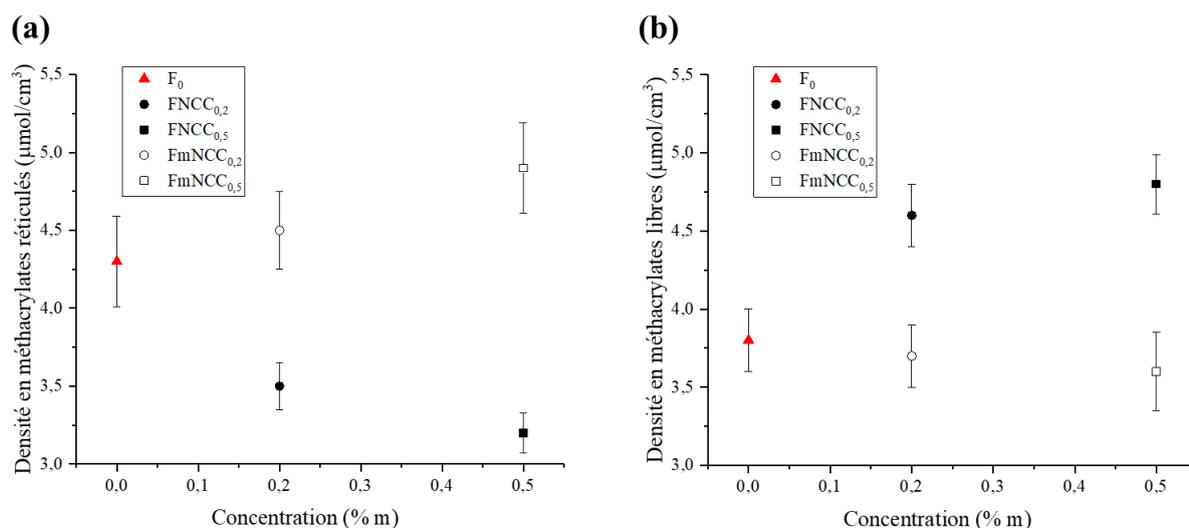
TCM, car ils ne participent pas à la réticulation et leur présence limite certainement la mobilité des chaînes de mCMC et la probabilité de rencontres. Cependant, le TCM augmente avec l'intégration des mNCC et avec l'augmentation de leur concentration, ce qui prouve leur participation au réseau. Le volume des cryogels étant constant ($0,64 \text{ cm}^3$), il est possible de calculer la densité de groupements méthacrylates réticulés ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) à partir des valeurs de TCM (**Tableau IV-2**). La même évolution que pour le taux de réticulation est observée avec l'intégration des NCC dans la formulation et avec leur concentration (**Figure IV-16a**). Dans leurs travaux, Cafiso *et al.* ont montré que la densité de méthacrylates réticulés augmente avec l'ajout de NCC et de mNCC, à partir d'un calcul prenant en compte la valeur du module G' obtenue au plateau des mesures de rhéologie en temps réel [3]. Or, il est difficile de prendre en compte la valeur de ce module qui ne dépend pas uniquement de la densité de noeuds de réticulation mais aussi de la présence des NCC, qui par essence, permettent de renforcer le réseau sans pour autant nécessairement participer à la réticulation. L'augmentation de la densité de méthacrylates réticulés avec les mNCC est expliquée dans leur article par leur participation covalente au réseau. Cependant, aucune explication n'est fournie pour l'augmentation de la densité de noeuds de réticulation avec l'ajout de NCC qui ne participe pas au réseau. L'analyse par RMN du solide réalisée dans ce travail est plus directe et donc plus fiable.

Les groupements méthacrylates non polymérisés génèrent des fonctions méthacrylates libres dans le matériau. La densité de groupements méthacrylates libres augmente avec l'ajout des NCC, ainsi qu'avec l'augmentation de leur concentration. Au contraire, elle diminue avec l'ajout des mNCC, puisque les méthacrylates sont davantage utilisés pour la réticulation (**Tableau IV-2, Figure IV-16b**).

La taille de la maille de la structure des hydrogels, représentant la distance entre deux noeuds de réticulation, n'a pas été calculée par la théorie de Flory-Rehner. En effet, la présence des nanocristaux implique des adaptations supplémentaires pour prendre en compte les interactions spécifiques entre les nanoparticules et le réseau polymère. Comme pour les cryogels constitués de mCMC présentés dans la partie III.5.1.1, la taille moyenne des pores n'a pas eu de variation significative avec l'ajout des NCC et mNCC (**Tableau IV-2, Tableau III-2**). Les mêmes conclusions et hypothèses peuvent être émises : la taille et l'orientation des pores dans les cryogels sont principalement contrôlées par le processus de lyophilisation et non directement par la densité de noeuds de réticulation du matériau. Les variations seraient plutôt reflétées dans l'épaisseur des parois constituant les pores qui pourraient augmenter avec l'agrégation des nanocristaux sur les parois (cf. section III.5.1.1).

Tableau IV-2 : Propriétés morphologiques des cryogels après 5 minutes d'insolation pour chaque formulation contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) sans et avec 0,2 ou 0,5 %m de NCC ou mNCC.

Formulation	Taux de conversion des méthacrylates (TCM, %)	Densité de méthacrylates réticulés ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$)	Densité de méthacrylates libres ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$)	Taille moyenne des pores (μm)
A2	53 ± 2	$4,3 \pm 0,29$	$3,8 \pm 0,20$	$18,9 \pm 6,55$
FNCC _{0,2}	43 ± 2	$3,5 \pm 0,15$	$4,6 \pm 0,24$	$14,1 \pm 4,24$
FNCC _{0,5}	40 ± 2	$3,2 \pm 0,13$	$4,8 \pm 0,19$	$14,6 \pm 2,94$
FmNCC _{0,2}	55 ± 2	$4,5 \pm 0,25$	$3,7 \pm 0,25$	$14,1 \pm 4,42$
FmNCC _{0,5}	58 ± 2	$4,9 \pm 0,29$	$3,6 \pm 0,26$	$15,4 \pm 4,61$

**Figure IV-16** : Influence de la concentration en NCC ou des mNCC dans les formulations photo-réticulables de mCMC (DM = 34 %) sur les densités de méthacrylates réticulés (a) et de méthacrylates libres (b) dans les matériaux photo-réticulés, estimées à partir du taux de conversion des méthacrylates (TCM) mesurés par spectroscopie RMN du solide ^{13}C CP-MAS (Figure IV-15).

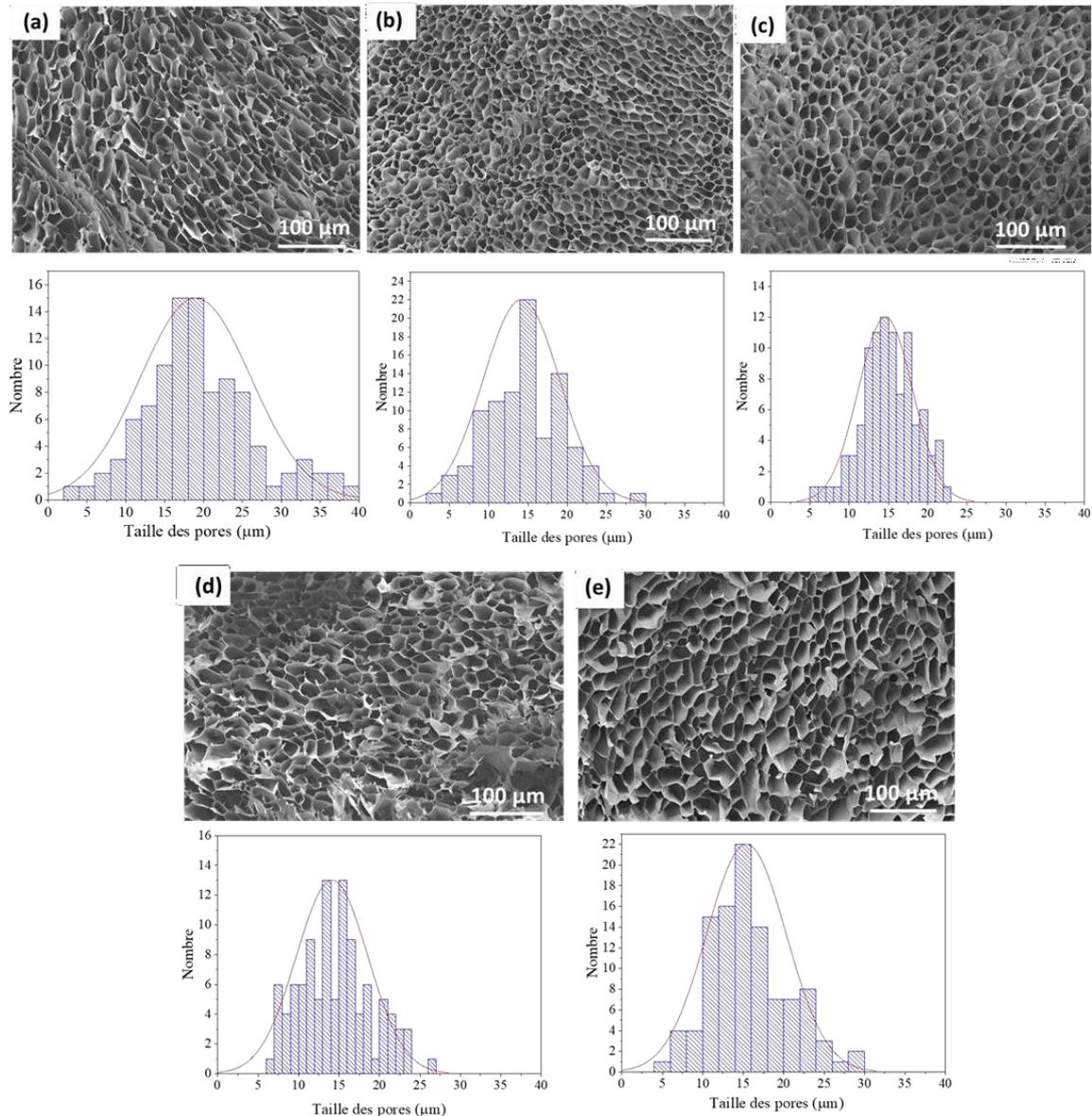


Figure IV-17 : Images MEB montrant les morphologies des cryogels et les distributions de taille de pores correspondantes pour (a) A2, (b) FNCC_{0,2}, (c) FNCC_{0,5}, (d) FmNCC_{0,2} et FmNCC_{0,5}. La taille moyenne des pores a été déterminée après environ 25 mesures sur 4 images par échantillon (100 mesures). Les pores dont les parois ont été brisées par la méthode de section de coupe n'ont pas été pris en compte.

IV.4.1.2. Taux de gonflement

Tout d'abord, les taux de gonflement (Q_m) des hydrogels sont étudiés. La mesure du gonflement immédiatement après la formation de l'hydrogel permet d'évaluer sa performance initiale en termes de capacité de gonflement et de propriétés de rétention d'eau. Cela peut être important pour des applications telles que les pansements médicaux ou les dispositifs de libération de médicaments.

L'équilibre de gonflement est atteint en moins de 10 heures pour tous les hydrogels (**Figure IV-18**). Le taux de gonflement à l'équilibre après 24 h de l'hydrogel diminue avec l'ajout des NCC et des mNCC (**Figure IV-18, Tableau IV-3**). De plus, le Q_m diminue avec l'augmentation de la concentration en mNCC, ainsi qu'avec une concentration de NCC de 0,5 %m. Le Q_m est plus faible avec les mNCC qu'avec la référence sans nanocristaux (A2) car la densité de méthacrylates réticulés est plus élevée et le réseau plus difficile à étirer. Pour les NCC, la densité de méthacrylates réticulés est inférieure à celle de la formulation A2 contenant uniquement de la mCMC, entraînant une plus grande quantité de méthacrylates libres qui, du fait de leur caractère hydrophobe, limitent l'absorption d'eau (**Tableau IV-2**). Enfin, la légère disparité dans le gonflement entre les hydrogels renfermant des NCC et des mNCC à des concentrations identiques pourrait résulter d'un effet conjoint entre la réduction du gonflement due à une densité de noeuds de réticulation accrue et la diminution du gonflement due à l'augmentation des méthacrylates libres (**Tableau IV-2, Figure IV-16**). Des résultats similaires ont été observés par Cafiso *et al.* qui ont étudiés le gonflement d'hydrogels issus de formulations contenant des concentrations de 2 %m mCMC (DM = 60 %) et de 1 %m de NCC ou de mNCC [3].

La comparaison de la masse sèche des cryogels dérivés des hydrogels et des hydrogels gonflés à l'équilibre permet d'évaluer l'effet du gonflement sur la densité de matière (concentration) lorsque des NCC ou mNCC sont présents (**Tableau IV-3**). Les cryogels issus des hydrogels initiaux de la formulation A2 contenant 2 %m de mCMC (DM = 34%) affichent une masse de $13,6 \pm 0,36$ mg, tandis que celle des cryogels dérivés des hydrogels gonflés présentent une masse de 13,0 mg. Cette variation peut être attribuée à la manipulation des hydrogels gonflés et à une possible libération de chaînes de mCMC non réticulées lors du gonflement. Par ailleurs, pour les formulations contenant des NCC, la perte de masse entre les deux types de cryogels est plus marquée. Par exemple, dans le cas de la formulation FmNCC_{0,2} contenant 0,2 %m de NCC, la masse initiale des cryogels issus des hydrogels est de $15,9 \pm 0,21$ mg, tandis qu'elle diminue à 12,9 mg pour les cryogels issus des hydrogels gonflés, représentant une perte de masse de 20 %. Au cours du processus de gonflement, une fraction des NCC se libère et se diffuse dans le milieu aqueux environnant, ce qui entraîne une réduction de la masse sèche des hydrogels. En revanche, la différence de masse entre les cryogels provenant des hydrogels initiaux de la formulation FmNCC_{0,5} contenant 0,5 %m de mNCC et ceux dérivés des hydrogels indique une diminution de seulement 6 %, similaire à celle observée pour la formulation A2. Cette observation suggère que les mNCC sont maintenus pendant le gonflement grâce à leur co-réticulation avec les chaînes de mCMC. Enfin, la différence de gonflement des hydrogels avec NCC et avec mNCC peut être expliquée par la densité de méthacrylates réticulés des hydrogels qui est plus élevée avec la présence des mNCC, ce qui rend le réseau plus difficile à étirer. De plus, les groupements méthacrylates étant hydrophobes, limitent la pénétration de l'eau dans le réseau des hydrogels contenant NCC (**Tableau IV-2**).

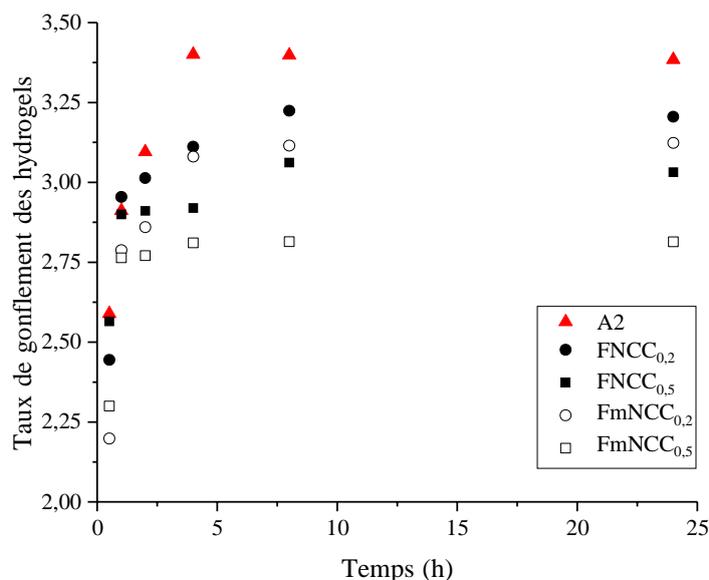


Figure IV-18 : Evolution du taux de gonflement (Q_m) en fonction du temps d'immersion dans l'eau à 25 °C pour les différents hydrogels issus des formulations A2, FNCC_{0,2}, FNCC_{0,5}, FmNCC_{0,2}, FmNCC_{0,5} contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) sans et avec 0,2 ou 0,5 %m de NCC ou mNCC.

Tableau IV-3 : Taux de gonflement pour chaque formulation des hydrogels à l'équilibre après 24 h à 25 °C et masses des cryogels obtenus à partir des hydrogels initiaux après photo-réticulation et celles des hydrogels gonflés. Trois cryogels de chaque condition ont été pesés. La masse des cryogels issus des hydrogels gonflés correspond à la masse totale de trois cryogels divisée par 3.

Formulation	Q_m	Cryogels des hydrogels après photo-réticulation (mg)	Cryogels des hydrogels gonflés (mg)
A2	$3,4 \pm 0,14$	$13,6 \pm 0,36$	13,0
FNCC _{0,2}	$3,2 \pm 0,070$	$15,9 \pm 0,21$	12,9
FNCC _{0,5}	$3,0 \pm 0,19$	$17,3 \pm 0,16$	14,3
FmNCC _{0,2}	$3,1 \pm 0,12$	$15,7 \pm 0,14$	n.d.
FmNCC _{0,5}	$2,8 \pm 0,12$	$17,7 \pm 0,32$	16,7

Ensuite, les taux de gonflement des cryogels issus des différentes formulations ont été mesurés. Ces expériences ont été réalisées par Flavie Pradalié au cour de son stage de M1. Comme dans le cas des hydrogels, le Q_m maximal est atteint avant 10 heures (**Figure IV-19**). De manière similaire, le taux de gonflement diminue avec l'intégration des NCC et des mNCC dans la formulation de mCMC (**Figure IV-19, Tableau IV-4**). Le taux de gonflement est moindre avec les mNCC qu'avec les NCC car la densité en méthacrylates réticulés est plus élevée et le réseau plus difficile à étirer. Pour les formulations contenant des NCC, la densité de méthacrylates réticulés est inférieure à A2 contenant seulement la mCMC. Cette particularité a pour effet de favoriser un gonflement plus prononcé. Toutefois, la teneur en méthacrylates libres s'avère plus élevée, ce qui contribue à exclure l'eau du système (**Tableau IV-2**). Enfin, la congélation suivie de la lyophilisation entraîne l'agrégation des chaînes entre elles (cf. section III.5.1.1). Les NCC et mNCC présents dans le réseau peuvent également s'agréger, formant des liaisons de type van der Waals et probablement des liaisons hydrogène avec les parois

constituées par les chaînes de mCMC. En effet, en comparant les masses des cryogels issus des hydrogels après photo-réticulation et celles des cryogels issus des cryogels hydratés après 48 h de gonflement, seule une faible perte de masse est observée pour A2, FNCC_{0,5} et FmNCC_{0,5} contenant respectivement la mCMC seule et avec 0,5 %m de NCC et mNCC (**Tableau IV-4**). Cette différence peut être expliquée par des effets liés à la manipulation des matériaux. De plus, la perte de masse des cryogels provenant des cryogels hydratés contenant 0,5 %m de NCC est plus faible qu'après gonflement des hydrogels, ce qui prouve que les NCC sont restés dans le réseau, probablement au niveau des parois des pores. Dans le cas du gonflement des cryogels, l'hydratation des chaînes est plus difficile car les interactions entre objets/macromolécules ne sont pas remplacées par des interactions avec l'eau. De même l'hydratation est d'autant plus difficile que la quantité des matériaux agrégés (concentration) est importante, expliquant alors que le gonflement est équivalent pour les cryogels contenant des NCC et ceux contenant des mNCC à concentration égale. Cette hypothèse peut aussi expliquer la différence de gonflement entre les hydrogels et les cryogels. En effet, les cryogels hydratés ont un taux de gonflement à l'équilibre inférieur à celui des hydrogels gonflés pour une même formulation. Par exemple, les rapports des masses de l'hydrogel gonflé sur celui du cryogel hydraté à l'équilibre sont de $2,7 \pm 0,31$, $2,9 \pm 0,63$, $3,1 \pm 0,10$, $3,0 \pm 0,11$ et $2,6 \pm 0,46$ pour les formulations A2, FNCC_{0,2}, FNCC_{0,5}, FmNCC_{0,2} et FmNCC_{0,5}, respectivement. Ces résultats prouvent que le gonflement et donc que l'hydratation des chaînes est moins important dans le cas des cryogels.

A titre de comparaison, les taux de gonflement obtenus pour une concentration de 0,2 %m de NCC et mNCC sont similaires à celui de la formulation C2 (2 %m mCMC 76 %) discutée dans la section III.5.2.2. De même, les taux de gonflement des cryogels contenant des concentrations de 0,2 et 0,5 %m de NCC et mNCC sont similaires à ceux des formulations A4 et B3 (4 %m mCMC DM = 34 % et 3 %m mCMC DM = 50 %). Enfin, le gonflement des cryogels contenant les NCC et mNCC correspond à une masse de 16 % supérieure à celles des hydrogels initiaux, ce qui en font des bons candidats pour des applications comme l'ingénierie des tissus mous [44].

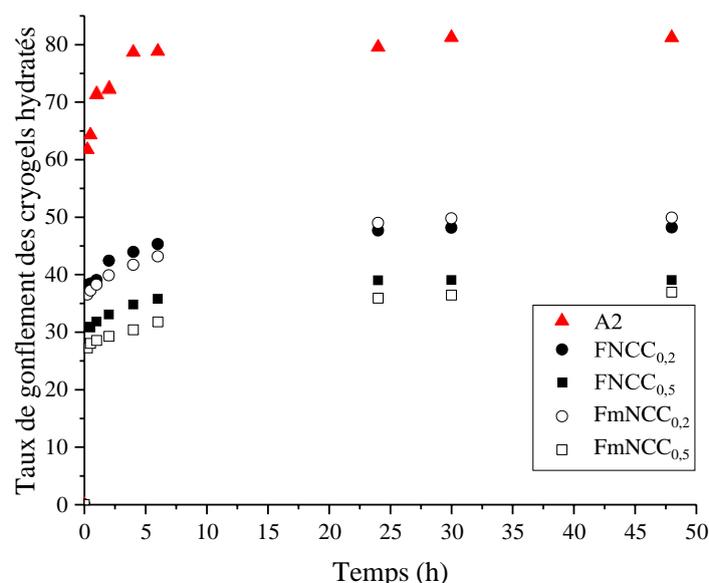


Figure IV-19 : Evolution du taux de gonflement (Q_m) en fonction du temps d'immersion dans l'eau à 25 °C pour les différents cryogels issus des formulations A2, FNCC_{0,2}, FNCC_{0,5}, FmNCC_{0,2}, FmNCC_{0,5} contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) sans et avec 0,2 ou 0,5 %m de NCC ou mNCC.

Tableau IV-4 : Taux de gonflement pour chaque formulation des cryogels à l'équilibre après 48 h à 25 °C et masses des cryogels obtenus à partir des hydrogels initiaux après photo-réticulation et celles des cryogels hydratés. Trois cryogels de chaque condition ont été pesés. La masse des cryogels issus des hydrogels gonflés correspond à la masse totale de trois cryogels divisée par 3.

Formulation	Q_m	Cryogels des hydrogels après photo-réticulation (mg)	Cryogels des cryogels hydratés (mg)
A2	81 ± 6	13,6 ± 0,36	13,3
FNCC _{0,2}	50 ± 4	15,9 ± 0,21	n.d.
FNCC _{0,5}	37 ± 1	17,3 ± 0,16	16,6
FmNCC _{0,2}	48 ± 2	15,7 ± 0,14	n.d.
FmNCC _{0,5}	38 ± 2	17,6 ± 0,32	17,5

IV.4.2. PROPRIÉTÉS VISCOÉLASTIQUES

L'impact de la présence des NCC et des mNCC dans les hydrogels de mCMC sur les propriétés rhéologiques des différents matériaux (hydrogels, hydrogels gonflés et cryogels hydratés) a été étudié. Les mesures d'oscillation en fréquence permettent de déterminer le module élastique (G'), le module visqueux (G'') et l'amortissement $\tan(\delta)$ où δ est le déphasage et est caractéristique des propriétés viscoélastiques du matériau. Des valeurs de $\tan(\delta)$ supérieures à 1 signifient que le matériau est visqueux et dissipe facilement de l'énergie. Inversement, une valeur proche de 0 indique que le matériau possède des caractéristiques élastiques solides et conserve l'énergie. Etant donné que l'évolution des modules G' et G'' n'est pas similaires selon la formulation pour chaque matériau (**Annexe IV-1, Tableau IV-5**), le comportement viscoélastique de ces derniers est évalué avec $\tan(\delta)$. Cette valeur est tracée sur toute la gamme de fréquences (0,1 à 10 Hz) à 1 % de déformation et à 25 °C (**Figure IV-20**).

Les valeurs de $\tan(\delta)$ des hydrogels sur la gamme de fréquence de 0,1 à 10 Hz diminuent avec l'ajout des NCC et des mNCC, ce qui est la signature d'une augmentation de l'élasticité de la structure (**Figure IV-20a**). En effet, à 1 Hz, la moyenne des $\tan(\delta)$ est de $0,054 \pm 0,0033$ pour A2 contenant seulement de la mCMC, $0,016 \pm 0,0088$ pour FNCC_{0,5} et de $0,025 \pm 0,0051$ pour FmNCC_{0,5} contenant respectivement 0,5 %m de NCC et de mNCC. Cependant, aucune variation significative de $\tan(\delta)$ n'est observée en fonction de la concentration ou du type (fonctionnalisé ou non) des NCC ajoutés (**Tableau IV-5**). Toutes ces valeurs sont très proches de 0, ce qui indique que les hydrogels possèdent un comportement solide élastique. Les NCC et mNCC agissent bien comme des renforts structurels. En effet, l'ajout des nanocristaux augmente la densité en matériau ce qui entraîne des interactions entre eux plus importantes, se traduisant ainsi par une augmentation de l'élasticité de l'hydrogel. L'étude sur les hydrogels de mCMC purs ont montré que la concentration est le paramètre le plus essentiel pour expliquer les variations des propriétés viscoélastiques (**Figure III-22**, cf. section III.4.2). Cependant, cela pourrait ne pas être le seul paramètre influent, car aucune différence significative sur les valeurs de $\tan(\delta)$ n'a été mesurée entre les hydrogels contenant différentes concentrations de NCC et de mNCC. Cette observation pourrait être attribuée à une éventuelle hétérogénéité lors de la dispersion des nanocristaux de cellulose au sein de l'hydrogel à mesure que la concentration augmente. Cette situation entraînerait une modification de l'agencement du réseau réticulé. En conséquence, les propriétés mécaniques de l'hydrogel sont impactées, limitant l'amélioration continue de l'élasticité de l'hydrogel, comme observé par Yang *et al.* sur des hydrogels à base de poly(éthylène glycol) renforcés avec des NCC [45].

L'étude rhéologique est également menée sur les hydrogels gonflés à l'équilibre (après 24 h) par comparaison des valeurs de $\tan(\delta)$ (**Figure IV-20b**). Comme attendu, les hydrogels gonflés affichent des valeurs de $\tan(\delta)$ plus élevées sur toute la gamme de fréquences que les hydrogels originaux puisqu'ils contiennent plus d'eau. Cependant, l'évolution des $\tan(\delta)$ des hydrogels avec et sans NCC diffère de celle des hydrogels initiaux (**Tableau IV-5**). En effet, à 1 Hz, une moyenne de $\tan(\delta)$ de $0,61 \pm 0,055$, $0,64 \pm 0,10$ et $0,56 \pm 0,094$ est mesurée pour A2, FNCC_{0,2} et FNCC_{0,5} respectivement. Ces valeurs moyennes de $\tan(\delta)$ pour les hydrogels gonflés avec et sans NCC suggèrent ainsi une quasi-égalité du comportement visqueux et élastique des hydrogels. D'autre part, les hydrogels contenant des mNCC montrent un $\tan(\delta)$ deux fois plus faible et qui diminue avec la concentration, ce qui indique une meilleure préservation des propriétés de conservation de l'énergie des hydrogels initiaux que les autres. A 1 Hz, les formulations contenant respectivement 0,2 et 0,5 %m de mNCC $\tan(\delta)$ possèdent des valeurs moyenne de $\tan(\delta)$ de $0,25 \pm 0,097$ et $0,19 \pm 0,083$. Cette différence s'explique par la libération des NCC dans le bain d'eau pendant le gonflement des hydrogels FNCC_{0,2} et FNCC_{0,5}, mise en évidence par la mesure de la variation de masse des hydrogels gonflés après séchage par rapport à la masse des cryogels provenant des hydrogels après réticulation (**Tableau IV-3**). D'autre part, les méthacrylates des mNCC sont réticulés de manière covalente au réseau de mCMC et ne

peuvent pas être libérés. Ils contribuent donc à la rigidité de l'hydrogel gonflé. Cette propriété a été observée par Cafiso *et al.* sur les modules de compression des hydrogels de mCMC contenant des NCC et des mNCC [3].

Enfin, l'étude rhéologique a également été menée sur les cryogels hydratés à l'équilibre (après 48 h) par comparaison des valeurs de $\tan(\delta)$ (**Figure IV-1c**). Le rapport des modules visqueux et élastique n'a pas de variation significative en fonction de la composition des formulations (**Tableau IV-5**). Cela peut s'expliquer par le processus de lyophilisation qui entraîne une réorganisation du réseau poreux et une agrégation des chaînes. De même, l'augmentation de la concentration en matériaux induit par l'ajout de NCC et de mNCC et conservée après gonflement, indique que les nanocristaux s'agrègent le long des parois du réseau (**Tableau IV-4**). Cette observation seule impliquerait une plus grande élasticité des cryogels gonflés à mesure que la concentration de nanocristaux augmente, ce qui n'est cependant pas le cas. Il semble donc qu'un équilibre délicat existe entre la densité de matériau et la structure du réseau après la lyophilisation. En effet, l'hétérogénéité de la dispersion des nanocristaux de cellulose au sein de l'hydrogel initial a entraîné une altération dans la configuration du réseau réticulé. Lors de la phase de congélation, la croissance inégale des cristaux aurait pu perturber la structure des hydrogels congelés en présence de nanocristaux, ce qui aurait ensuite réduit les propriétés élastiques des cryogels obtenus. Enfin, dans tous les cas, les valeurs de $\tan(\delta)$ sont supérieures à celles des hydrogels initiaux et inférieures à celles des hydrogels gonflés. Cela peut s'expliquer par le fait que les cryogels hydratés contiennent plus d'eau que les hydrogels initiaux et moins que les hydrogels gonflés (cf. partie IV.4.1.2).

Enfin, comme mentionné dans la section III.4.2, il est difficile de comparer ces résultats à ceux de la littérature étant donné les différents protocoles utilisés. Cependant l'ajout des mNCC dans la formulation de mCMC permet d'augmenter les propriétés viscoélastiques et de les conserver avec le gonflement. Par exemple, l'ajout de 0,5 %m de mNCC dans la formulation a permis à l'hydrogel de gonfler légèrement tout en gardant la même viscoélasticité, ce qui est souhaitable pour la réparation de tissus biologiques [46,47].

Tableau IV-5 : Propriétés viscoélastiques des hydrogels, hydrogels gonflés et cryogels hydratés mesurés à 1 Hz, 1 % de déformation et à 25 °C pour les formulations A2, FNCC_{0,2}, FNCC_{0,5}, FmNCC_{0,2}, FmNCC_{0,5} contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) sans et avec 0,2 ou 0,5 %m de NCC ou mNCC.

Formulation	Hydrogel			Hydrogel gonflé			Cryogel hydraté		
	G' (kPa)	G'' (kPa)	Tan (δ)	G' (kPa)	G'' (kPa)	Tan (δ)	G' (kPa)	G'' (kPa)	Tan (δ)
A2	1,4 ± 0,055	0,064 ± 0,048	0,054 ± 0,0033	0,83 ± 0,062	0,51 ± 0,13	0,61 ± 0,17	9,6 ± 1,7	1,2 ± 0,2	0,13 ± 0,031
FNCC _{0,2}	1,6 ± 0,062	0,026 ± 0,0020	0,016 ± 0,0013	0,71 ± 0,053	0,46 ± 0,11	0,64 ± 0,10	7,3 ± 0,74	1,0 ± 0,067	0,14 ± 0,016
FNCC _{0,5}	1,9 ± 0,33	0,031 ± 0,0040	0,016 ± 0,0088	0,88 ± 0,15	0,49 ± 0,034	0,56 ± 0,094	7,2 ± 0,65	1,2 ± 0,19	0,17 ± 0,016
FmNCC _{0,2}	1,5 ± 0,30	0,027 ± 0,0020	0,018 ± 0,00076	1,3 ± 0,39	0,34 ± 0,11	0,25 ± 0,097	7,5 ± 1,6	1,2 ± 0,27	0,15 ± 0,030
FmNCC _{0,5}	1,9 ± 0,27	0,048 ± 0,0086	0,025 ± 0,0054	2,0 ± 0,19	0,38 ± 0,12	0,19 ± 0,083	6,9 ± 0,46	1,0 ± 0,15	0,14 ± 0,021

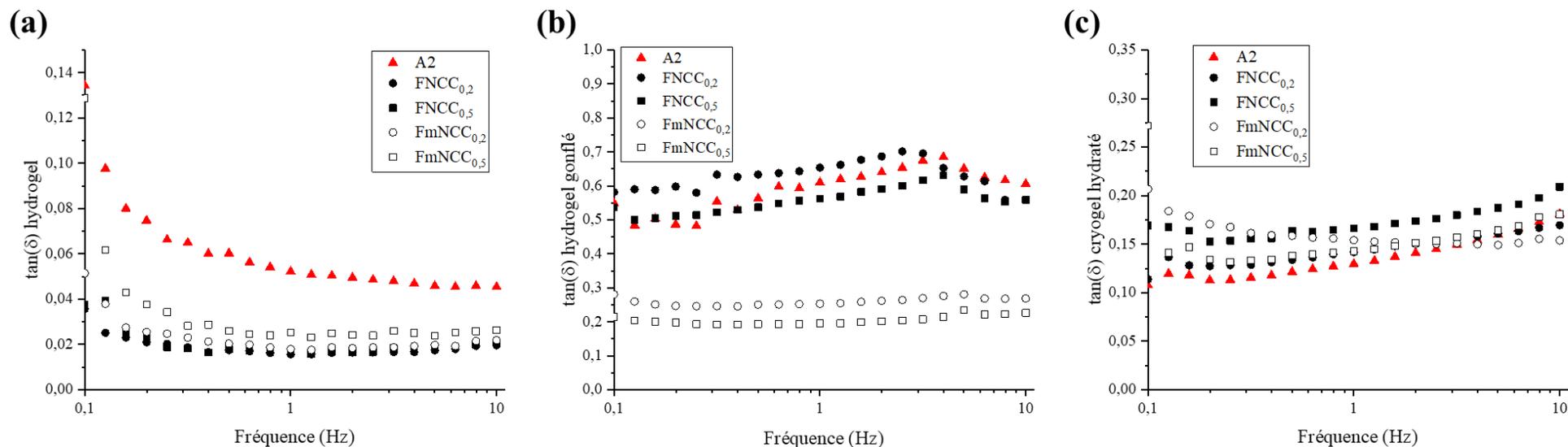


Figure IV-20 : Evolution des $\tan(\delta)$ des (a) hydrogels, (b) hydrogels gonflés et (c) cryogels hydratés entre 0,1 et 10 Hz, à 1 % de déformation et à 25 °C pour les formulations A2, FNCC_{0,2}, FNCC_{0,5}, FmNCC_{0,2}, FmNCC_{0,5} contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) sans et avec 0,2 ou 0,5 %m de NCC ou mNCC.

IV.4.3. CYTOCOMPATIBILITÉ

La biocompatibilité d'un matériau est évaluée par différentes propriétés : l'immunocompatibilité, l'interaction avec les protéines, la perméabilité, l'adhésion et la viabilité cellulaire. Ces deux dernières peuvent être obtenues par des tests de cytotoxicité. Les groupements méthacrylates non polymérisés génèrent des fonctions méthacrylates libres dans le matériau. Cela n'est pas souhaitable pour les applications biologiques, car la présence des méthacrylates pourrait être une cause indésirable de cytotoxicité [48]. La densité de méthacrylates libres augmente avec l'ajout de NCC, ainsi qu'avec l'augmentation de leur concentration. Au contraire, elle diminue avec l'ajout de mNCC, puisque qu'ils sont davantage utilisés pour la réticulation. L'évaluation de la cytotoxicité a été réalisée sur les cryogels des cinq formulations par Béatrice Labat (Université Rouen Normandie) avec des fibroblastes de souris L929 (**Annexe IV-4**). Les fibroblastes L929 sont souvent choisis comme modèle cellulaire en raison de leur sensibilité à divers stimuli et de leur similitude avec les fibroblastes humains. Ces cellules sont en mesure de proliférer et de former des réseaux de communication cellulaire, imitant ainsi les processus biologiques naturels. La cytotoxicité des différentes formulations a été évaluée conformément à la norme ISO 10993-5 2009 avec quelques adaptations [49]. En bref, deux tests ont été réalisés : l'éluion *in situ* et le contact direct. Les tests d'adhérence cellulaire et de migration ont aussi été utilisés pour évaluer l'impact des cryogels hydratés sur les comportements cellulaires clés.

Les cinq cryogels hydratés provenant des formulations A2, FNCC_{0,2}, FNCC_{0,5}, FmNCC_{0,2}, FmNCC_{0,5} contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) sans et avec 0,2 ou 0,5 %m de NCC ou mNCC ne présentent pas de cytotoxicité. Les cellules en contact avec le matériau et celles relarguées restent vivantes dans le temps. En revanche, les cellules ont des difficultés à adhérer correctement au réseau de mCMC. En effet, la forme étroite et allongée des pores des cryogels hydratés, dont la taille moyenne est d'environ 25 µm, et la faible épaisseur de leurs parois présentent des dimensions qui ne sont pas compatibles avec l'étalement ou l'invasion des cellules (**Annexe IV-4**). Les cellules L929 ont un diamètre d'environ 20 µm lorsqu'elles sont arrondies et d'environ 80 - 100 µm lorsqu'elles sont étalées, ce qui démontre la difficulté de pénétrer le réseau dans ce dernier état. Pour atteindre des applications telles que les hydrogels dédiés à la matrice extracellulaire (ECM) ou les *scaffolds* pour l'ingénierie des tissus mous pour lesquels la croissance des cellules est nécessaire, la taille des pores devra être augmentée [50,51]. Dans cette perspective, les formulations sont destinées à être imprimées par fabrication additive de type « *vat photopolymerization* ». Néanmoins, en l'état, ces cryogels pourraient trouver des applications dans les systèmes d'administration de médicaments [52,53]. Enfin, la non-cytotoxicité établie est cohérente avec celle déterminée sur les hydrogels de mCMC [54,55].

IV.5. IMPRIMABILITÉ DES FORMULATIONS

Cette partie est consacrée à l'étude de l'imprimabilité des cinq formulations présentées dans le **Tableau IV-1**. Les techniques d'impression 3D de type « *vat photopolymerization* » ont été proposées pour améliorer la complexité de la forme des hydrogels de mCMC [54]. Cependant, les hydrogels obtenus ont une faible résolution pour l'impression DLP (environ 0,5 mm). Pour améliorer cette propriété, ces technologies impliquent souvent l'ajout d'un photo-absorbeur pour limiter la transmission de la lumière UV à travers toute la formulation pendant l'impression [56–58]. Dans le cas des formulations aqueuses de mCMC pour la biomédecine, le photo-absorbeur idéal doit être biocompatible, soluble ou dispersible dans l'eau et absorber à une longueur d'onde spécifique (généralement 365, 385 ou 405 nm). Or, les photo-absorbeurs connus répondant à ces deux derniers critères ne sont pas biocompatibles [56]. Certains d'entre eux sont même suspectés d'être toxiques, notamment les colorants alimentaires comme la tartrazine utilisée pour la coloration jaune des aliments [59,60].

Sans ajouter de photo-absorbeurs UV, il est intéressant de connaître le comportement des formulations contenant des NCC et mNCC sur la diffusion de la lumière à travers la formulation. Pour cela, le temps de gélification et l'épaisseur de couche réticulée en fonction de la durée d'insolation sont des caractéristiques importantes à déterminer. Ces deux propriétés dépendent de la viscosité et de l'absorbance déjà présentées dans la partie IV.3. Elles sont nécessaires pour déterminer les paramètres d'impression des différentes couches.

IV.5.1. ETUDE DU TEMPS DE GÉLIFICATION

Le temps de gélification (t_{gel}) des différentes formulations a été caractérisé par rhéologie en temps réel. Il est bien établi que pour les résines réticulables aux UV utilisées dans les techniques de polymérisation en cuve, la durée d'insolation pour chaque couche doit être au moins égal à t_{gel} pour que la couche soit suffisamment rigide pour tenir [61]. De plus, la détermination du temps de gélification est nécessaire afin d'adopter la durée d'insolation par couche optimal pour obtenir la résolution souhaitée avec une vitesse d'impression maximale. Dans cette partie, seuls les résultats obtenus avec les formulations à 0,5 %m en NCC et mNCC ainsi qu'avec référence seront présentés.

Contrairement aux résultats obtenus par Cafiso *et al.*, l'intégration des NCC n'a pas réduit le temps de réticulation de la mCMC [3] (**Figure IV-21**). En effet, des temps de gélification de $22 \pm 1,0$ s, $20 \pm 0,90$ s et $19 \pm 1,1$ s sont respectivement mesurés pour les formulations A2, FNCC_{0,2} et FNCC_{0,5} contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) sans et avec 0,5 %m de NCC et mNCC. De manière intéressante, l'intégration de mNCC accélère significativement la cinétique de photo-réticulation des formulations de mCMC. Des temps de gélification de $16 \pm 1,2$ s et même $9,6 \pm 1,5$ s sont mesurés pour les formulations contenant

0,2 %m de mNCC (FmNCC_{0,2}) et 0,5 %m de mNCC (FmNCC_{0,5}), respectivement. On peut expliquer ce phénomène par la présence de groupes méthacrylates à la surface des mNCC qui permettent une co-réticulation et au final une densité de noeuds de réticulation supérieure. Ces résultats démontrent clairement le potentiel de l'ajout de mNCC dans des formulations photo-réticulables et imprimables en 3D pour réduire le temps d'impression.

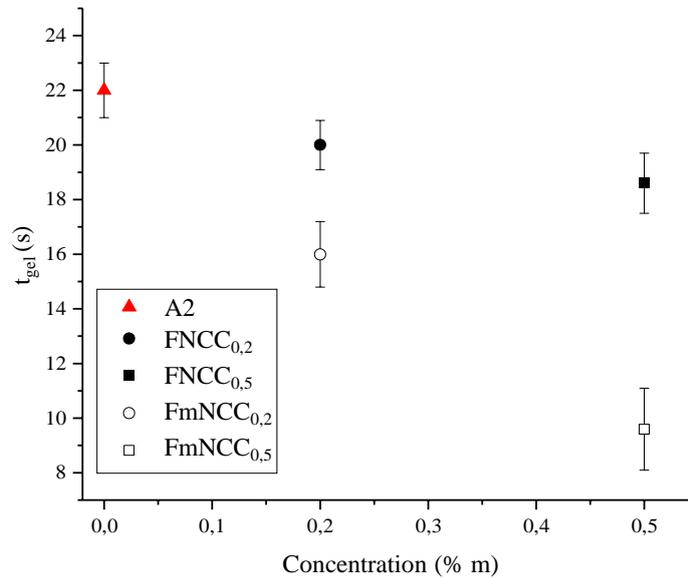


Figure IV-21 : Temps de gélification (t_{gel}) en fonction de la concentration en NCC ou mNCC des formulations contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) sans et avec 0,2 ou 0,5 %m de NCC ou mNCC.

IV.5.2. RÉOLUTION SPATIALE DES HYDROGELS

Il est important de limiter la diffusion du faisceau UV dans la direction Z dans les formulations d'impression afin d'améliorer la résolution [62]. En effet, la diffusion du faisceau UV a un impact direct sur l'épaisseur de chaque couche imprimée. En général, une épaisseur de couche plus fine permet d'obtenir une meilleure résolution. L'absorption UV-vis est une caractéristique essentielle qui définit la capacité d'un composé à limiter la pénétration de la lumière en profondeur. A la longueur d'onde spécifique de photo-réticulation de 365 nm, les formulations avec les mNCC possèdent une absorption plus importante que celles avec des NCC ($A_{365}(A2) = 0,095$, $A_{365}(FNCC_{0,5}) = 1,99$ et $A_{365}(FmNCC_{0,5}) = 2,61$) (**Figure IV-14**).

En corrélation avec l'augmentation de leur absorbance UV à 365 nm, les formulations avec des mNCC présentent les avantages d'un temps de gélification réduit. Cela est prouvé en mesurant la profondeur de réticulation dans la direction Z des différentes formulations en fonction du temps d'exposition (**Figure IV-22a**). La profondeur de réticulation a été étudiée pour A2, FNCC_{0,5} et FmNCC_{0,5} contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) sans et avec 0,5 %m de NCC et de mNCC, respectivement. Pour toutes ces formulations, la résistance de l'hydrogel est trop faible après un temps d'exposition égal à t_{gel} car celui-ci s'effondre. Aucune mesure d'épaisseur ne peut donc être réalisée. D'autre part, plus le t_{gel} est petit, plus un hydrogel qui se

tient mécaniquement se forme rapidement. Pour A2, 32 s sont nécessaires pour obtenir des hydrogels pouvant être manipulés, alors que seulement 25 s et 15 s sont suffisantes pour les formulations FNCC_{0,5} et FmNCC_{0,5} contenant 0,5 %m de NCC et de mNCC. Pour ces temps d'irradiation, les épaisseurs des hydrogels réticulés sont également cohérentes avec l'absorbance des formulations. Pour la formulation de référence A2, une épaisseur de $3,4 \pm 0,4$ mm est mesurée (32 s d'exposition), tandis que des hydrogels de $2,4 \pm 0,4$ mm et $1,6 \pm 0,4$ mm d'épaisseur sont formés après 25 s d'exposition et 15 s pour FNCC_{0,5} et FmNCC_{0,5}. Pour toutes les formulations, l'épaisseur de couche réticulée augmente linéairement avec le durée d'insolation ($R^2 > 0,98$). Enfin, pour un même temps de photo-réticulation, l'épaisseur de l'hydrogel obtenu est la plus élevée pour A2 et la plus faible avec FmNCC_{0,5}. Après 60 s d'exposition aux UV, l'hydrogel présente une épaisseur de couche réticulée de respectivement $6,9 \pm 0,3$ mm, $5,2 \pm 0,3$ mm et $4,9 \pm 0,3$ mm, lorsqu'il est issu des formulations A2, FmNCC_{0,5}, et FNCC_{0,5}, respectivement. En conséquence, la présence des NCC ou des mNCC réduit clairement l'épaisseur de couche réticulée en moins de temps que pour la formulation de mCMC de référence. Ce type de résultat n'a pas été rapporté par Cafiso *et al.* [3]. Cependant, une augmentation de la diffusion dans les directions X et Y est observée avec l'intégration de NCC et mNCC, conduisant à un diamètre d des hydrogels formés non conforme à celui du pochoir ($d = 12$ mm) (**Figure IV-22b**). Pour des durées d'insolation proche de t_{gel} , la largeur réticulée est plus faible que celle du pochoir pour les formulations contenant les nanocristaux. Par exemple, après 25 et 15 secondes d'insolation, le diamètre des hydrogels de FNCC_{0,5} et de FmNCC_{0,5} est de $11 \pm 0,5$ mm. Ensuite, le diamètre des hydrogels formés augmente avec le durée d'insolation jusqu'à $15 \pm 0,2$ mm et $16 \pm 0,2$ mm après 60 secondes d'insolation pour les formulations FNCC_{0,5} et FmNCC_{0,5} contenant 0,5 %m de NCC et de mNCC. Cependant, un durée d'insolation aussi important n'est pas nécessaire pour la fabrication d'une couche par impression 3D. La résolution en X et Y peut néanmoins être contrôlée par le temps d'irradiation jusqu'à l'obtention d'une diffusion négligeable (25 s pour FmNCC_{0,5}). Malgré une diffusion du faisceau UV avec la présence des nanocristaux, l'absorbance plus importante de ces formulations permet l'obtention d'une résolution accrue dans les trois directions de l'espace (x, y, z), ce qui a permis une conception plus précise des objets à imprimer (**Figure IV-22c**). Enfin, après lyophilisation, la forme des cryogels est restée la même que celle des hydrogels.

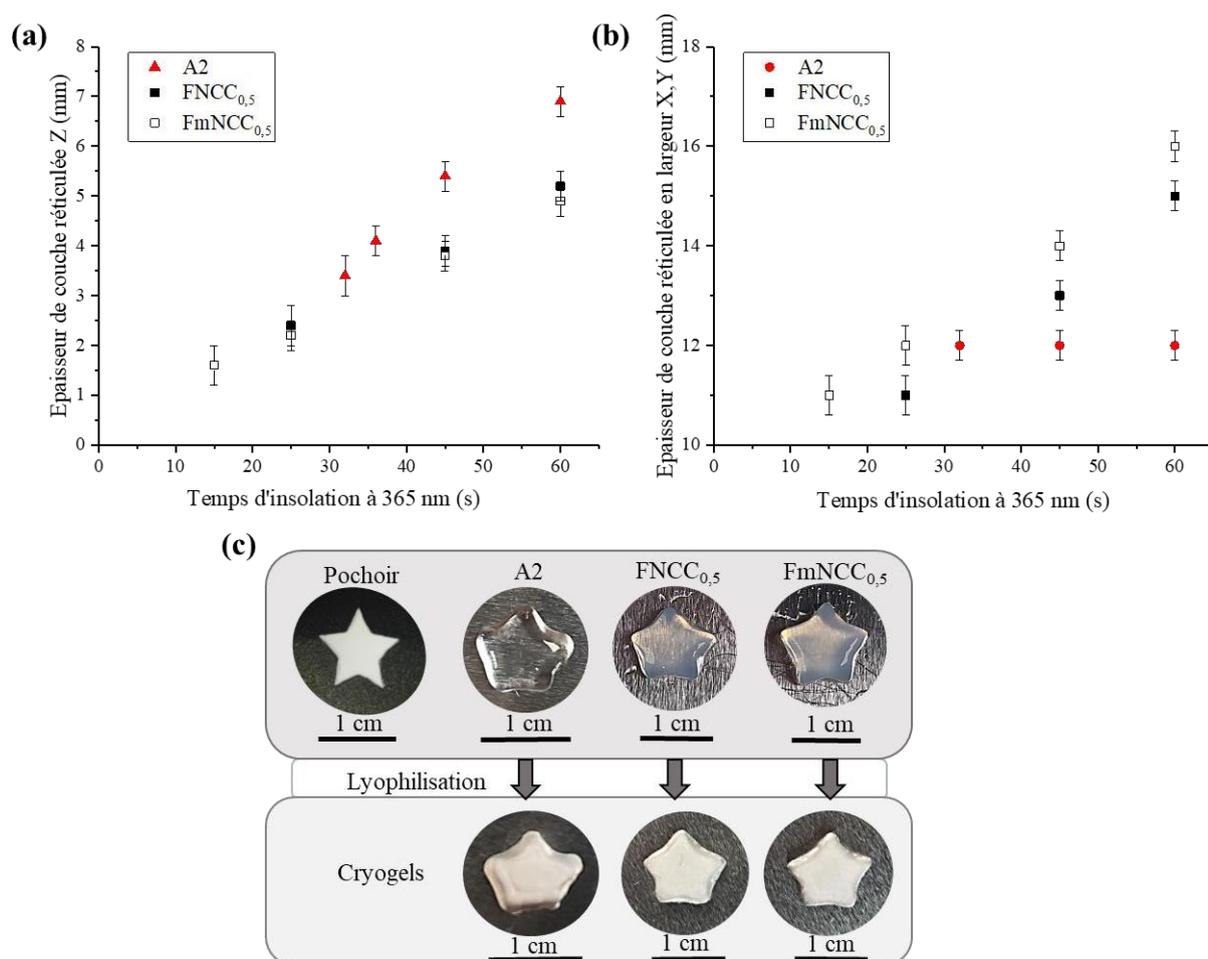


Figure IV-22 : (a) Évolution de l'épaisseur de couche réticulée (direction Z) en fonction du temps d'irradiation UV pour A2, FNCC_{0,5} et FmNCC_{0,5}. (b) détermination de la résolution X et Y par photo-réticulation d'une étoile pour les formulations A2, FNCC_{0,5} et FmNCC_{0,5} par photo-réticulation d'une épaisseur de 3 mm et (c) Illustration de l'influence de l'intégration de 0,5 %m de NCC ou de mNCC dans les formulations de mCMC photo-réticulables sur les résolutions X et Y des hydrogels obtenus après une exposition de 45 s sous lumière UV, et des cryogels correspondants.

IV.6. CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, la méthacrylation des nanocristaux de cellulose (NCC) a été réalisée en suivant le protocole de méthacrylation de la CMC. Le contrôle de la synthèse a permis d'obtenir une large gamme d'échantillons de NCC méthacrylée (mNCC) avec un degré de méthacrylation (DM) compris entre 0 et 12,6 %, ce qui représente une substitution maximale de 78 % des groupes hydroxyle en surface. De plus, les mNCC obtenus possèdent les mêmes dimensions et la même cristallinité que les NCC initiaux. Cependant, un inconvénient de ce protocole est l'ajout de soude, qui élimine les sulfates présents en surface des NCC et déstabilise la suspension. Pour remédier à ce problème, il aurait été envisageable de procéder à la carboxylation des NCC en amont. De plus, une étude plus approfondie de l'influence des différents paramètres sur les DM et DS obtenus aurait pu être réalisée afin de déterminer les conditions optimales permettant d'obtenir une suspension stable avec le DM le plus élevé possible. Néanmoins, des mNCC avec un DM de 0,83 % ont pu être stabilisées dans l'eau. Ces dernières, ainsi que des NCC, ont été ajoutées à des concentrations de 0,2 %m et 0,5 %m dans une solution de mCMC à 2 %m contenant de l'I2959.

Les interactions entre les différents matériaux entraînent une augmentation de la viscosité des formulations ainsi que de l'absorbance. Ces propriétés augmentent également avec la concentration en nanocristaux. L'ajout de NCC a entraîné une diminution significative du taux de conversion des méthacrylates et de la densité de noeuds de réticulation, tandis que l'effet inverse s'est produit avec l'ajout de mNCC, démontrant ainsi leur participation au réseau de réticulation. Par conséquent, la viscoélastique des hydrogels après gonflement est presque préservée en présence des mNCC. De même, par rapport à l'ajout de NCC, celui de mNCC aux mêmes concentrations a réduit le temps de réticulation et l'épaisseur de couche réticulée dans la direction Z, ce qui représente une évolution importante des propriétés pour optimiser la résolution des objets imprimés. Cependant, une diffusion du faisceau UV dans les directions X et Y causée par les nanocristaux a été observée, mais elle peut être contrôlée en ajustant le temps d'exposition aux UV. Enfin, les cryogels obtenus ont montré une bonne cytocompatibilité vis-à-vis des fibroblastes L929, ce qui est positif pour l'emploi de ces derniers à des fins biomédicales. Ces formulations développées sont très innovantes et pourraient être envisagées pour l'impression 3D par SLA et par DLP pour la fabrication d'objets destinés à des applications médicales.

RÉFÉRENCES

1. Dara, P.K.; Raghavankutty, M.; Deekonda, K.; Vemu, A.K.; Sivam, V.; Mathew, S.; Rangasamy, A.; Chandragiri Nagarajarao, R.; Subramanian, S. Synthesis of Biomaterial-Based Hydrogels Reinforced with Cellulose Nanocrystals for Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science* **2021**, *2021*, 1–14, doi:10.1155/2021/4865733.
2. De France, K.J.; Hoare, T.; Cranston, E.D. Review of Hydrogels and Aerogels Containing Nanocellulose. *Chem. Mater.* **2017**, *29*, 4609–4631, doi:10.1021/acs.chemmater.7b00531.
3. Cafiso, D.; Septevani, A.A.; Noè, C.; Schiller, T.; Pirri, C.F.; Roppolo, I.; Chiappone, A. 3D Printing of Fully Cellulose-Based Hydrogels by Digital Light Processing. *Sustainable Materials and Technologies* **2022**, *32*, e00444, doi:10.1016/j.susmat.2022.e00444.
4. Wang, J.; Siqueira, G.; Müller, G.; Rentsch, D.; Huch, A.; Tingaut, P.; Levalois-Grützmaier, J.; Grützmaier, H. Synthesis of New Bis(Acyl)Phosphane Oxide Photoinitiators for the Surface Functionalization of Cellulose Nanocrystals. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2823–2826, doi:10.1039/C5CC09760F.
5. Bai, H.; Li, Y.; Zhang, S.; Ma, P.; Dong, W. Photo-crosslinkable Poly (Vinyl Alcohol)/Nanocrystalline Cellulose Composites with Controllable Performance and Exceptional Water Vapor Barrier Property for Packaging Application. *Cellulose* **2022**, *29*, 7721–7734, doi:https://doi.org/10.1007/s10570-022-04760-x.
6. Siqueira, G.; Kokkinis, D.; Libanori, R.; Hausmann, M.K.; Gladman, A.S.; Neels, A.; Tingaut, P.; Zimmermann, T.; Lewis, J.A.; Studart, A.R. Cellulose Nanocrystal Inks for 3D Printing of Textured Cellular Architectures. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, 1604619, doi:10.1002/adfm.201604619.
7. Ma, Q.; Mohawk, D.; Jahani, B.; Wang, X.; Chen, Y.; Mahoney, A.; Zhu, J.Y.; Jiang, L. UV-Curable Cellulose Nanofiber-Reinforced Soy Protein Resins for 3D Printing and Conventional Molding. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, *2*, 4666–4676, doi:10.1021/acsapm.0c00717.
8. Kelly, P.V.; Cheng, P.; Gardner, D.J.; Gramlich, W.M. Aqueous Polymer Modification of Cellulose Nanofibrils by Grafting-Through a Reactive Methacrylate Group. *Macromol. Rapid Commun.* **2021**, *42*, 2000531, doi:10.1002/marc.202000531.
9. Wulandari, W.T.; Rochliadi, A.; Arcana, I.M. Nanocellulose Prepared by Acid Hydrolysis of Isolated Cellulose from Sugarcane Bagasse. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* **2016**, *107*, 012045, doi:10.1088/1757-899X/107/1/012045.
10. Wang, B.; Liu, J.; Chen, K.; Wang, Y.; Shao, Z. Three-Dimensional Printing of Methacrylic Grafted Cellulose Nanocrystal-Reinforced Nanocomposites With Improved Properties. *Polym Eng Sci* **2020**, *60*, 782–792, doi:10.1002/pen.25336.
11. Palencia, M. Functional Transformation of Fourier-Transform Mid-Infrared Spectrum for Improving Spectral Specificity by Simple Algorithm Based on Wavelet-like Functions. *Journal of Advanced Research* **2018**, *14*, 53–62, doi:10.1016/j.jare.2018.05.009.
12. Cai, C.; Wei, Z.; Huang, Y.; Wang, P.; Song, J.; Deng, L.; Fu, Y. Bioinspired Structure-Robust Cellulose Nanocrystal Films with Enhanced Water Resistance, Photothermal Conversion Ability, and Fluorescence. *Cellulose* **2020**, *27*, 10241–10257, doi:10.1007/s10570-020-03484-0.
13. Hishikawa, Y.; Togawa, E.; Kondo, T. Characterization of Individual Hydrogen Bonds in Crystalline Regenerated Cellulose Using Resolved Polarized FTIR Spectra. *ACS Omega* **2017**, *2*, 1469–1476, doi:10.1021/acsomega.6b00364.
14. Lee, C.M.; Kubicki, J.D.; Fan, B.; Zhong, L.; Jarvis, M.C.; Kim, S.H. Hydrogen-Bonding Network and OH Stretch Vibration of Cellulose: Comparison of Computational Modeling with Polarized IR and SFG Spectra. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 15138–15149, doi:10.1021/acs.jpcc.5b08015.
15. Atalla, R.H.; VanderHart, D.L. The Role of Solid State ¹³C NMR Spectroscopy in Studies of the Nature of Native Celluloses. **1999**, *19*.

16. Gårdebjer, S.; Bergstrand, A.; Idström, A.; Börstell, C.; Naana, S.; Nordstierna, L.; Larsson, A. Solid-State NMR to Quantify Surface Coverage and Chain Length of Lactic Acid Modified Cellulose Nanocrystals, Used as Fillers in Biodegradable Composites. *Composites Science and Technology* **2015**, *107*, 1–9, doi:10.1016/j.compscitech.2014.11.014.
17. Isogai, A.; Usuda, M.; Kato, T.; Uryu, T.; Atalla, R.H. Solid-State CP/MAS Carbon-13 NMR Study of Cellulose Polymorphs. *Macromolecules* **1989**, *22*, 3168–3172, doi:10.1021/ma00197a045.
18. Johnson, R.L.; Schmidt-Rohr, K. Quantitative Solid-State ¹³C NMR with Signal Enhancement by Multiple Cross Polarization. *Journal of Magnetic Resonance* **2014**, *239*, 44–49, doi:10.1016/j.jmr.2013.11.009.
19. Brusentsev, Y.; Yang, P.; King, A.W.T.; Cheng, F.; Cortes Ruiz, M.F.; Eriksson, J.E.; Kilpeläinen, I.; Willför, S.; Xu, C.; Wågberg, L.; et al. Photocross-Linkable and Shape-Memory Biomaterial Hydrogel Based on Methacrylated Cellulose Nanofibres. *Biomacromolecules* **2023**, *24*, 3835–3845, doi:10.1021/acs.biomac.3c00476.
20. Haouache, S.; Jimenez-Saelices, C.; Cousin, F.; Falourd, X.; Pontoire, B.; Cahier, K.; Jérôme, F.; Capron, I. Cellulose Nanocrystals from Native and Mercerized Cotton. *Cellulose* **2022**, *29*, 1567–1581, doi:10.1007/s10570-021-04313-8.
21. Park, S.; Baker, J.O.; Himmel, M.E.; Parilla, P.A.; Johnson, D.K. RCeseealrlcuh Lose Crystallinity Index: Measurement Techniques and Their Impact on Interpreting Cellulase Performance. **2010**.
22. Pandi, Narsimha.; Sonawane, S.H.; Anand Kishore, K. Synthesis of Cellulose Nanocrystals (CNCs) from Cotton Using Ultrasound-Assisted Acid Hydrolysis. *Ultrasonics Sonochemistry* **2021**, *70*, 105353, doi:10.1016/j.ulsonch.2020.105353.
23. Revol, J.-F.; Bradford, H.; Giasson, J.; Marchessault, R.H.; Gray, D.G. Helicoidal Self-Ordering of Cellulose Microfibrils in Aqueous Suspension. *International Journal of Biological Macromolecules* **1992**, *14*, 170–172, doi:10.1016/S0141-8130(05)80008-X.
24. Jordan, J.H.; Easson, M.W.; Condon, B.D. Alkali Hydrolysis of Sulfated Cellulose Nanocrystals: Optimization of Reaction Conditions and Tailored Surface Charge. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1232, doi:10.3390/nano9091232.
25. Kloser, E.; Gray, D.G. Surface Grafting of Cellulose Nanocrystals with Poly(Ethylene Oxide) in Aqueous Media. *Langmuir* **2010**, *26*, 13450–13456, doi:10.1021/la101795s.
26. Lam, E.; Hemraz, U.D. Preparation and Surface Functionalization of Carboxylated Cellulose Nanocrystals. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1641, doi:10.3390/nano11071641.
27. Beck, S.; Bouchard, J.; Berry, R. Dispersibility in Water of Dried Nanocrystalline Cellulose. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1486–1494, doi:10.1021/bm300191k.
28. Chang, C.; Hou, J.; Chang, P.R.; Huang, J. Structure and Properties of Cellulose Nanocrystals. In *Nanocellulose*; Huang, J., Dufresne, A., Lin, N., Eds.; Wiley, 2019; pp. 21–52 ISBN 978-3-527-34269-3.
29. Azzam, F.; Frka-Petesic, B.; Semeraro, E.F.; Cousin, F.; Jean, B. Small-Angle Neutron Scattering Reveals the Structural Details of Thermosensitive Polymer-Grafted Cellulose Nanocrystal Suspensions. *Langmuir* **2020**, *36*, 8511–8519, doi:10.1021/acs.langmuir.0c01103.
30. Han, J.; Zhou, C.; Wu, Y.; Liu, F.; Wu, Q. Self-Assembling Behavior of Cellulose Nanoparticles during Freeze-Drying: Effect of Suspension Concentration, Particle Size, Crystal Structure, and Surface Charge. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1529–1540, doi:10.1021/bm4001734.
31. Hassan, M.L.; Zeid, R.E.A.; Fadel, S.M.; Sakhawy, M.E.; Khiari, R. Cellulose Nanocrystals and Carboxymethyl Cellulose from Olive Stones and Their Use to Improve Paper Sheets Properties. *IJNP* **2014**, *7*, 261, doi:10.1504/IJNP.2014.067613.
32. da Fonsêca, J.H.L.; d'Ávila, M.A. Rheological Behavior of Carboxymethylcellulose and Cellulose Nanocrystal Aqueous Dispersions. *Rheol Acta* **2021**, *60*, 497–509, doi:10.1007/s00397-021-01292-2.

33. Oguzlu, H.; Boluk, Y. Interactions between Cellulose Nanocrystals and Anionic and Neutral Polymers in Aqueous Solutions. *Cellulose* **2017**, *24*, 131–146, doi:10.1007/s10570-016-1096-6.
34. Kalashnikova, I.; Bizot, H.; Cathala, B.; Capron, I. Modulation of Cellulose Nanocrystals Amphiphilic Properties to Stabilize Oil/Water Interface. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 267–275, doi:10.1021/bm201599j.
35. Bruel, C.; Tavares, J.R.; Carreau, P.J.; Heuzey, M.-C. The Structural Amphiphilicity of Cellulose Nanocrystals Characterized from Their Cohesion Parameters. *Carbohydrate Polymers* **2019**, *205*, 184–191, doi:10.1016/j.carbpol.2018.10.026.
36. Xu, H.-N.; Tang, Y.-Y.; Ouyang, X.-K. Shear-Induced Breakup of Cellulose Nanocrystal Aggregates. *Langmuir* **2017**, *33*, 235–242, doi:10.1021/acs.langmuir.6b03807.
37. Qi, W.; Yu, J.; Zhang, Z.; Xu, H.-N. Effect of PH on the Aggregation Behavior of Cellulose Nanocrystals in Aqueous Medium. *Mater. Res. Express* **2019**, *6*, 125078, doi:10.1088/2053-1591/ab5974.
38. Liao, J.; Pham, K.A.; Breedveld, V. Rheological Characterization and Modeling of Cellulose Nanocrystal and TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibril Suspensions. *Cellulose* **2020**, *27*, 3741–3757, doi:10.1007/s10570-020-03048-2.
39. Azrak, S.M.E.A.; Gohl, J.A.; Moon, R.J.; Schueneman, G.T.; Davis, C.S.; Youngblood, J.P. Controlled Dispersion and Setting of Cellulose Nanofibril - Carboxymethyl Cellulose Pastes. *Cellulose* **2021**, *28*, 9149–9168, doi:10.1007/s10570-021-04081-5.
40. Butchosa, N.; Zhou, Q. Water Redispersible Cellulose Nanofibrils Adsorbed with Carboxymethyl Cellulose. *Cellulose* **2014**, *21*, 4349–4358, doi:10.1007/s10570-014-0452-7.
41. Oun, A.A.; Rhim, J.-W. Characterization of Carboxymethyl Cellulose-Based Nanocomposite Films Reinforced with Oxidized Nanocellulose Isolated Using Ammonium Persulfate Method. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *174*, 484–492, doi:10.1016/j.carbpol.2017.06.121.
42. Du, L.; Zhong, T.; Wolcott, M.P.; Zhang, Y.; Qi, C.; Zhao, B.; Wang, J.; Yu, Z. Dispersing and Stabilizing Cellulose Nanoparticles in Acrylic Resin Dispersions with Unreduced Transparency and Changed Rheological Property. *Cellulose* **2018**, *25*, 2435–2450, doi:10.1007/s10570-018-1739-x.
43. Kowalonek, J.; Kaczmarek, H.; Kurzawa, M. Effect of UV-Irradiation on Fluorescence of Poly(Methyl Methacrylate) Films with Photosensitive Organic Compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2016**, *319–320*, 18–24, doi:10.1016/j.jphotochem.2015.12.017.
44. Means, A.K.; Grunlan, M.A. Modern Strategies To Achieve Tissue-Mimetic, Mechanically Robust Hydrogels. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8*, 705–713, doi:10.1021/acsmacrolett.9b00276.
45. Yang, J.; Han, C.-R.; Duan, J.-F.; Xu, F.; Sun, R.-C. Mechanical and Viscoelastic Properties of Cellulose Nanocrystals Reinforced Poly(Ethylene Glycol) Nanocomposite Hydrogels. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 3199–3207, doi:10.1021/am4001997.
46. Mantha, S.; Pillai, S.; Khayambashi, P.; Upadhyay, A.; Zhang, Y.; Tao, O.; Pham, H.M.; Tran, S.D. Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials* **2019**, *12*, 3323, doi:10.3390/ma12203323.
47. Chaudhuri, O.; Cooper-White, J.; Janmey, P.A.; Mooney, D.J.; Shenoy, V.B. Effects of Extracellular Matrix Viscoelasticity on Cellular Behaviour. *Nature* **2020**, *584*, 535–546, doi:10.1038/s41586-020-2612-2.
48. Yoshii, E. Cytotoxic Effects of Acrylates and Methacrylates: Relationships of Monomer Structures and Cytotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *37*, 517–524, doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19971215)37:4<517::AID-JBM10>3.0.CO;2-5.
49. I.S. EN ISO 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity.
50. Abbasi, N.; Hamlet, S.; Love, R.M.; Nguyen, N.-T. Porous Scaffolds for Bone Regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* **2020**, *5*, 1–9, doi:10.1016/j.jsamd.2020.01.007.

51. Sindhu, K.A.; Prasanth, R.; Thakur, V.K. Medical Applications of Cellulose and Its Derivatives: Present and Future. In *Nanocellulose Polymer Nanocomposites*; Thakur, V.K., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2014; pp. 437–477 ISBN 978-1-118-87224-6.
52. Tyshkunova, I.V.; Poshina, D.N.; Skorik, Y.A. Cellulose Cryogels as Promising Materials for Biomedical Applications. *IJMS* **2022**, *23*, 2037, doi:10.3390/ijms23042037.
53. Hoare, T.R.; Kohane, D.S. Hydrogels in Drug Delivery: Progress and Challenges. *Polymer* **2008**, *49*, 1993–2007, doi:10.1016/j.polymer.2008.01.027.
54. Melilli, G.; Carmagnola, I.; Tonda-Turo, C.; Pirri, F.; Ciardelli, G.; Sangermano, M.; Hakkarainen, M.; Chiappone, A. DLP 3D Printing Meets Lignocellulosic Biopolymers: Carboxymethyl Cellulose Inks for 3D Biocompatible Hydrogels. *Polymers* **2020**, *12*, 1655, doi:10.3390/polym12081655.
55. Reza, A.T.; Nicoll, S.B. Characterization of Novel Photocrosslinked Carboxymethylcellulose Hydrogels for Encapsulation of Nucleus Pulposus Cells. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 179–186, doi:10.1016/j.actbio.2009.06.004.
56. Yu, C.; Schimelman, J.; Wang, P.; Miller, K.L.; Ma, X.; You, S.; Guan, J.; Sun, B.; Zhu, W.; Chen, S. Photopolymerizable Biomaterials and Light-Based 3D Printing Strategies for Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 10695–10743, doi:10.1021/acs.chemrev.9b00810.
57. Seo, J.W.; Kim, G.M.; Choi, Y.; Cha, J.M.; Bae, H. Improving Printability of Digital-Light-Processing 3D Bioprinting via Photoabsorber Pigment Adjustment. *IJMS* **2022**, *23*, 5428, doi:10.3390/ijms23105428.
58. Huh, J.; Moon, Y.-W.; Park, J.; Atala, A.; Yoo, J.J.; Lee, S.J. Combinations of Photoinitiator and UV Absorber for Cell-Based Digital Light Processing (DLP) Bioprinting. *Biofabrication* **2021**, *13*, 034103, doi:10.1088/1758-5090/abfd7a.
59. Silva, J. da; Fracacio, R. Toxicological and Ecotoxicological Aspects of Tartrazine Yellow Food Dye: A Literature Review. *Rev. Bras. Ciênc. Ambient. (Online)* **2020**, *56*, 137–151, doi:10.5327/Z21769478746.
60. Amchova, P.; Kotolova, H.; Ruda-Kucerova, J. Health Safety Issues of Synthetic Food Colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2015**, *73*, 914–922, doi:10.1016/j.yrtph.2015.09.026.
61. Miedzińska, D.; Gieleta, R.; Popławski, A. Experimental Study on Influence of Curing Time on Strength Behavior of SLA-Printed Samples Loaded with Different Strain Rates. *Materials* **2020**, *13*, 5825, doi:10.3390/ma13245825.
62. Bhattacharjee, N.; Parra-Cabrera, C.; Kim, Y.T.; Kuo, A.P.; Folch, A. Desktop-Stereolithography 3D-Printing of a Poly(Dimethylsiloxane)-Based Material with Sylgard-184 Properties. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1800001, doi:10.1002/adma.201800001.

CHAPITRE V.

***Fabrication additive d'hydrogels à
partir de formulations cellulosiques
photosensibles***

V.1. INTRODUCTION

Les hydrogels étudiés dans les deux chapitres précédents ont été préparés en insolant pendant une durée définie, une formulation de mCMC contenue dans une cuve. L'analyse approfondie des caractéristiques de ces hydrogels a permis de mettre en avant des relations structure-propriétés, ouvrant ainsi des perspectives en termes d'applications biomédicales telles que la réparation de tissus biologiques et la libération contrôlée de principes actifs. Cependant, pour exploiter pleinement les propriétés des hydrogels dans ces différentes applications, une mise en forme spécifique est souvent nécessaire. Pour cela, la fabrication additive est considérée comme une méthode de fabrication prometteuse [1]. La DLP et la P2P permettent ainsi l'impression d'hydrogels avec une morphologie adaptée et des résolutions de quelques dizaines de micromètres et de quelques centaines de nanomètres, respectivement. Ces deux techniques ont déjà été utilisées avec succès pour la mise en forme d'hydrogels de polysaccharides [2–6].

Dans ce chapitre, les technologies DLP et P2P sont étudiées afin d'imprimer des hydrogels de formes complexes à partir de formulations de mCMC. L'objectif de ces travaux est d'identifier les avantages et les limitations de chacune des deux techniques, dans le but de concevoir un échafaudage (*scaffold*) de dimensions appropriées pour favoriser la croissance cellulaire nécessaire à la réparation des tissus mous (100 – 200 μm). Dans ce cadre, les propriétés des hydrogels imprimés sont comparées à celles des hydrogels formés en une seule insolation. Enfin, la dégradation enzymatique de ces matériaux est évaluée pour assurer une résorption du matériau au fur et à mesure de la croissance tissulaire. Une partie de ces travaux font l'objet d'un article en cours de rédaction.

V.2. ETUDE DE L'INFLUENCE DU PHOTO-AMORCEUR ET DE LA LONGUEUR D'ONDE DU RAYONNEMENT UV

L'imprimante Asiga MAX (Asiga, Australie), utilisée dans ce chapitre, est spécialement conçue pour offrir une fabrication additive de haute qualité, notamment dans les domaines dentaire et médical. Elle propose une résolution maximale de 62 μm dans les axes X et Y, et fonctionne avec une longueur d'onde de 385 nm et une irradiance maximale de 18 mW/cm². En conséquence, les formulations étudiées dans les chapitres précédents ne peuvent pas être imprimées avec cette imprimante, car l'I2959 n'absorbe pas à la longueur d'onde de 385 nm [7]. Un changement de photo-amorceur a donc été nécessaire, et le LAP a été sélectionné en raison de ses propriétés déjà développées dans la section I.5.2.2.

Tout d'abord, des formulations de mCMC contenant de l'I2959 ou du LAP ont été préparées afin de comparer les propriétés des hydrogels correspondants. Dans chaque formulation, le photo-amorceur a été ajouté en respectant un rapport molaire de 0,55 entre ce dernier et les méthacrylates (**Tableau V-1**)

Tableau V-1 : Composition des formulations de mCMC contenant de l'I2959 ou du LAP comme photo-initiateur.

Formulation	mCMC		Photo-amorceur		Eau
	DM (%)	Concentration (%m)	Nom	Concentration (%m)	Concentration (%m)
A2	34 \pm 4	2	I2959	0,12	97,88
A3		3		0,18	96,82
FA2		2	LAP	0,15	97,85
FA3		3		0,22	96,78
B2	50 \pm 5	2	I2959	0,20	97,80
FB2			LAP	0,25	97,75
C2	76 \pm 6	2	I2959	0,32	97,68
FC2			LAP	0,40	97,60

V.2.1. INFLUENCE DE LA NATURE DU PHOTO-AMORCEUR SUR LES CINÉTIQUES DE PHOTO-RÉTICULATION

L'influence du photo-amorceur sur l'imprimabilité des formulations est discutée dans ce paragraphe. Cette étude a été réalisée sur les formulations A2 et FA2, composées de 2 %m de mCMC (DM = 34 %), et de 0,12 %m d'I2959 ou 0,15 %m de LAP, respectivement. À cet effet, les deux formulations ont été comparées à travers des mesures de rhéologie en temps réel, visant à établir leurs temps de gélification (t_{gel}) respectifs pour chacune. Par la suite, les épaisseurs des couches réticulées ont été évaluées en fonction de la durée d'exposition aux rayons UV. De plus, une analyse approfondie du temps nécessaire pour atteindre un taux de conversion maximal, a été réalisée à l'aide de la RMN du solide CP-MAS du carbone, conjuguée à la rhéologie plan-plan. Toutes ces évaluations ont été menées avec des intensités lumineuses de

82 et 18 mW/cm², associées à des longueurs d'onde de 365 et 385 nm pour les formulations contenant respectivement de l'I2959 et du LAP. Ces paramètres sont ceux des imprimantes Prodways et Asiga, respectivement, utilisées dans ces travaux de thèse.

V.2.1.1. Evolution des temps de gélification mesurés par rhéologie en temps réel

Les temps de gélification des formulations A2 et FA2 ont été mesurés par rhéologie en temps réel (**Figure V-1**). Après 60 s de stabilisation de la formulation étudiée, la photo-réticulation des méthacrylates des mCMC commence avec l'application de la lumière UV et conduit à une augmentation progressive des valeurs de G' et G'' jusqu'à atteindre un comportement de type solide ($G' > G''$). Le temps de gélification (t_{gel}) est ensuite déterminé à l'intersection des courbes de G' et G'' . Malgré une puissance surfacique d'insolation plus importante pour la réticulation de A2, le t_{gel} est plus important que dans le cas de FA2. En effet, le temps de gélification est de 22 ± 1 s pour A2 et de $2,7 \pm 0,10$ s pour FA2. Cela peut être expliqué par une meilleure absorbance du LAP à 385 nm que celle de l'I2959 à 365 nm. Les coefficients d'absorption molaire (ϵ_λ) calculés pour les deux photo-amorceurs à partir de leur courbe d'étalonnage en absorbance, sont en effet de $\epsilon_{385} = 162$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ pour le LAP, et $\epsilon_{365} = 3,00$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ pour l'I2959. En comparaison, Melilli *et al.* ont mesuré un temps de gélification de 2 s avec une formulation de 2 %m de mCMC (DM = 60 %, M_w (CMC = 250 kDa) avec du LAP comme photo-amorceur avec une concentration de 0,04 %m et une irradiance de 30 mW/cm² [8]. Cette valeur est en phase avec le temps de 2,7 s mesuré pour la formulation FA2.

Le temps de gélification plus faible avec le LAP comme photo-amorceur, devrait permettre de réduire considérablement le temps d'impression d'une couche et donc le temps total d'impression d'un hydrogel.

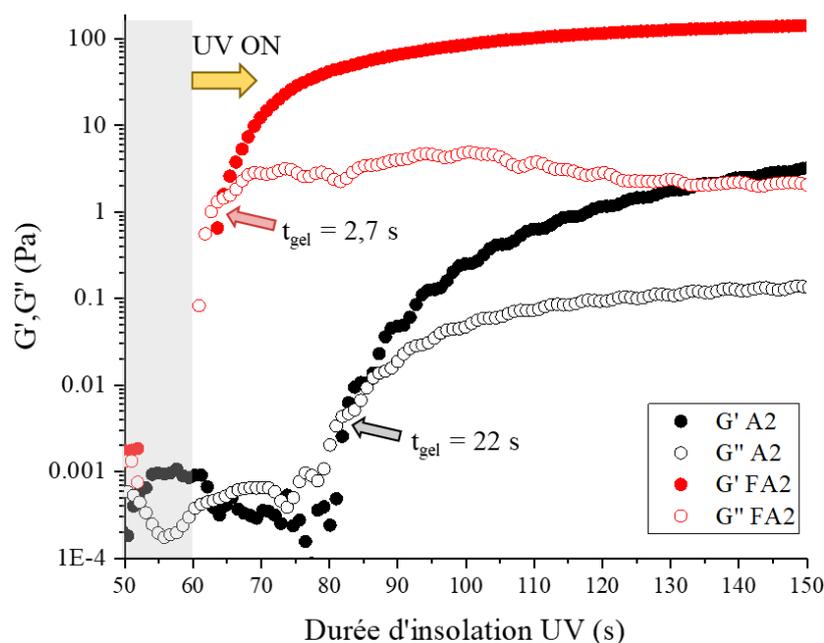


Figure V-1 : Evolution des modules élastiques et visqueux en cisaillement (G' et G'') en fonction de la durée d'insolation UV lors de mesures en rhéologie en temps réel à 0,1 Hz et 5 % de déformation, pour les formulations A2 et FA2 contenant 2%*m* en mCMC (DM = 34 %) dans l'eau avec de l'I2959 ou du LAP comme photo-amorceurs. L'insolation UV démarre au temps $t = 60$ s. Des longueurs d'onde de 365 nm et 385 nm ainsi que des irradiances de 82 mW/cm² et 18 mW/cm² ont été utilisées pour les formulations A2 et FA2, respectivement.

V.2.1.2. Imprimabilité des résines

En complément des mesures de temps de gélification, l'imprimabilité des résines A2 et FA2 a été vérifiée, en étudiant l'évolution de l'épaisseur (dans la direction Z) de la couche photo-réticulée de l'hydrogel formé, en fonction de la durée d'insolation. Ces mesures permettent notamment de définir l'épaisseur minimale de chaque couche lors de l'impression d'un hydrogel. Il est évident d'observer que la durée minimale d'insolation nécessaire pour obtenir un hydrogel qui se tient mécaniquement, est bien plus faible dans le cas de la formulation FA2 que pour la formulation A2 (**Figure V-2**). Ces durées minimales, respectivement de 3 s et 32 s pour les formulations FA2 et A2, sont cohérentes avec les temps de gélification mesurés précédemment (respectivement $2,7 \pm 0,10$ s et 22 ± 1 s pour FA2 et A2). Pour ces durées minimales, les épaisseurs des hydrogels obtenus sont de $3,4 \pm 0,4$ mm pour A2 et de $2,9 \pm 0,19$ mm pour FA2. Ensuite, l'épaisseur de la couche réticulée augmente linéairement avec la durée d'insolation pour les deux formulations (**Figure V-2**). Cette augmentation est toutefois plus rapide dans le cas de la formulation FA2. Ce résultat est en accord avec l'initiation du LAP plus efficace que celle de l'I2959 dans leurs conditions d'utilisation respectives. En revanche, il paraît important de noter que pour chacune des deux formulations, les épaisseurs minimales des couches photo-réticulées sont élevées (de l'ordre de 3 mm). Ceci représente un inconvénient majeur pour la fabrication additive d'hydrogels résolus

en Z par des techniques de type « *vat photopolymerization* ». En effet, ce phénomène pourrait induire une polymérisation indésirable de la formulation dans l'épaisseur, au travers des différentes couches.

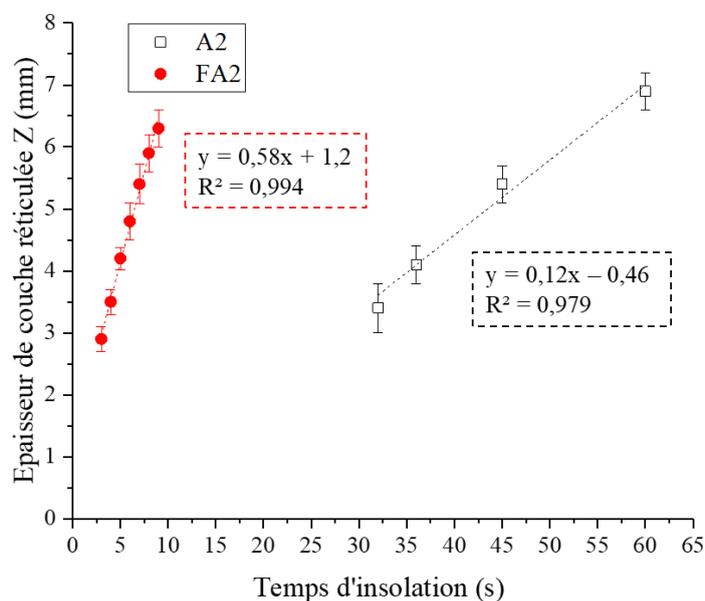


Figure V-2 : Évolution de l'épaisseur de la couche photo-réticulée (direction Z) en fonction de la durée d'insolation UV pour les formulations A2 et FA2, contenant 2 %m de mCMC et 0,12% de I2959 ou 0,15 %m de LAP, respectivement.

V.2.1.3. Temps de conversion maximale des méthacrylates

Dans les chapitres précédents, la durée d'insolation nécessaire pour atteindre un taux de conversion maximal (TCM) des méthacrylates lors de l'insolation a été déterminée par RMN ^{13}C CP-MAS à partir de cryogels de 3,6 mm d'épaisseur, issus de formulations contenant de l'I2959 (section III.4.4). Pour ces formulations il a été démontré que le TCM maximal est atteint après 5 minutes d'insolation. Cette technique a été envisagée pour étudier le comportement de la formulation FA2, contenant du LAP sur des cryogels insolés 3 minutes pour commencer. De façon intéressante, le spectre RMN ^{13}C CP-MAS des cryogels FA2 présente des différences par rapport au spectre des cryogels A2 (**Figure V-3**). En effet, contrairement au spectre de A2, le carbone C11' issu du carbone C11 du groupement vinylique des méthacrylates après réticulation est confondu dans la zone d'intégration entre 122 et 144 ppm comprenant les carbones C10 et C11, ainsi que les carbones des cycles aromatiques du LAP (**Annexe V-1**). De même, les carbones des fonctions carbonyles C9 et C9' présents à 168 et 163 ppm pour les cryogels de A2 sont confondus de 165 à 171 ppm pour les cryogels de FA2. De plus, le signal du carbone C12' du méthyle des méthacrylates après réticulation est confondu avec le C12 correspondant aux méthyles des méthacrylates libres. Ces deux carbones possèdent des déplacements séparés à 28 ppm (C12') et 18 ppm (C12) dans le cas du spectre du cryogel A2, permettant le calcul du TCM (**Equation III-2**). Dans le cas du cryogel FA2, la superposition des

signaux C12 et C12' ne permet pas de les utiliser pour quantifier le taux de conversion des méthacrylates. L'étude du taux de conversion en fonction du temps n'a donc pu être réalisée par le biais de cette méthode de RMN (**Figure V-3**). Enfin, ces différences entre les deux spectres peuvent être expliquées par des environnements chimiques différents, apportés par la présence de parties greffés des photo-amorceurs sur le C11 du méthacrylate.

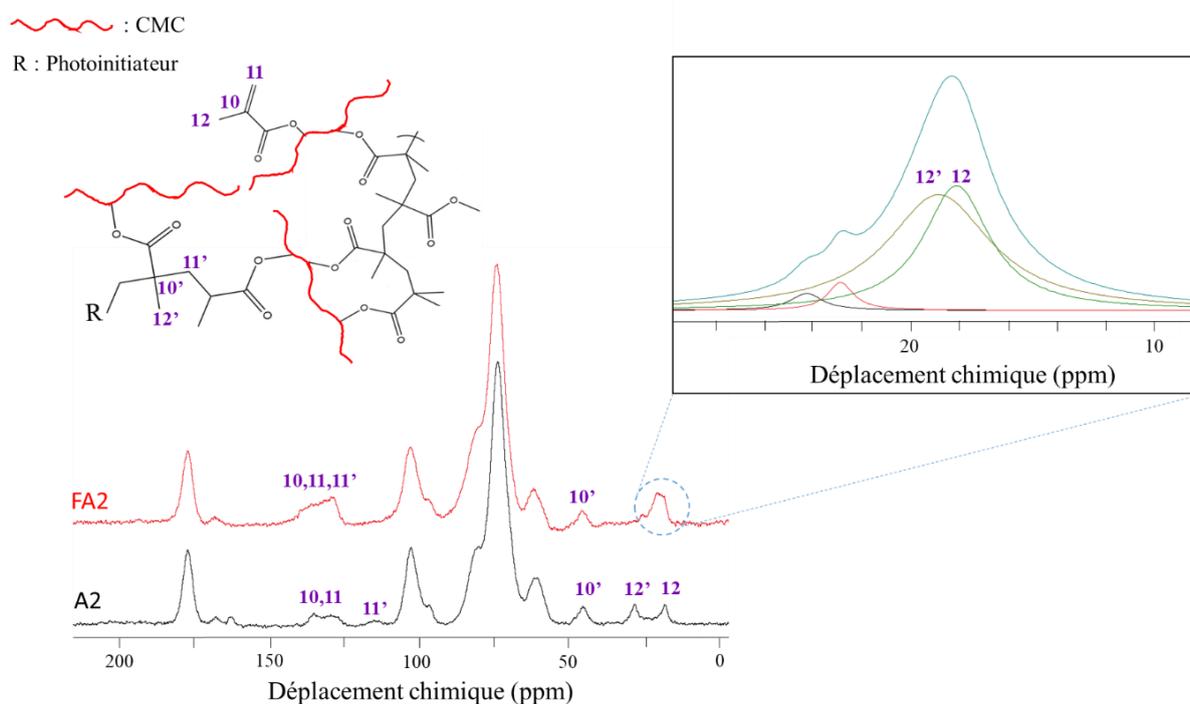


Figure V-3 : Spectres RMN ^{13}C CP-MAS des cryogels de A2 après 5 minutes de photo-réticulation à 82 mW/cm^2 et avec $\lambda = 365 \text{ nm}$, et de FA2 après 3 minutes de photo-réticulation à 18 mW/cm^2 et avec $\lambda = 385 \text{ nm}$. Une déconvolution est réalisée sur le spectre de FA2 entre 10 et 30 ppm. Les deux signaux à 23 et 24 ppm correspondent aux carbones du LAP (Annexe V-1).

Dans ce contexte, le taux de conversion des méthacrylates peut être suivi par une mesure des modules de conservation (G') et de perte (G'') en cisaillement en fonction de la durée d'insolation. Tout d'abord, pour confirmer la possibilité d'utiliser cette méthode, l'étude est réalisée sur des hydrogels de A2 de 3,6 mm d'épaisseur formés après 1, 3, 5 et 6 minutes (**Figure V-4a**). À mesure que la réaction de réticulation progresse, le TCM augmente, ce qui se traduit par une augmentation des modules G' et G'' de l'hydrogel. En effet, après 60 secondes d'insolation, les modules G' et G'' mesurés à 1 Hz sont respectivement de $501 \pm 85 \text{ Pa}$ et $38 \pm 8,0 \text{ Pa}$, puis de $1039 \pm 53 \text{ Pa}$ et $65 \pm 48 \text{ Pa}$ après 3 minutes. En augmentant la durée d'insolation à 5 et 6 min, ces modules ne varient plus. En effet, les modules G' et G'' des hydrogels sont respectivement de $1351 \pm 59 \text{ Pa}$ et $61 \pm 48 \text{ Pa}$ après 5 min d'insolation et de $1468 \pm 136,0 \text{ Pa}$ et $76 \pm 29 \text{ Pa}$ après 6 min. Cette évolution permet de confirmer le TCM maximal de 5 minutes obtenu par RMN ^{13}C CP-MAS du solide.

La même étude est donc reproduite sur des hydrogels de FA2 de 3,6 mm d'épaisseur formés après 1, 3 et 6 minutes sous rayonnement UV (**Figure V-4b**). Comme observé sur les

hydrogels de A2, à mesure que la réaction de réticulation progresse, le TCM augmente, ce qui se traduit par une augmentation des modules G' et G'' de l'hydrogel. En effet, après 60 secondes d'insolation, les modules G' et G'' mesurés à 1 Hz sont respectivement de 1190 ± 272 Pa et $149 \pm 30,0$ Pa alors qu'après 3 minutes, l'hydrogel possède des modules G' et G'' de 2310 ± 195 Pa et 406 ± 102 Pa respectivement. Par ailleurs, après 6 minutes d'insolation, ces modules ne varient plus ($G' = 2310 \pm 456$ Pa et $G'' = 422 \pm 129$ Pa). Dans ces conditions, il est estimé que la réticulation maximale des méthacrylates pour une couche de 3,6 mm est atteinte avant 3 minutes d'insolation. Comme réalisé par le groupe de recherche du Dr. Chiappone, il peut être envisagé d'utiliser les valeurs finales des modules G' et G'' obtenues, dans ces conditions, lors de mesures de temps de gélification par rhéologie en temps réel. Cependant, l'hydrogel se forme simultanément avec la déformation appliquée au matériau, ce qui a un impact sur la structure réticulée et, par conséquent, sur ses propriétés rhéologiques qui peuvent être différentes de celles d'un hydrogel formé sans déformation [8,9]. Néanmoins, dans les conditions de réticulation et de mesure utilisées dans ces travaux, le TCM maximal est atteint après 3 minutes d'insolation alors qu'il est de 60 secondes pour une formulation de 2 %m de mCMC (DM = 60 %) d'après les études de Melilli *et al.* (Figure V-1) [8]. Dans tous les cas, le LAP permet une réticulation plus rapide que l'I2959.

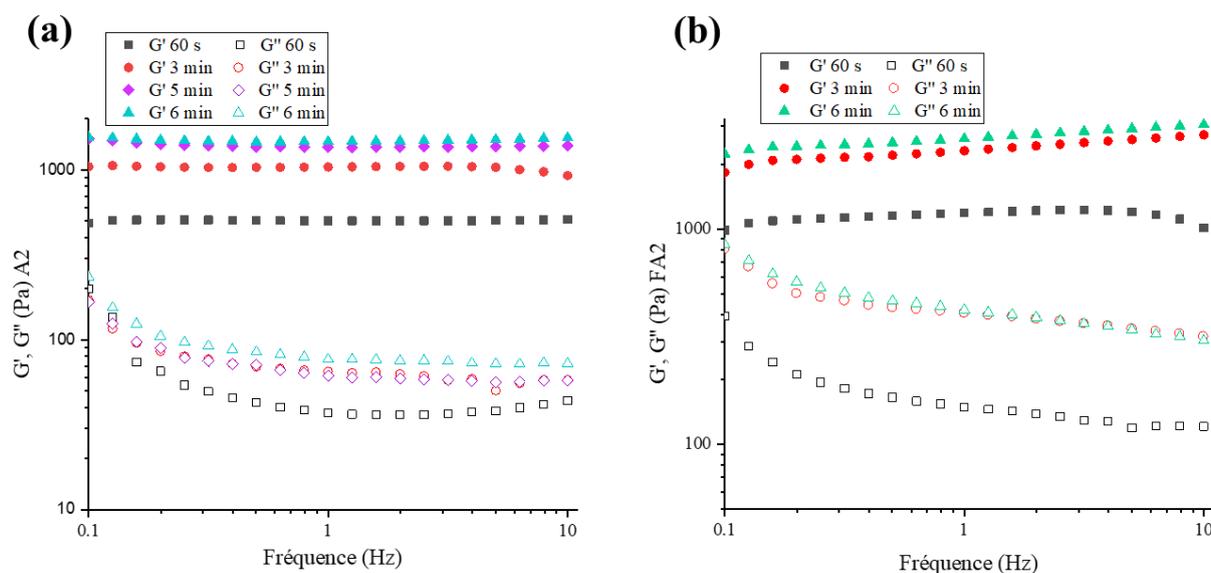


Figure V-4 : Modules élastiques (G') et visqueux (G'') en cisaillement mesurés entre 0,1 et 10 Hz, à 1 % de déformation et à 25 °C, pour des hydrogels d'une couche unique de 3,6 mm d'épaisseur (a) insolés pendant 1, 3, 5 et 6 min et préparés à partir d'une formulation A2 contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) et 0,12 %m d'I2959 et (b) insolés pendant 1, 3 et 6 min et préparés à partir d'une formulation contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) et 0,15 %m de LAP. Les $\tan(\delta)$ sont présentés en Annexe V-2.

V.2.2. INFLUENCE DU PHOTO-AMORCEUR SUR LES PROPRIÉTÉS DES HYDROGELS

Cette section traite de l'étude des propriétés de gonflement et viscoélastiques des hydrogels dérivés de formulations contenant 2 %m de mCMC avec des DM de 34 %, 50 % et 76 %, ou 3 %m de mCMC avec un DM de 34 %. Tous les hydrogels issus de formulations contenant du LAP sont caractérisés après 3 minutes d'insolation.

V.2.2.1. Propriétés viscoélastiques

Dans le chapitre III, il a été montré à partir de formulations contenant de l'I2959, que le module élastique G' des hydrogels ne varie pas de façon significative avec le DM de la mCMC (**Figure III-21**), mais augmente avec la concentration en mCMC dans la formulation. De la même façon, la caractérisation rhéologique des hydrogels issus des formulations contenant du LAP permet de mettre en avant les mêmes évolutions des modules G' et G'' en fonction du DM et de la concentration en mCMC. En effet, sur l'ensemble de la gamme de fréquences étudiées (0,1 à 10 Hz), à 1 % de déformation et à 25 °C, tous les hydrogels présentent un comportement majoritairement solide élastique, avec des valeurs de $G'_{(f)}$ toujours supérieures aux valeurs de $G''_{(f)}$ (**Figure V-5a**) et représenté par des $\tan(\delta) < 1$ (**Annexe V-3**). De plus, le même classement des modules élastiques et visqueux des hydrogels est observé en fonction de la concentration et du DM de la mCMC dans les formulations. Par conséquent, la comparaison des propriétés rhéologiques des matériaux a été effectuée en considérant G' .

Pour comparer les modules élastiques G' des hydrogels formés par initiation de l'I2959 et du LAP, les valeurs discutées sont prises à 1 Hz. Tout d'abord, comme les hydrogels formés par initiation de l'I2959, le module élastique G' augmente lorsque la concentration en mCMC 34 % augmente pour les formulations amorcées par le LAP (**Figure V-5a**). En effet, à 1 Hz, les modules élastiques G' des hydrogels issus des formulations contenant respectivement 2 %m et 3 %m de mCMC (DM = 34 %) sont de $2,3 \pm 0,19$ kPa (FA2) et $G' = 3,8 \pm 0,25$ kPa (FA3). En revanche, pour les hydrogels obtenus à partir des formulations contenant du LAP, le module élastique $G'_{(1 \text{ Hz})}$ diminue avec le DM (**Figure V-5b**). En effet, pour les formulations FA2 (DM = 34 ± 4 %), FB2 (50 ± 5 %) et FC2 (76 ± 6 %), les modules $G'_{(1 \text{ Hz})}$ des hydrogels correspondants sont de $2,3 \pm 0,19$ kPa, $1,6 \pm 0,041$ kPa et $1,2 \pm 0,079$ kPa respectivement. L'apparition d'un gradient de densité de nœuds de réticulation sur l'épaisseur de l'hydrogel pourrait expliquer ce phénomène. En effet, le LAP permet une réticulation plus rapide que l'I2959, et donc une densité de nœuds de réticulation plus importante sur la face de l'hydrogel en contact avec le faisceau UV. Plus cette partie polymérise, plus la diffusion du faisceau peut devenir difficile dans le reste de la formulation, diminuant la possibilité de réticulation le long de l'épaisseur [10]. Ce phénomène est d'autant plus important que le DM augmente, car la

quantité de méthacrylates est plus importante. Cela engendre la formation de zones faiblement réticulées, réduisant la résistance de la structure finale. En revanche, du fait de cinétiques de photo-réticulation plus faibles avec l'I2959, une réticulation homogène à travers l'épaisseur est potentiellement favorisée grâce à la diffusion complète du faisceau au sein de la formulation. Afin de vérifier cette hypothèse, une démarche intéressante consisterait à examiner la transmission et la diffusion d'un faisceau UV à travers les divers hydrogels par le biais de la spectroscopie UV-vis, utilisant une configuration avec une sphère d'intégration. Cette approche serait employée en utilisant les longueurs d'onde spécifiques de 365 nm et 385 nm, correspondant aux propriétés d'initiation du LAP et de l'I2959 respectivement, pour les hydrogels formés.

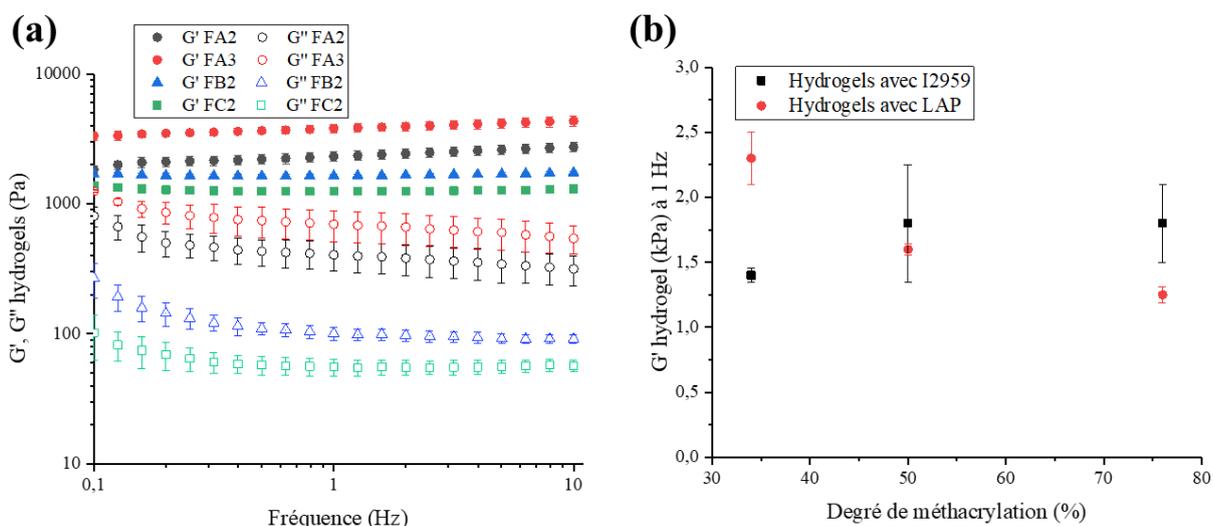


Figure V-5 : (a) Modules élastiques (G') et visqueux (G'') en cisaillement des hydrogels issus des formulations FA2, FA3, FB2 et FC2, mesurés par rhéologie plan-plan, entre 0,1 et 10 Hz, à 1 % de déformation et à 25 °C (b) Evolution des modules élastiques G' des hydrogels à 1 Hz, 1% de déformation et à 25°C en fonction du degré de méthacrylation (DM) de la mCMC et du type de photo-amorceur utilisés.

V.2.2.2. Taux de gonflement

D'après la théorie de Flory Rehner, la densité de nœuds de réticulation a une influence sur le taux de gonflement des hydrogels [11,12]. Ainsi, l'analyse du taux de gonflement des cryogels a été réalisée sur les échantillons issus des formulations FA2, FB2 et FC2. Ces formulations ont été élaborées à partir de mCMC présentant des DM de 34 %, 50 % et 76 %, respectivement. Cette démarche vise à mettre en évidence une éventuelle corrélation entre le DM de la mCMC considérée et l'évolution de la densité de nœuds de réticulation après 3 minutes d'insolation. Pour ces 3 cryogels comme pour ceux des formulations A2, B2 et C2, l'équilibre de gonflement dans l'eau à 25 °C est atteint après 10 h (**Figure V-6a**, **Figure III-18**). De façon intéressante, les cryogels issus de la formulation de FA2 gonflent moins que ceux issus des formulations FB2 et FC2, présentant tous deux un Q_m équivalent. En effet, après 48 h de

gonflement, les Q_m à l'équilibre sont respectivement de $40,85 \pm 1,25$, de $47,8 \pm 2,1$ et de $46,6 \pm 1,1$ pour les cryogels de FA2, FB2 et FC2. Enfin, le cryogel FA2 absorbe deux fois moins d'eau que le cryogel A2, alors que le cryogel FC2 absorbe autant d'eau que le C2 (**Figure V6b**). De façon intéressante, le ratio entre les quantités d'eau absorbées par les cryogels réticulés avec le LAP d'une part, et l'I2959 d'autre part, évolue linéairement avec le DM de la mCMC ($R^2 = 0,99$), sur la gamme de DM étudiée. En résumé, les résultats obtenus suggèrent que le taux de réticulation moyen des méthacrylates diminue à mesure que le DM augmente dans les formulations contenant du LAP. De plus, les parties les moins réticulées présentent une quantité de groupements méthacrylates libres plus importante, augmentant le caractère hydrophobe des matériaux. Cette observation explique la différence de gonflement relativement faible entre les cryogels formés via l'initiation du LAP. En effet, l'augmentation du gonflement, induite par un TCM moyen plus faible lorsque le DM augmente, est compensée par l'élévation concomitante de l'hydrophobicité.

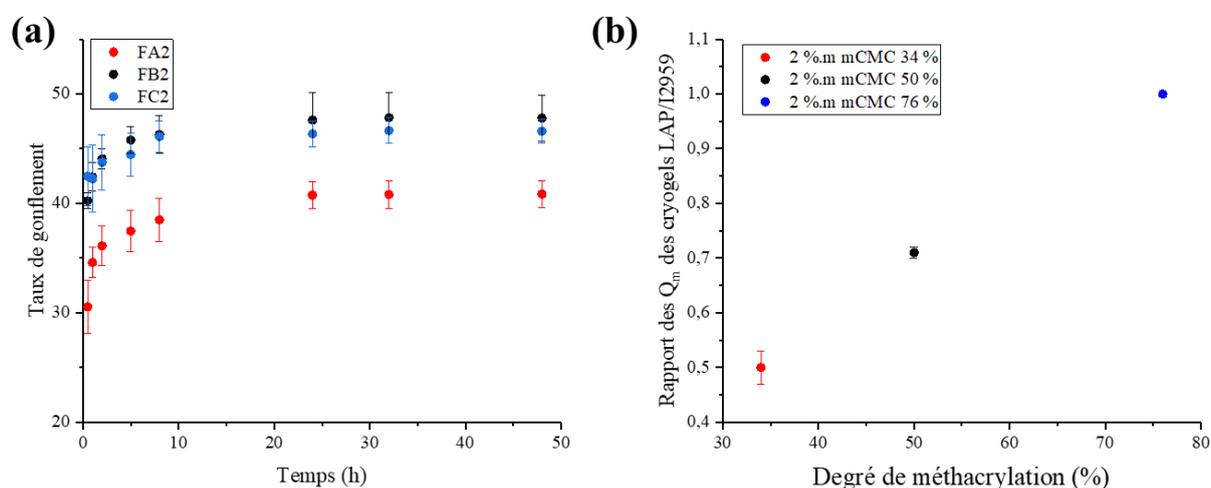


Figure V-6 : (a) Evolution du taux de gonflement (Q_m) en fonction de la durée d'immersion dans l'eau à 25 °C, pour les cryogels obtenus à partir des formulations FA2, FB2 et FC2 et (b) Evolution des rapports des Q_m des cryogels formés par initiation du LAP et par celle de l'I2959, en fonction du degré de méthacrylation des mCMC.

V.3. IMPRESSION D'HYDROGELS PAR DLP

Ce paragraphe présente les essais d'impression 3D réalisés à partir de la formulation FA2 composée de 2 %m de mCMC (DM = 34 %) et de 0,15 %m en LAP, avec la DLP Asiga MAX. Les paramètres d'impression permettant d'obtenir les hydrogels les plus résolus dans les directions X, Y et Z sont étudiés.

En fabrication additive, la résolution dans les directions X et Y se réfère à la qualité d'impression horizontale (de surface) et est déterminée par la finesse des détails que l'imprimante 3D peut reproduire sur la surface des couches de l'objet à imprimer [13]. Dans le cas de la DLP Asiga MAX utilisée, la résolution maximale en X et Y est de 62 μm , et correspond à la taille d'un pixel de l'image projetée. La résolution dans la direction Z fait référence à l'épaisseur des couches successives qui composent l'objet à imprimer. Dans le cas de l'Asiga MAX, la résolution Z maximale est de 1 μm et correspond à la distance minimale de déplacement du plateau. La durée d'insolation et l'épaisseur de chaque couche sont des paramètres essentiels à maîtriser pour optimiser la résolution d'objets imprimés par DLP. Dans le cas de l'impression d'hydrogels de mCMC, il est aussi possible de faire varier le DM et la concentration de la mCMC. Cependant, dans ces travaux de thèse, seule la formulation constituée de 2 %m de mCMC présentant un DM de 34 % a été sélectionnée pour réaliser les premières impressions. En effet, une étude préliminaire a permis de montrer en utilisant les formulations FA3 contenant 3 %m de mCMC (DM = 34 %) et FB2 contenant 2 %m de mCMC (DM = 50 %), que l'épaisseur de couche réticulée augmente pour une même durée d'insolation lorsque la concentration ou le DM augmentent (**Figure V-7**). Par exemple, pour une durée d'insolation sous UV de 4 s, des hydrogels ayant une épaisseur de $3,5 \pm 0,20$ mm, $4,5 \pm 0,19$ mm et $4,7 \pm 0,15$ mm ont été obtenus à partir des formulations FA2, FA3 et FB2, respectivement. Pour toutes les formulations, des épaisseurs des couches formées augmentent avec la durée d'insolation. De plus, les formulations FA3 et FB2 permettent d'obtenir un hydrogel qui se tient mécaniquement, plus rapidement qu'avec FA2. En effet, 2 secondes d'insolation suffisent pour les formulations FA3 et FB2, tandis qu'il faut attendre 3 secondes pour FA2. A ces durées d'insolation respectives, les épaisseurs des hydrogels obtenus sont de $2,9 \pm 0,20$ mm, $2,6 \pm 0,20$ mm et $2,6 \pm 0,15$ mm pour les formulations FA2, FA3 et FB2 respectivement. Ces résultats peuvent être expliqués par la présence d'une plus grande concentration en groupements méthacrylates dans la zone d'insolation, lorsque la concentration et le DM sont plus élevés. De même, les concentrations en méthacrylates très proches ($\Delta = 2\%$) pour les formulations FA3 et FB2, permettent d'expliquer les évolutions d'épaisseurs de couches réticulées similaires en fonction du temps d'irradiance. Malgré la possibilité de réduire les durée d'insolation pour les formulations FA3 et FB2, la pénétration plus profonde du faisceau UV avec le temps engendre généralement des couches plus épaisses par rapport à celles pouvant être obtenues avec la

formulation FA2 (section V.3.1). C'est pourquoi la formulation FA2 a été sélectionnée pour les prochaines étapes de l'étude.

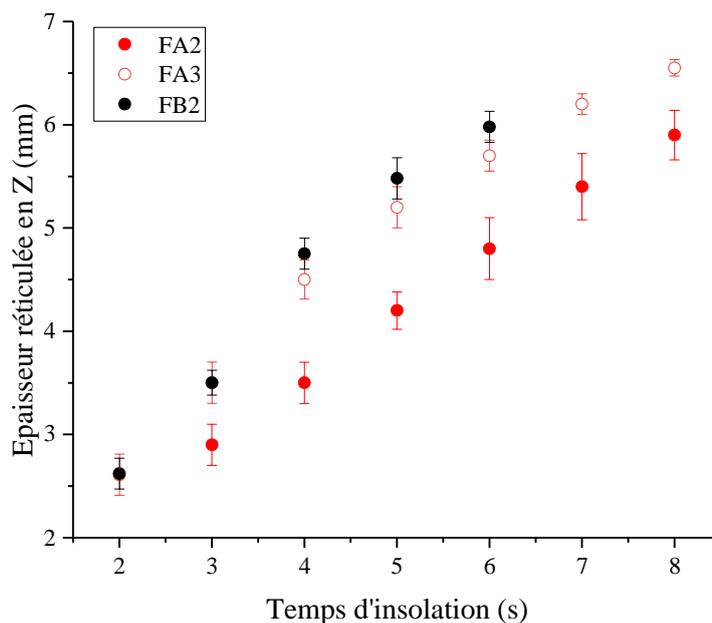


Figure V-7 : Évolution de l'épaisseur de la couche photo-réticulée (direction Z) en fonction de la durée d'insolation UV pour les formulations FA2, FA3 et FB2.

V.3.1. RÉOLUTION DANS LES DIRECTIONS X ET Y

Une pyramide à quatre étages possédant 4 étages de 2 mm de hauteur (Z) chacun, et 14, 10, 6 puis 2 mm de côté respectivement ($X = Y$), est le premier objet étudié dans le but de déterminer l'influence des différents paramètres d'impression sur la qualité de l'impression en X et Y (**Figure V-8a**).

En se basant sur le temps de gélification de 2,7 s mesuré précédemment (§ V.2.1.1) et sur les mesures des épaisseurs de couches réticulées pour la formulation FA2, la durée d'insolation de la première couche de la pyramide a été fixée à 5 s, de manière à obtenir un hydrogel suffisamment rigide pour adhérer au plateau durant l'impression, et capable de supporter la structure finale après décollement. Les autres couches ont été insolées 4 s, durée minimale permettant d'éviter l'effondrement de la structure imprimée (**Tableau V-2**). Indépendamment de l'épaisseur de couche réticulée, il a été observé qu'une durée d'insolation de 10 s provoque une polymérisation périphérique, qui se traduit par la formation de zones réticulées en dehors de la zone insolée. Cette polymérisation périphérique est graduelle sur l'épaisseur d'une même marche, et de moins en moins visible de la première à la dernière couche. Cela peut s'expliquer par le fait que le faisceau UV traverse les couches déjà réticulées lors de la formation d'une couche. En effet, des épaisseurs de couches de 100 à 500 μm ont été imprimées dans le cas de ces pyramides (**Tableau V-2**). Or, il a été observé qu'une insolation de seulement 4 s sans limitation de l'épaisseur à insoler, permet de réticuler des couches de

3,5 mm d'épaisseur (**Figure V-2**). Ainsi, lors de l'insolation d'une nouvelle couche d'une épaisseur maximale de 500 μm , les couches inférieures vont également être insolées. Par exemple, lors de l'impression d'un même étage de la pyramide avec une épaisseur de couche de 500 μm , la première couche (5 s) sera également insolée durant l'impression de 3 couches suivantes. En ce sens, pour une durée d'insolation de 10 s par couche, les durées d'insolation totale subies par les couches 1 à 4 sont donc de 35 s, 30 s, 20 s et 10 s, respectivement. La polymérisation périphérique est donc plus importante sur la couche 1 et décroît ensuite avec les différentes couches. Avec des épaisseurs de couche de 500 μm et des durées d'insolation de 4 s, la polymérisation périphérique est quasiment négligeable sur l'épaisseur d'un même étage. Le phénomène est toutefois légèrement observable à l'interface entre deux couches de surface différentes, c'est-à-dire entre la dernière couche d'un étage N et la première couche d'un étage N+1. Par ailleurs, le phénomène de polymérisation périphérique s'accroît si l'épaisseur de couche est plus faible car le temps d'insolation est multiplié par le nombre de couches. Pour atténuer ce phénomène, il est envisageable de diminuer la durée d'insolation pour des épaisseurs de couches plus faibles. Cependant, avec un temps de 3 s, l'épaisseur de couche réticulée n'est pas suffisamment résistante pour maintenir la couche qui s'affaisse lors de l'aller-retour du plateau dans la formulation avant la formation de la couche suivante (**Tableau V-2**, série 5).

A l'issue de ces essais, les paramètres optimaux pour imprimer des hydrogels de structure pyramidale avec les mêmes dimensions que le modèle CAO (**Figure V-8a**), ont été définis. Des durées d'insolation respectives de 5 s puis de 4 s, pour la première couche, puis les couches suivantes, ainsi qu'une épaisseur de couche de 500 μm (**Figure V-8b**), permettent ainsi de d'obtenir un hydrogel fidèle au modèle, tout en permettant de minimiser le temps de fabrication. En imprimant une structure pyramidale de plus petites dimensions, il est possible de déterminer la capacité de l'imprimante à reproduire des détails précis avec la formulation à imprimer. La limite dimensionnelle atteinte de manière à obtenir une pyramide correspondant au modèle sans affaissement et sans modification de la géométrie, est de 480 μm par hauteur de marche avec des paramètres d'impression correspondants à la fabrication 4 (**Tableau V-2**). Enfin, la structure macroscopique et les dimensions de l'hydrogel imprimé est conservée après lyophilisation (**Figure V-8d**).

Tableau V-2 : Influence des différents paramètres d'impression sur la structure des hydrogels imprimés sous la forme de pyramides, à partir de la formulation FA2 contenant une concentration de 2 %m de mCMC (DM = 34 %) et 0,15 %m de LAP. Les dimensions de la structure, constituée de 4 étages, sont constantes ($L \times l \times h = 14 \times 14 \times 8 \text{ mm}^3$, avec une hauteur et une largeur de marche de 2 mm).

Série	Durée d'insolation de la couche 1 (s)	Durée d'insolation des autres couches (s)	Epaisseur de couche réticulée en Z (μm)*	Etat final de l'hydrogel imprimé
1	5	3	500	Affaissement
2	5	10	500	Sur-polymérisation
3	5	5	500	Légère sur-polymérisation
4	5	4	500	Figure V-8c
5	5	4	100	Sur-polymérisation Figure V-8b
6	5	4	250	Sur-polymérisation
7	5	3	100	Affaissement
8	10	4	500	Sur-polymérisation à la base

* Correspond au pas de déplacement en Z du plateau

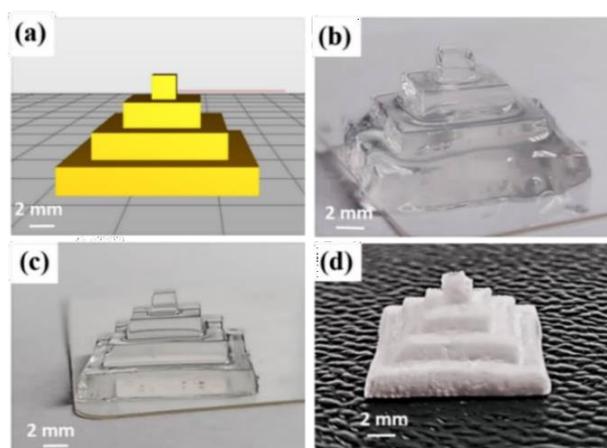


Figure V-8 : (a) Modèle CAO de la structure de la pyramide de dimensions $14 \times 14 \times 8 \text{ mm}^3$ ($L \times l \times h$) à imprimer avec une formulation de FA2 contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) et 0,15 %m de LAP. Hydrogels imprimés avec des durées d'insolation de 5 s pour la première couche, puis 4 s pour les couches suivantes, et avec des épaisseurs de couches en Z de $100 \mu\text{m}$ (b) et $500 \mu\text{m}$ (c), respectivement ; et (d) Cryogel obtenu par lyophilisation de l'hydrogel représenté en (c).

Dans le but de déterminer la résolution maximale qu'il est possible d'atteindre avec la formulation FA2 et la DLP utilisée, des objets coniques ont été imprimés de manière à limiter la réticulation périphérique sur les bords en évitant d'imprimer les mêmes surfaces (**Figure V-9a**). Les cônes possèdent une hauteur de 3 mm et la base a un diamètre de 3 mm et une hauteur de 1 mm. Dans toutes les expériences, la base servant de support aux cônes a été imprimées avec des durées d'insolation de 5 s pour la première couche puis 4 s pour les couches suivantes, et avec une épaisseur de couche de $500 \mu\text{m}$. Ensuite, une durée d'insolation de 4 s est appliquée pour imprimer les cônes. Une épaisseur de couche de $500 \mu\text{m}$ pour l'impression des cônes, conduit à des objets mal définis et des pointes grossières (**Figure V-9b**). Les pointes possédant une hauteur de 3 mm, seulement 6 couches sont nécessaires, ce qui ne permet pas

d'obtenir une bonne résolution. En diminuant l'épaisseur de couche à 200 μm , les cônes sont mieux définis et présentent une structure plus résistante après impression car la durée totale d'insolation est plus importante. Cependant, les pointes sont toutefois arrondies (**Annexe V-4a**). Avec une épaisseur de couche de 100 μm , les pointes sont moins arrondies et possèdent un diamètre de 200 μm environ (**Annexe V-4b**). En revanche, avec une épaisseur de couche de 50 μm , la dernière couche insolée de l'hydrogel présente un diamètre de surface de $84 \pm 3 \mu\text{m}$, proche de la taille d'un pixel de la DLP (62 μm). Cette différence de diamètre traduit un léger affaissement de la pointe (**Figure V-9c, d**). En **Annexe V-4c**, une photo de la base de la pointe permet d'observer la réticulation périphérique graduelle sur une épaisseur lorsque plusieurs couches de même surface sont ensuite imprimées. Cela n'est pas le cas que la pointe, étant donné que chaque couche possède une surface différente. Enfin, la structure macroscopique de l'hydrogel imprimé est conservée après lyophilisation. Une légère expansion verticale de la pointe, liée à la congélation par azote liquide du bas vers le haut et orientant les pores dans l'axe verticale d'environ 300 μm , est toutefois observée (**Figure V-9e**). Cette structure conique pourrait envisager l'impression par DLP de systèmes de microaiguilles (**Annexe V-5**). Pour terminer, une autre structure conique correspondant à une montagne (Cervin) a été imprimée pour évaluer visuellement la qualité des impressions possibles d'obtenir (**Annexe V-6**).

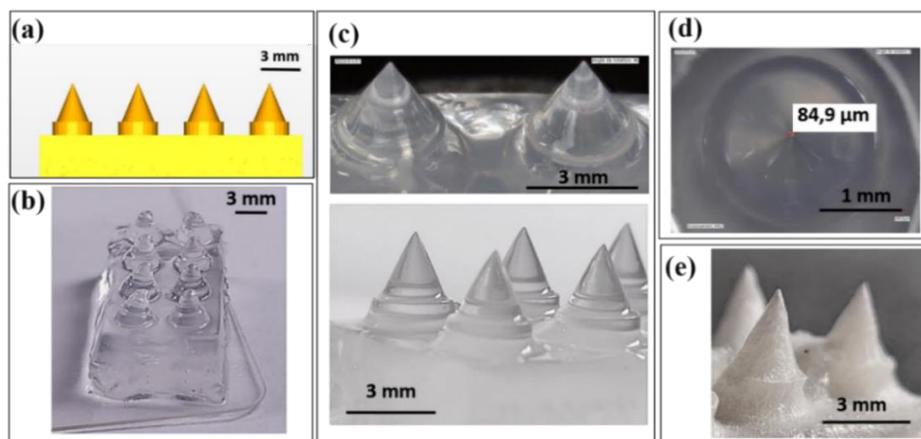


Figure V-9 : (a) Modèle CAO de la structure conique sur une base plane de dimensions $19,82 \times 10,48 \times 9,75 \text{ mm}^3$ ($L \times l \times h$) à imprimer avec une formulation de FA2 contenant une concentration de 2 %m de mCMC ($DM = 34 \%$) et 0,15 %m de LAP. (b) Hydrogel conique imprimé avec une épaisseur de couche (Z) de 500 μm et une durée d'insolation de 4 s par couche. (c) Hydrogel conique imprimé avec une épaisseur de couche (Z) de 50 μm et une durée d'insolation de 4 s par couche. (d) Evaluation de la résolution en X et Y sur la dernière couche imprimée de l'hydrogel représenté en (c). (e) Cryogel obtenu par lyophilisation de l'hydrogel représenté en (c).

L'un des objectifs de ces travaux étant d'imprimer des hydrogels possédant des cavités de dimensions contrôlées, pouvant être utilisés comme *scaffolds* permettant la croissance cellulaire, la possibilité d'imprimer ce type de pièce a été étudiée. Dans un premier temps, un engrenage avec un trou de 7,5 mm a été imprimé de manière à vérifier si l'impression permet

l'obtention d'un objet avec un trou, sans affaissement de l'hydrogel (**Figure V-10a**). Le trou est imprimé dans la direction de l'impression et l'hydrogel résultant est conforme au modèle et se tient sans affaissement après impression (**Figure V-10b**). L'objet étant volumineux, 15 couches successives de 500 μm d'épaisseurs et de même surface sont nécessaires. De ce fait, une modification des dimensions du trou est observée, avec un diamètre intérieur évoluant de 6,7 mm au niveau des premières couches, à 7,5 mm au niveau de la dernière couche. Enfin, la structure macroscopique de l'hydrogel imprimé est conservée après lyophilisation (**Figure V-10c**).

De la même façon, de petites grilles planes ont été imprimées de manière à déterminer les dimensions minimales qu'il est possible d'obtenir pour le diamètre de trou et l'épaisseur de parois (**Figure V-10d**). Les plus petites dimensions atteintes sans rupture de l'hydrogel et sans réticulation périphérique apparente dans les trous, sont de 340 μm de diamètre intérieur pour les canaux, et de 200 μm pour les parois (**Figure V-10e**). La dimension des canaux obtenus correspondent à celles souhaitées pour la croissance de la plupart des cellules (100 – 200 μm) [14–16]. Cependant, l'hydrogel imprimé n'est pas suffisamment résistant et il est impossible de le décoller du plateau sans le détériorer.

En somme, pour imprimer des hydrogels de mCMC possédant des cavités avec une résolution d'une centaine de micromètres, il semble nécessaire de trouver un compromis entre les dimensions de l'objet et ses propriétés mécaniques, de manière à ce que l'hydrogel se tienne, tout en évitant la réticulation périphérique.

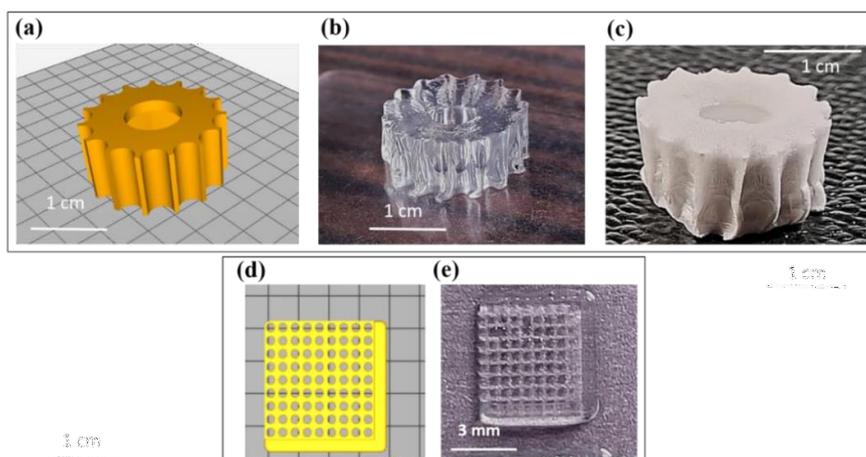


Figure V-10 : (a) Modèle CAO de l'engrenage de 22,97 mm de diamètre extérieur et de 11,00 mm de hauteur à imprimer avec la formulation FA2 contenant une concentration de 2 %m de mCMC ($DM = 34\%$) et 0,15 %m de LAP. (b) Hydrogel imprimé sous la forme d'un engrenage avec une épaisseur de couche en Z de 500 μm et une durée d'insolation de 5 s pour la première couche puis de 4 s pour les couches suivantes, et (c) cryogel correspondant. (d) Modèle CAO d'une grille plate de dimensions 5,4x5,4x0,81 mm^3 ($L \times l \times h$), et présentant 81 canaux de 340 μm de diamètre et des épaisseurs de parois de 200 μm , à imprimer avec la formulation FA2. (e) Hydrogel imprimé sous la forme de grille avec une épaisseur de couche en Z de 500 μm et une durée d'insolation de 5 s pour la première couche puis de 4 s pour les couches suivantes.

Mellili *et al.* ont imprimé des hydrogels avec une imprimante DLP de même modèle que celle utilisée dans ces travaux de thèse, à partir d'une formulation aqueuse contenant 2 % mde mCMC présentant un DM de 60 %, ainsi que du LAP comme photo-amorceur à une concentration de 0,04 % m [8]. Curieusement, l'irradiance reportée pour ces impressions est de 30 mW/cm², soit plus que ce que peut fournir la DLP pour laquelle l'irradiance maximale est de 22,5 mW/cm². Dans leurs travaux, l'épaisseur de couche paramétrée est de 50 µm et la durée d'insolation n'est pas mentionnée car elle est variable. Les hydrogels imprimés présentent une résolution supérieure à 1 mm car les couches subissent une surexposition. En revanche, la résolution obtenue avec les hydrogels de mCMC (85 µm) dans ce travail est comparable à celles obtenue par DLP pour des hydrogels d'acide hyaluronique thiol-norbornène (100 µm) ou de chitosane méthacrylate (50 µm) [4,6].

V.3.2. RÉOLUTION DANS LA DIRECTION Z

Comme observé par Mellili *et al.*, la difficulté réside dans la capacité à pouvoir imprimer des hydrogels avec des cavités dans la direction de l'axe Z, à partir d'une formulation majoritairement composée d'eau et sans photo-absorbeur [8]. En effet, sans ajout de photo-absorbeur, le faisceau UV traverse toute la formulation et polymérise les parties normalement vides. Le défi est de trouver un objet permettant d'obtenir une cavité tout en conservant la structure du modèle. Pour le vérifier, un parallélépipède possédant une cavité a été imprimé dans différentes dimensions (**Figure V-11a**). Plusieurs contraintes apparaissent alors.

(1) Si la partie supérieure du parallélépipède est trop épaisse, la polymérisation périphérique dans l'axe Z entraîne l'obturation de la cavité.

(2) Si la partie supérieure du parallélépipède est trop fine (**Figure V-11a**), il n'y a pas suffisamment de couches imprimées pour que la paroi supérieure se tienne. Il faut donc des parois hautes et trouver un compromis sur l'épaisseur de la paroi supérieure pour éviter la réticulation périphérique, tout en présentant des propriétés mécaniques suffisantes.

(3) De plus, si les parois dans l'axe Z sont trop hautes, l'hydrogel s'effondre. Il faut donc trouver une largeur suffisante pour ces parois, qui permettent de maintenir la forme de l'hydrogel imprimé.

(4) Cependant, les dimensions de la cavité en X et Y doivent être suffisantes pour éviter que la polymérisation périphérique ne referme la cavité (**Figure V-11b**).

En somme, le dimensionnement de la pièce est difficile pour imprimer un hydrogel qui se tient et qui possède une cavité perpendiculaire à l'axe Z. L'impression de scaffold par DLP n'est pas donc pas possible à partir de la formulation FA2. Une concentration en mCMC plus importante pourrait améliorer la résistance mécanique de la partie supérieure du parallélépipède, afin que l'hydrogel ne s'écroule pas. Cependant, la résolution en Z pourrait ne

pas être améliorée puisqu'il a été montré qu'une augmentation de la concentration en mCMC conduit à des épaisseurs de couches plus importantes (**Figure V-7**).

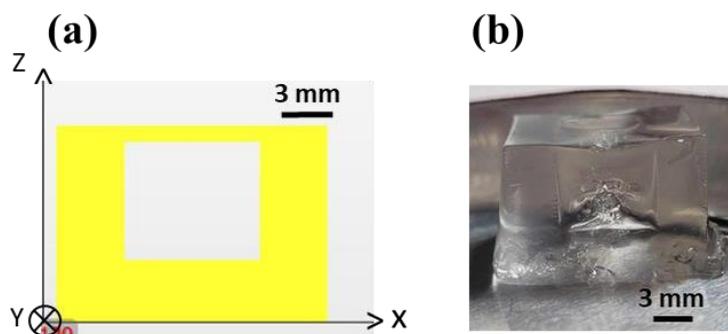


Figure V-11 : (a) Modèle CAO du parallélépipède de dimensions $10,13 \times 15,10 \times 15,00 \text{ mm}^3$ ($L \times l \times h$) à imprimer avec une formulation de FA2 contenant 2 %m de mCMC ($DM = 34 \%$) et 0,15 %m de LAP. (b) Hydrogel imprimé sous la forme d'un parallélépipède avec une épaisseur de couche de $500 \mu\text{m}$ et une durée d'insolation de 5 s pour la première couche puis de 4 s pour les couches suivantes.

L'ajout d'un photo-absorbeur, absorbant à la longueur d'onde d'insolation, peut être envisagé afin d'améliorer la résolution dans la direction Z et la complexité de pièces imprimées par DLP [23], en réduisant la profondeur de pénétration des UV dans la résine. Actuellement, les photo-absorbeurs hydrosolubles, absorbant dans la gamme de longueurs d'onde visée, sont toxiques ou suspectés de l'être. C'est notamment le cas de certains colorants alimentaires comme la tartrazine [24,25]. Ces photo-absorbeurs ne peuvent donc pas être utilisés pour des applications médicales, pour lesquelles il est nécessaire de disposer de photo-absorbeurs biocompatibles. Dans ce contexte, Mellili *et al.* ont remplacé l'eau de leur formulation de mCMC par un milieu de culture cellulaire absorbant à 385 nm [8]. Des hydrogels creux et mieux résolus ont pu être imprimés par DLP à partir de cette nouvelle formulation. En revanche, les gels obtenus ont une résistance mécanique plus faible que les hydrogels imprimés dans l'eau. Des nanocristaux de cellulose (NCC) ont donc été intégrés dans la formulation pour renforcer mécaniquement les hydrogels imprimés. En revanche, les NCC peuvent diffuser les faisceaux UV et limiter la résolution. Un photo-absorbeur « vert brillant » a été ajouté dans la formulation. Cependant, ce photo-absorbeur n'est pas biocompatible et ne peut donc pas être utilisé pour l'impression 3D d'hydrogels destinés à des applications biomédicales [26].

Lors de ces travaux de thèse, une molécule naturelle, biocompatible, soluble dans l'eau et qui absorbe dans l'UV, et notamment à 365 et 385 nm a été utilisée. Cette molécule a été envisagée comme photo-absorbeur pour la première fois dans une formulation photo-réticulable pour la fabrication additive de type « vat-photopolymerisation ». Elle a été ajoutée dans une formulation contenant 2 %m de mCMC ($DM = 34 \%$) et 0,15 %m de LAP et/ou 0,5 %m de NCC. **Ces travaux font l'objet d'une demande de brevet et ne seront donc pas développés dans ce chapitre.**

V.4. PROPRIÉTÉS D'HYDROGELS IMPRIMÉS PAR DLP

Cette section se concentrera sur l'étude des caractéristiques des hydrogels fabriqués à partir de la formulation contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) et 0,15 %m de LAP. Tous les hydrogels sont imprimés avec une épaisseur totale de 4 mm et un diamètre de 15 mm. La première couche est de 500 μm .

V.4.1. PROPRIÉTÉS VISCOÉLASTIQUES ET EFFET DU POST-TRAITEMENT UV

Les propriétés viscoélastiques des hydrogels imprimés par DLP avec différentes épaisseurs de couches ont été étudiés. La réduction de l'épaisseur de chaque couche entraîne une augmentation du nombre de couches, étant donné que l'épaisseur des hydrogels reste constante (cf. section II.3.4). Les épaisseurs de couches choisies sont de 100, 250 et 500 μm , ce qui correspond respectivement à des durées d'insolation totales de 145, 61 et 33 s. Ces valeurs d'épaisseur impliquent d'imprimer 36, 15 et 8 couches, respectivement. L'évolution des modules de conservation (G') et de perte (G'') en cisaillement des différents hydrogels, sur l'ensemble de la gamme de fréquences étudiées (0,1 à 10 Hz), à 1 % de déformation et à 25 °C, est reportée dans la **Figure V-12** et les $\tan(\delta)$ associés en **Annexe V-7**. Quel que soit l'hydrogel considéré, G' est toujours supérieur à G'' , ce qui traduit un comportement majoritairement solide élastique des hydrogels. Il est intéressant de noter que le classement des modules G' et G'' est identique en fonction du nombre et de l'épaisseur des couches insolées et du post-traitement. Par conséquent, la comparaison des propriétés rhéologiques des hydrogels a été effectuée en considérant uniquement G' (**Figure V-12a**). La même étude pourrait être effectuée avec G'' pour le comportement visqueux.

Tout d'abord, le module élastique G' augmente avec le nombre de couches sur la gamme de fréquences étudiées (0,1 à 10 Hz) (**Figure V-12a**). Par exemple, pour une fréquence de sollicitation de 1 Hz, des modules élastiques G' de 737 ± 336 Pa, 2351 ± 306 Pa et 4085 ± 442 Pa ont été mesurés pour les hydrogels constitués respectivement de 8, 15 et 36 couches. Cela peut être expliqué par l'augmentation du temps de réticulation total induit par la diminution de l'épaisseur de couche et donc une potentielle augmentation du taux de réticulation. De plus, tous les hydrogels imprimés ont été isolés 3 minutes aux UV à 6 mW/cm² pour terminer la réticulation. Ce temps a été déterminé en considérant qu'après 3 minutes, le module élastique G' des hydrogels imprimés en plusieurs couches n'évolue pas et donc que la conversion maximale des groupements méthacrylates est atteinte (**Figure V-12a**). Ceci a été vérifié en faisant subir une post-réticulation de 10 minutes à un hydrogel imprimé en 15 couches. Ce dernier à un module élastique $G'_{(1\text{ Hz})}$ de 5856 ± 398 Pa, alors qu'après 3 minutes, $G'_{(1\text{ Hz})}$ est de 5597 ± 891 Pa. De même, les modules élastiques G' obtenus après 3 minutes de post traitement pour les hydrogels imprimés en 8, 15 et 36 couches atteignent la même valeur.

En effet, dans ces conditions, les hydrogels ont respectivement un module élastique G' de 5726 ± 874 Pa pour 8 couches, de 5597 ± 891 Pa pour 15 couches et de 5934 ± 513 Pa pour 36 couches. Notons cependant qu'il n'a pas été vérifié si un temps de post-réticulation plus faible pouvait suffire. Ces résultats montrent que le module élastique G' des hydrogels ne dépend pas du nombre de couches lorsqu'ils ont subi un post-traitement suffisant pour atteindre le taux de réticulation maximal.

Il est difficile de comparer les résultats obtenus avec ceux répertoriés dans la littérature car les protocoles de mesures sont différents et aucune étude n'a comparé les valeurs des modules pour un même hydrogel avec deux protocoles différents. Cependant, il est tout de même possible de positionner ces hydrogels vis-à-vis de certaines applications. Ainsi, après post-traitement, les hydrogels imprimés pourraient être considérés pour une utilisation en tant que matrice extracellulaire (MEC) pour la réparation des tissus mous, tels que le cerveau, le foie ou la moelle [17].

Dans la suite, seuls les hydrogels imprimés avec 15 couches et ayant subi un post-traitement aux UV de 3 minutes sont étudiés étant donné que le post-traitement homogénéise les modules G' et G'' indépendamment du nombre de couches.

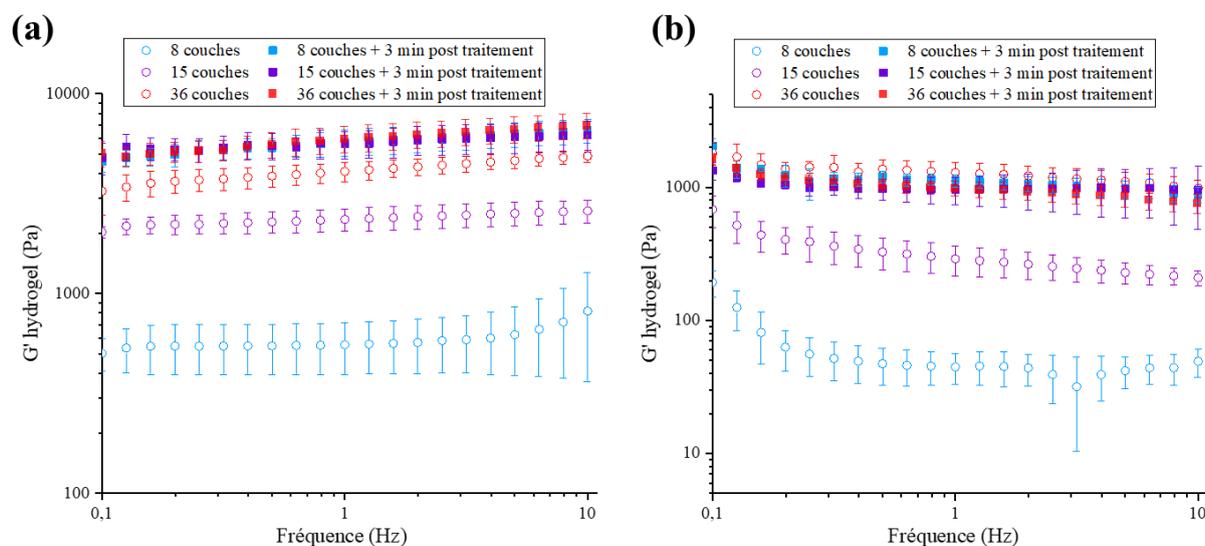


Figure V-12 : Modules de conservation (G') (a) et de perte (G'') (b) en cisaillement, mesurés entre 0,1 et 10 Hz et à 1 % de déformation à 25 °C, pour des hydrogels de 4 mm d'épaisseur imprimés à partir de la formulation FA2 avec des durées d'insolation de 5 s pour la première couche et 4 s pour les couches suivantes, et des épaisseurs de 500 μm pour la première couche et de 500 μm (8 couches), 250 μm (15 couches) et 100 μm (36 couches) pour les couches suivantes, respectivement, avant et après un post-traitement de 3 min aux UV (365 nm + 405 nm, 6 mW/cm²).

V.4.2. PROPRIÉTÉS EN MILIEU PHYSIOLOGIQUE

Les comportements des hydrogels imprimés par DLP et des cryogels correspondants ont été étudiés dans un milieu physiologique (PBS, 37 °C). À cette fin, les taux de gonflement et les propriétés viscoélastiques des hydrogels dans ces conditions ont été comparés avec ceux obtenus dans l'eau. Par ailleurs, la dégradation des cryogels au moyen de cellulases a été étudiée.

V.4.2.1. Taux de gonflement et propriétés viscoélastiques

Lors de la lyophilisation, les hydrogels imprimés transformés en cryogel conservent leurs dimensions (cf. V.3.1). La taille moyenne des pores observés par MEB pour un cryogel obtenu à partir d'une formulation FA2, contenant 2 %m de mCMC avec un DM de 34 % et 0,15 %m de LAP, est de $25,5 \pm 8,83 \mu\text{m}$ (**Figure V-13**). Dans l'objectif de développer des matériaux permettant la croissance cellulaire pour la réparation de tissus biologiques, cette taille moyenne de pores n'est pas adaptée et devrait être autour de 100 – 200 μm [18,19].

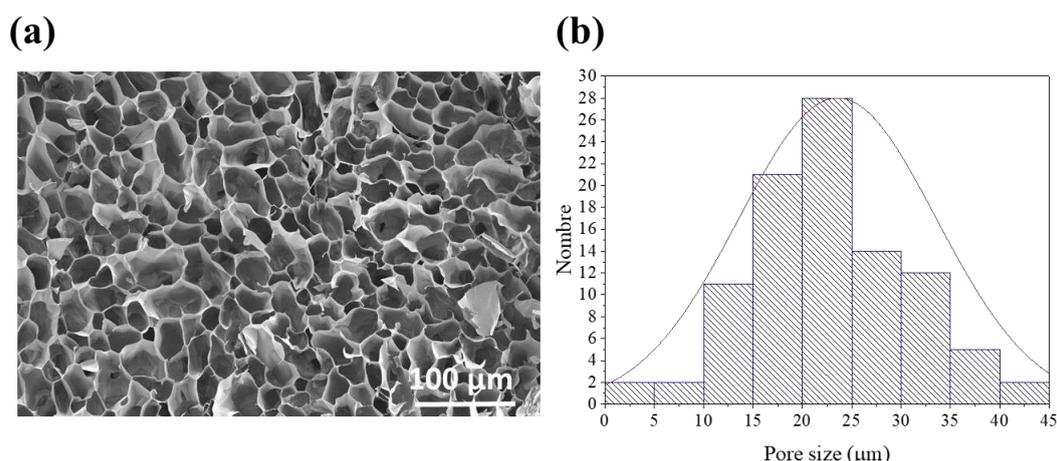


Figure V-13 : (a) Image MEB d'un cryogel obtenu par lyophilisation d'un hydrogel imprimé à partir d'une formulation aqueuse FA2, contenant 2 %m de mCMC avec un DM de 34% et 0,15 %m de LAP. (b) Distribution de taille des pores correspondante. La taille moyenne des pores a été déterminée à partir de 100 mesures réalisées sur 4 images différentes. Les pores dont les parois ont été brisées durant la préparation de l'échantillon n'ont pas été pris en compte. Les cryogels sont issus d'hydrogels imprimés avec des couches de 250 μm insolées 4 s (500 μm et 5 s la première) puis passés 3 min en post-traitement aux UV.

Dans le cas d'une application biologique, les tests présentés dans cette partie doivent être réalisés dans le PBS à 37 °C. Cette solution tampon est utilisée dans de nombreux protocoles expérimentaux pour reproduire les conditions du milieu physiologique. Ces conditions font référence à l'environnement chimique et physique dans lequel les cellules et les tissus d'un organisme fonctionnent normalement. Il s'agit d'un ensemble de paramètres tels que la température, le pH, les concentrations en sels et en nutriments, qui sont optimaux pour le bon fonctionnement des processus biologiques. La solution tampon PBS a ainsi été formulée de

manière à imiter les conditions du milieu physiologique, en maintenant un pH stable autour de 7,4 et des concentrations en sels inorganiques similaires à celles présentes dans l'organisme. Cela permet de préserver l'intégrité des échantillons biologiques lors des expériences, en évitant les variations brutales de conditions environnementales qui pourraient altérer les résultats.

Tout d'abord, les hydrogels après impression ont été placés dans une solution tampon de PBS à 37 °C de manière à remplacer progressivement l'eau par le PBS. L'évolution du taux de gonflement de l'hydrogel dans ce milieu est alors suivi et comparé à celui dans l'eau déionisée (**Figure V-14**). Ce suivi est réalisé sur plusieurs jours afin de se rapprocher des conditions d'utilisation d'hydrogels dans des applications biomédicales implantables.

De façon intéressante, sur toute la durée de l'expérience, le gonflement de l'hydrogel dans l'eau est supérieur à celui de l'hydrogel dans le PBS (**Figure V-14**). Dans les deux cas, l'équilibre de gonflement est atteint quelques minutes après leur introduction dans leur milieu respectif, jusqu'à atteindre des taux de gonflement de $2,02 \pm 0,11$ et $1,06 \pm 0,040$ respectivement dans l'eau et le PBS (**Figure V-14a**). De façon intéressante, les hydrogels imprimés gonflent peu dans les conditions physiologiques et conservent donc leur forme initiale contrairement à lorsqu'ils sont immergés dans l'eau. Cette différence de gonflement peut s'expliquer par un écrantage possible des chaînes de mCMC dans le milieu salin PBS limitant l'étirement du réseau et donc le gonflement. En revanche, lorsque l'hydrogel est immergé dans l'eau, les chaînes de mCMC attirent et retiennent les molécules d'eau par des interactions hydrophiles. Cela entraîne un gonflement plus important de l'hydrogel, augmentant son volume. De plus, un équilibre osmotique peut avoir lieu entre le PBS contenant des ions et l'eau contenue dans l'hydrogel et le milieu de gonflement. Enfin les hydrogels immergés dans l'eau gonflant plus que ceux immergés dans le PBS, ils sont mécaniquement moins robustes et donc plus difficiles à manipuler.

Des mesures rhéologiques ont été réalisées sur les hydrogels gonflés et à l'équilibre dans le PBS à 37 °C (**Annexe V-8**). Ces hydrogels ont été sollicités en cisaillement, durant un balayage en fréquences (de 0,1 à 10 Hz) à 1% de déformation et à 37 °C. Aucune différence n'est observable sur les modules de conservation G' par rapport à ceux de l'hydrogel après impression. Par exemple, à 1 Hz, des modules élastiques G' de $5,6 \pm 0,89$ kPa et de $5,2 \pm 0,085$ kPa ont en effet été mesurés pour l'hydrogel avant et après gonflement dans le PBS, respectivement. L'hydrogel inséré dans des conditions physiologiques conserve donc la même forme ainsi que des propriétés viscoélastiques équivalentes à celles mesurées après l'étape d'impression. Ces résultats sont essentiels pour envisager une utilisation d'hydrogels de mCMC directement après impression par DLP, pour la réparation de tissus biologiques ou de délivrance de principes actifs par exemples.

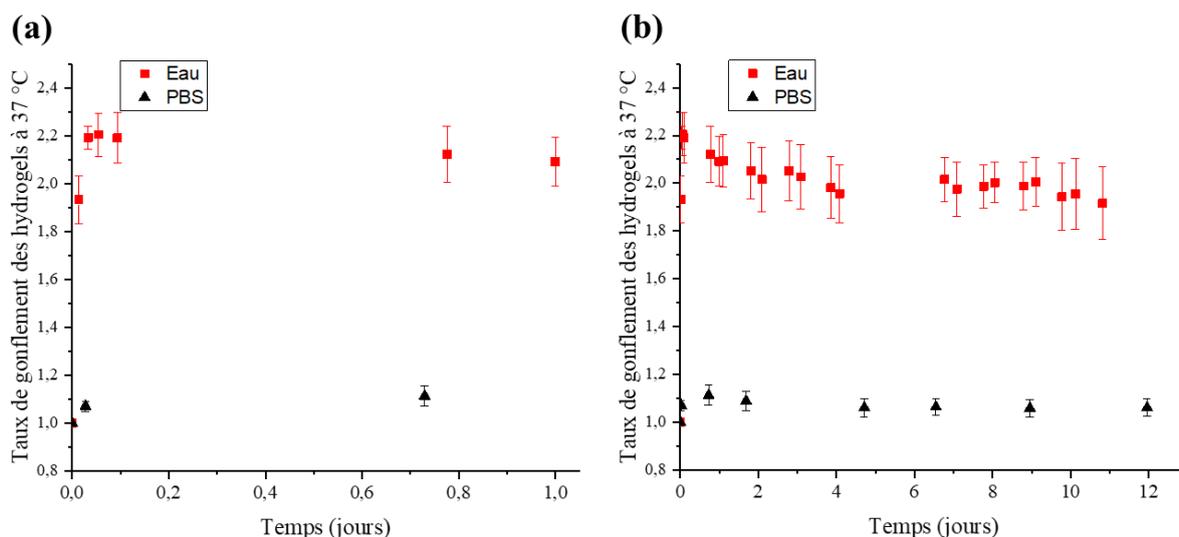


Figure V-14 : Evolution du taux de gonflement des hydrogels en fonction des temps d'immersion courts (a) et longs (b) dans l'eau et le PBS à 37 °C, pour des hydrogels imprimés par DLP avec des épaisseurs de couches de 500 μm pour la première couche puis 250 μm pour les couches suivantes, et des durées d'insolation de 5 s pour la première couche et de 4 s pour les couches suivantes et post-réticulés 3 min dans une enceinte UV, à partir d'une formulation FA2, contenant une concentration de 2 %m de mCMC (DM = 34 %) et 0,15 %m de LAP.

Pour conserver l'hydrogel imprimé avant son utilisation, il peut être nécessaire de le lyophiliser, le cryogel étant plus stable. Cela nécessite toutefois de pouvoir contrôler le gonflement du cryogel, pour retrouver idéalement les dimensions et les propriétés de l'hydrogel initial. L'évolution du taux de gonflement des cryogels en milieu physiologique et dans l'eau déionisée à 37 °C, a donc été étudiée (**Figure V-15**). Tout d'abord, contrairement au gonflement des hydrogels, celui des cryogels est plus important dans le PBS que dans l'eau sur tout l'intervalle de temps. Enfin, l'équilibre de gonflement est atteint plus rapidement dans le PBS que dans l'eau. En effet, l'équilibre est atteint après 24 h dans le PBS ($Q_m = 33,9 \pm 0,52$) et est atteint entre 3 et 7 jours dans l'eau ($Q_m = 32,0 \pm 0,75$). Ceci est potentiellement dû à la présence de sels tels que le phosphate et le chlorure dans le PBS. Ces ions peuvent interagir avec les groupements carboxylates présents dans l'hydrogel de mCMC, ce qui peut faciliter l'absorption d'eau sur les parois des pores de l'hydrogel et accélérer le gonflement.

Il est intéressant de noter que le gonflement du cryogel dans l'eau à 37 °C permet de retrouver à l'équilibre, une quantité en eau et un volume équivalents à ceux de l'hydrogel initial. En effet, un rapport massique de $31,9 \pm 0,45$ entre l'hydrogel initial et le cryogel, et un taux de gonflement du cryogel dans l'eau de $32,0 \pm 0,75$, ont ainsi été mesurés. De même, aucune différence n'est observée entre le gonflement des hydrogels et des cryogels dans le cas du gonflement dans le PBS. En effet, le rapport massique entre l'hydrogel gonflé et le cryogel est de $33,8 \pm 0,47$ alors qu'il est de $33,9 \pm 0,52$ entre le cryogel hydraté et le cryogel. Dans tous les cas, à l'équilibre, les cryogels réhydratés retrouvent ainsi un volume d'eau équivalent à celui présent dans l'hydrogel initial après impression.

Enfin, la cinétique de gonflement des cryogels est plus rapide dans le PBS potentiellement du fait de la présence de sels tels que le phosphate et le chlorure. Ces ions peuvent interagir avec les groupements carboxylates présents dans l'hydrogel de CMC, ce qui peut faciliter l'absorption d'eau sur les parois des pores de l'hydrogel et accélérer le gonflement.

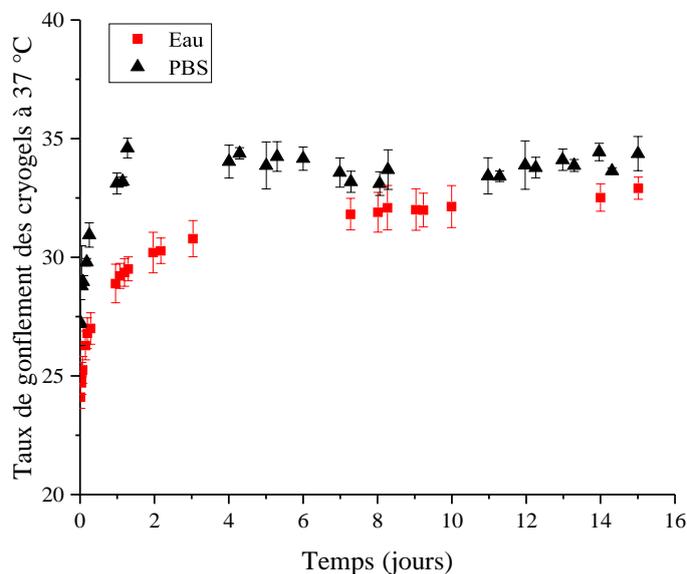


Figure V-15 : Evolution du taux de gonflement des cryogels en fonction de la durée d'immersion dans l'eau ou le PBS à 37 °C, pour des cryogels issus d'hydrogels imprimés par DLP avec des couches de 250 μm insolées 4 s (500 μm et 5 s la première) puis post-réticulés 3 min, à partir d'une formulation FA2 contenant une concentration de 2 %m de mCMC (DM = 34 %) et 0,15 %m de LAP.

V.4.2.2. Dégradation enzymatique

Au cours de la croissance cellulaire sur la structure tridimensionnelle d'un hydrogel de mCMC, celui-ci doit progressivement se résorber pour laisser sa place au tissu en croissance. Or, la cellulose et la CMC sont acceptés par le corps humain, mais ne sont pas résorbés. Pour cela, il est nécessaire d'apporter une enzyme permettant la dégradation de ce matériau [20,21]. Les cellulases de *Trichoderma reesei* sont des enzymes produites par le champignon filamentaire du même nom, qui sont largement utilisées pour la dégradation de la carboxyméthylcellulose [22]. En effet, la CMC est un dérivé de la cellulose couramment utilisé en tant que substrat modèle pour évaluer l'activité des enzymes [23]. De plus, *Trichoderma reesei* est particulièrement connu pour sa production abondante de cellulases, ce qui en fait une source précieuse pour les applications industrielles de dégradation de la CMC [24]. Les cellulases de *Trichoderma reesei* comprennent plusieurs types d'enzymes, dont des endoglucanases, des exoglucanases et des β -glucosidases [25]. Les endoglucanases sont responsables de la rupture des liaisons internes dans les chaînes de cellulose, tandis que les exoglucanases clivent les molécules de cellulose à partir des extrémités. Les β -glucosidases jouent ensuite un rôle dans la conversion des produits de dégradation en glucose.

Tout d'abord, la dégradation de cryogels en présence de cellulases de *Trichoderma* a été étudiée dans un milieu physiologique (PBS) à 37 °C. Ces essais ont été réalisés sur cryogels car ils sont plus résistants et plus faciles à manipuler que les hydrogels. L'évolution de la masse des cryogels hydratés est ainsi suivie lors de leur gonflement en fonction du temps d'immersion dans des solutions contenant différentes concentrations de cellulases, comprises entre 0 et 1 U/ml (**Figure V-16a**). De façon intéressante, la masse des matériaux est plus élevée dans un milieu contenant des cellulases que dans le PBS pur. Il est possible d'expliquer ce phénomène par la dégradation de la structure du cryogel qui devient moins rigide et plus étirable. Le cryogel en cours de dégradation est alors capable d'absorber un volume plus important (**Figure V-16b**). Ce gonflement est d'autant plus important que la concentration en cellulases augmente. De même, au fur et à mesure de sa dégradation, le cryogel hydraté devient de plus en plus difficile à manipuler, ce qui explique les incertitudes conséquentes sur les masses pesées. Avec une concentration de 1 U/mL de cellulases, la structure des cryogels est dégradée en moins de 48 h (**Figure V-16b**), alors que 15 jours sont nécessaires pour les dégrader entièrement avec une concentration de 0,2 U/mL. Après 20 jours, les cryogels hydratés sont toujours uniformes avec une concentration en cellulases de 0,05 U/mL.

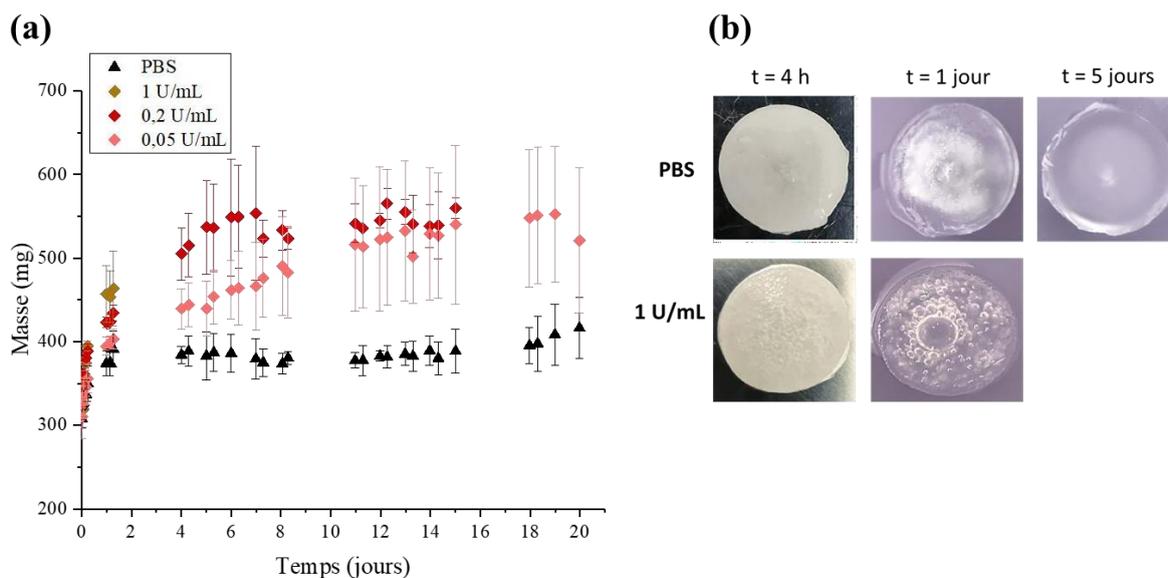


Figure V-16 : (a) Evolution de la masse des cryogels en fonction du temps d'immersion dans des solutions de cellulases dans le PBS à 37 °C avec des concentrations de 0, 0,2, 0,5 et 1 U/mL. Les cryogels sont issus d'hydrogels imprimés avec des couches de 250 μm insolées 4 s (500 μm et 5 s la première) puis passés 3 min en post-traitement aux UV, à partir d'une formulation FA2, contenant une concentration de 2 %m de mCMC (DM = 34 %) et 0,15 %m de LAP. (b) Morphologie des cryogels hydratés après immersion dans le PBS et dans une solution de cellulase à 1 U/mL en fonction du temps.

En somme, ces résultats prouvent que la dégradation des matériaux imprimés est possible en milieu physiologique, lorsque des cellulases sont présentes en concentration suffisante. Afin d'apporter la capacité à être biodégradé à un hydrogel implantable, plusieurs possibilités peuvent être envisagées. La première consiste à greffer des enzymes sur les

fonctions de la mCMC réticulées (hydroxyles, carboxylates, méthacrylates libres) par des liaisons covalentes réversibles, par exemple par des réactions de Diels-Alder [26]. Cette technique permettrait de libérer de manière contrôlée les enzymes, sous l'action de la température. Cependant, la température à fixer pour relarguer les enzymes pourrait ne pas être supportée par le corps (> 60 °C) et pourrait impacter négativement l'activité de la cellulase dont l'activité diminue drastiquement avec l'augmentation de la température [27,28]. De plus, le nombre de groupements disponibles sur les cellulases pouvant permettre la fonctionnalisation, estimés à seulement 10 amines primaires portées par les lysines présentes dans une molécule de cellulase de *Trichoderma Ressei*, n'est pas suffisamment important pour réaliser une fonctionnalisation.

L'encapsulation des cellulases dans une matrice polyester biocompatible (e.g. PCL) greffée ensuite sur le cryogel, pourrait également permettre d'introduire les cellulases dans le matériau. La libération de l'enzyme pourrait ensuite se faire par hydrolyse de l'encapsulant dans le milieu biologique [29].

V.5. IMPRESSION D'HYDROGELS DE MCMC PAR P2P

Etant donné que la taille des pores des matériaux imprimés est trop faible pour permettre la croissance cellulaire et que la DLP ne permet pas d'imprimer des hydrogels sous la forme des *scaffolds* à partir des formulations développées, la fabrication additive par photopolymérisation à deux photons (P2P) a été envisagée. Cette technique utilise un faisceau lumineux de longueur d'onde 532 nm. A cette longueur d'onde, la polymérisation n'est amorcée qu'au niveau du point focal. La P2P utilisée, développée par Microlight3D, permet d'obtenir une résolution spatiale maximale de 0,2 μm , permettant de fabriquer des structures avec une architecture précise et contrôlée, essentielle pour certaines applications biomédicales [30]. Dans ce paragraphe, la P2P a donc été envisagée pour améliorer la résolution des hydrogels, dans le but d'imprimer des *scaffolds* avec des dimensions compatibles avec des applications nécessitant une croissance cellulaire. Les formulations testées avec cette méthode d'impression sont mentionnées dans le **Tableau V-3**.

Les premiers essais ont été réalisés à partir de formulations contenant 2, 3 ou 4 %m de mCMC avec un DM de 34 %, ainsi que du LAP comme photo-amorceur à 0,15, 0,22 et 0,31 %m. Cependant, aucune polymérisation n'a été observée dans les conditions d'impression utilisées (**Tableau V-3**). Afin de favoriser la polymérisation, il est nécessaire d'augmenter la puissance lumineuse ou de diminuer la vitesse de polymérisation. Cependant, en augmentant le temps et la puissance reçue par la résine, une dégradation de celle-ci est observée et s'accompagne de la formation de bulles correspondant à une ébullition locale. Ce phénomène, qui existe pour toutes les formulations photo-réliculables, est appelé le « seuil de dommage » de la résine. En revanche, dans le cas des formulations de mCMC étudiées, aucune polymérisation n'est observée avant d'atteindre ce seuil. Deux paramètres peuvent expliquer l'apparition précoce du seuil de dommage. La faible concentration en groupements méthacrylates dans les formulations constituées d'une grande quantité d'eau (95,69 – 97,85 %m) peut d'abord rendre la réticulation difficile dans le volume du voxel. Le choix du LAP comme photo-amorceur peut également être mis en cause. En effet, au point focal, l'énergie reçue par la formulation dans le voxel correspond à une longueur d'onde de 266 nm. A cette longueur d'onde, le LAP est en limite d'absorbance, et nécessiterait donc un gain laser plus important pour amorcer une polymérisation des méthacrylates. En revanche, l'I2959 absorbe davantage que le LAP à cette longueur d'onde, et pourrait permettre d'amorcer la polymérisation avec un gain laser plus faible que le seuil de dommage des formulations [7].

Des formulations équivalentes ont donc été testées en utilisant l'I2959 comme photoinitiateur (**Tableau V-3**). La première formulation contenant 2 %m de mCMC ne polymérise pas, probablement car la concentration en méthacrylates est trop faible. Pour la formulation

contenant 3 %m de mCMC, il est possible d'observer une légère polymérisation, en fonction des paramètres utilisés (**Tableau V-3**). Cependant, celle-ci est insuffisante pour imprimer des objets complexes. Enfin, pour la formulation contenant 4 %m de mCMC, il est possible d'obtenir une polymérisation convenable entre le seuil de polymérisation et le seuil de dommage, en fonction de la durée d'insolation. Cependant, la polymérisation n'est pas suffisante pour obtenir une tenue mécanique suffisante de l'hydrogel imprimé. Pour améliorer les propriétés mécaniques des hydrogels imprimés par P2P, la concentration en groupements méthacrylates nécessite donc d'être augmentée. Une formulation contenant 4 %m de mCMC avec un DM de 50 % est donc utilisée dans la suite des essais.

Tableau V-3 : Composition des formulations de mCMC contenant de l'I2959 ou du LAP comme photo-initiateur, utilisées lors des essais d'impression par P2P.

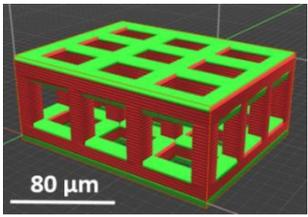
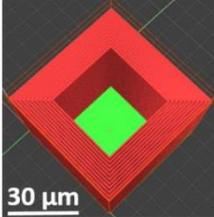
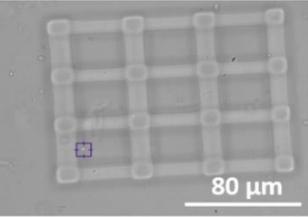
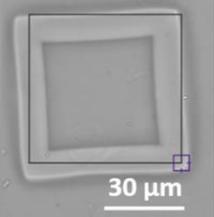
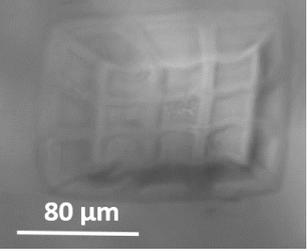
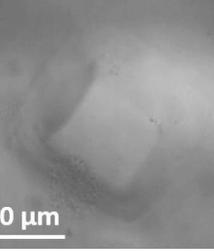
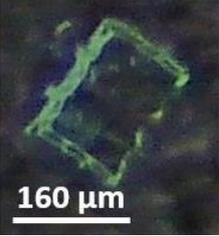
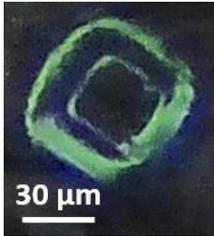
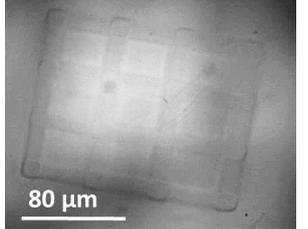
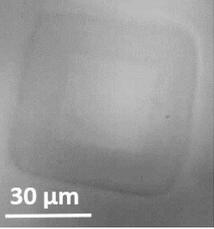
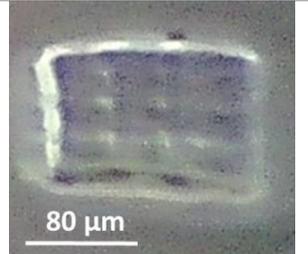
Formulation	mCMC		Photo-amorceur		Impression	
	DM (%)	Concentration (%m)	Nom	Concentration (%m)	Puissance (mW) / vitesse ($\mu\text{m/s}$)	Polymérisation
FA2	34	2	LAP	0,15	11 / 187,5	Non
FA3		3		0,22	7,2 / 93,8	
FA4		4		0,31	6,7 / 37,5 6,7 / 18,7	
A2	34	2	I2959	0,12	9,7 / 187,5 9,7 / 84	Non
A3		3		0,18	9,1 / 187,5 8,6 / 94 8,6 / 37	Faible
A4		4		0,25	4 / 187,5 4,5 / 187,5 5 / 187,5	Insuffisante pour un hydrogel stable
B4	50	4	I2959	0,41	4 / 187,5	Oui

Deux modèles représentant une grille de dimensions $160 \times 120 \times 60 \mu\text{m}^3$ (L x l x h) et un puits de dimensions $50 \times 50 \times 50 \mu\text{m}^3$ (L x l x h) ont été sélectionnés pour définir les paramètres d'impression et évaluer la résolution qu'il serait possible d'obtenir pour des hydrogels mécaniquement stables (**Tableau V-4**). Comme les *scaffolds*, les puits pourraient trouver des applications dans le domaine biomédical. Ils pourraient par exemple être utilisés pour encapsuler des cellules ou des particules spécifiques.

Tout d'abord, la polymérisation est possible avec la formulation sélectionnée (**Tableau V-4**). Les hydrogels imprimés sont bien définis sans défaut de forme, malgré un léger effet de bord observable sur le puits. En revanche, le développement des hydrogels s'accompagnent de plusieurs difficultés. L'étape de développement consiste à récupérer l'hydrogel et éliminer le surplus de formulation non réticulée. Le lavage est fait dans le PBS afin d'éviter le gonflement de l'hydrogel imprimé et de conserver les propriétés mécaniques et la stabilité de la structure. Le séchage du PBS restant s'accompagne ensuite d'une

déshydratation de l'hydrogel de petites dimensions, qui fait s'effondrer la structure sur elle-même. A ce stade, l'hydrogel est donc moins bien défini et difficile à caractériser. Afin d'éviter ce phénomène, après déshydratation, les objets ont été réhydratés avec du PBS. Cependant, lors du séchage, des liaisons intermoléculaires supplémentaires, telles que des liaisons hydrogène, des liaisons ioniques ou des interactions hydrophobes peuvent être créées entre les chaînes de mCMC. Ces nouvelles liaisons peuvent modifier la structure de l'hydrogel de manière irréversible, ce qui rend difficile le retour de l'hydrogel à sa forme initiale lors de sa réhydratation avec du PBS. Afin d'éviter la déshydratation de l'hydrogel pendant le séchage, une autre procédure consistant à éliminer délicatement l'excès de PBS avec du papier absorbant tout en évitant la déshydratation, a été envisagée. Cette méthode nécessite donc d'être minutieux. Néanmoins, elle permet de conserver la structure imprimée, après l'étape de développement. En revanche, les microscopes utilisés pour observer les hydrogels et prendre les photos ne le permettent pas lors de l'inclinaison du support. L'hydrogel étant constitué d'eau à 95,59 %m, il est quasiment transparent lorsque la lumière se propage à travers les hydrogels dans une direction spécifique. Pour pallier ce problème, il est envisagé d'ajouter dans le PBS un colorant lors du lavage post-polymérisation. En utilisant un colorant alimentaire vert, il est possible d'observer l'hydrogel incliné et de visualiser les faces latérales du *scaffold*. Néanmoins, la qualité de l'image demeure insuffisante. Il pourrait être envisagé de sécher l'hydrogel par lyophilisation ou par séchage par CO₂ supercritique pour ensuite observer la structure par MEB. Toutefois, cette démarche n'a pas été entreprise en raison de contraintes temporelles et des éventuelles difficultés qui pourraient surgir, telles que le transport de l'hydrogel sans altération, le séchage sans modification ou fracturation de la structure, ainsi que les défis associés à la métallisation et à la fixation.

Tableau V-4 : Modèles CAO et photographies d'hydrogels imprimés avec une puissance de 4 mW et une vitesse de 187,5 $\mu\text{m/s}$, sous la forme de scaffolds ou de puits par P2P à partir de la formulation B4 contenant 4 %m de mCMC (DM = 50 %) et 0,4 %m d'I2959 comme photo-amorceur, prises à l'aide de différents équipements de microscopie, directement après impression et après diverses méthodes de développement. Le modèle CAO du scaffold a des dimensions de $160 \times 120 \times 60 \mu\text{m}^3$ (L x lx h) et celui du puits de $50 \times 50 \times 50 \mu\text{m}^3$ (L x lx h).

Etapes	Scaffold	Puits	Equipement utilisé
Modèle CAO			Logiciel Simpoly
Après impression			Microscope inverse Objectif à air 0,8 NA X20 (Olympus)
Etape de développement après le rinçage dans le PBS			
Séchage à l'air			Dino-lite (ref RS AM4815ZTL) Grossissement x232.9
Séchage à l'air puis réhydratation			Microscope digital numérique sans oculaire (RYECOCAM)
Séchage au papier			Dino-lite (ref RS AM4815ZTL) Grossissement x232.9
Lavage au colorant		n.d.	Microscope digital numérique sans oculaire (RYECOCAM)

Les structures obtenues possèdent des cavités de l'ordre de 30 μm pour le *scaffold* et de 60 μm pour le puit, correspondant aux dimensions des modèles CAO. La taille des parois (10 μm) du *scaffold* sont de l'ordre de la résolution obtenus avec des hydrogels constitués d'AH ou de pullulane (5 μm) et le chitosane (10 μm) imprimés par P2P [2,3,31]. En revanche, la plupart des cellules des tissus présentant des dimensions de l'ordre de la centaine de micromètres il faudrait optimiser les dimensions de ces structures pour s'approcher d'un *scaffold* idéal à la croissance cellulaire ou à l'encapsulation de cellules [18,19]. Enfin, comme cela a été réalisé avec la DLP, il serait intéressant d'étudier les dimensions minimales d'un hydrogel imprimé par P2P.

Les hydrogels imprimés n'ont pas été caractérisés mécaniquement, mais il est possible que leurs propriétés soient différentes des propriétés mesurées dans le chapitre III pour des formulations équivalentes, car les paramètres de polymérisation sont différents. En effet, la longueur d'onde utilisée dans le cas de la P2P est de 532 nm, ce qui équivaut à un amorçage de la polymérisation réalisé à 266 nm, correspondant à l'absorbance maximale de l'I2959. De même, la réticulation des hydrogels imprimés par P2P est plus homogène, que dans le cas d'hydrogels obtenus en une seule insolation, ce qui permet d'envisager des propriétés homogènes dans toute la structure de l'hydrogel. Il serait envisageable de quantifier le degré de réticulation des cryogels correspondants grâce à la spectroscopie RMN ^{13}C CP-MAS du solide. De plus, la fabrication de pièces de plus grande taille pourrait être entreprise pour caractériser leurs propriétés viscoélastiques et leur comportement de gonflement. Enfin, des évaluations de cytotoxicité pourraient être réalisées sur les échafaudages imprimés, en ajustant leurs cavités à la taille appropriée.

V.6. CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, le LAP a été sélectionné pour remplacer l'I2959 comme photo-initiateur dans les formulations de mCMC, de manière à pouvoir imprimer des hydrogels avec la DLP Asiga MAX fonctionnant à une longueur d'onde de 385 nm. Dans un premier temps, l'influence de la nature du photo-amorceur sur les propriétés des hydrogels obtenus en une seule couche d'insolation, et dans les conditions optimales pour chaque photo-amorceur (longueur d'onde et durée d'insolation), a été étudiée. Contrairement à ce qui a été démontré dans la section II.4.2, les hydrogels de mCMC formés par initiation du LAP possèdent un module élastique G' qui diminue avec le degré de méthacrylation (DM). En revanche, comme pour les hydrogels initiés avec l'I2959, le module élastique semble augmenter avec la concentration. Enfin, le temps de gélification obtenu est plus faible dans le cas d'un amorçage au LAP ($t_{gel} = 2,7 \pm 0,10$ s). Cela permettrait d'accélérer l'impression de chaque couche et par conséquent l'impression d'hydrogels, par rapport à un amorçage réalisé avec l'I2959 ($t_{gel} = 22 \pm 1$ s).

La formulation FA2, contenant 2 %m de mCMC (DM = 34 %) a été choisie pour la fabrication additive d'hydrogels par DLP. Les essais d'impression ont montré que les géométries d'hydrogels imprimables avec cette technique et cette formulation sont limitées. En effet, la polymérisation périphérique est un problème majeur, notamment lorsque les couches successives sont de même surface. Les objets possédant la meilleure résolution en X et Y (85 μm) sont donc majoritairement coniques ou avec un nombre de pentes maximisés. Cependant, la formulation étant constituée d'eau à plus de 97 %m, le faisceau UV traverse les différentes couches déjà formées lors de l'impression d'une nouvelle couche. La résolution en Z est donc insuffisante pour imprimer des hydrogels possédant des cavités perpendiculaires à l'axe Z.

Après leur introduction dans du PBS à 37 °C, les hydrogels maintiennent leur structure sans afficher de gonflement notable, préservant ainsi les valeurs des modules élastiques et visqueux. D'autre part, les cryogels immergés dans ce même environnement retrouvent un niveau de gonflement comparable à celui de l'hydrogel initial, réabsorbant une quantité similaire de PBS. Notamment, ces cryogels démontrent la capacité de dégradation par des cellulases sous des conditions physiologiques. En apportant ces enzymes sur le matériau, puis en les libérant de manière contrôlée, il serait donc possible d'amorcer la résorption du matériau.

Afin d'apporter plus de précision et notamment dans le but de fabriquer des *scaffolds*, la P2P a été utilisée sur une formulation contenant 4 %m de mCMC (DM = 50 %). Des objets possédant une résolution de 10 μm ont pu être obtenus permettant d'envisager la conception d'échafaudages aux structures contrôlées et précises.

RÉFÉRENCES

1. Li, J.; Wu, C.; Chu, P.K.; Gelinsky, M. 3D Printing of Hydrogels: Rational Design Strategies and Emerging Biomedical Applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2020**, *140*, 100543, doi:10.1016/j.mser.2020.100543.
2. Kufelt, O.; El-Tamer, A.; Sehring, C.; Schlie-Wolter, S.; Chichkov, B.N. Hyaluronic Acid Based Materials for Scaffolding via Two-Photon Polymerization. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 650–659, doi:10.1021/bm401712q.
3. Kufelt, O.; El-Tamer, A.; Sehring, C.; Meißner, M.; Schlie-Wolter, S.; Chichkov, B.N. Water-Soluble Photopolymerizable Chitosan Hydrogels for Biofabrication via Two-Photon Polymerization. *Acta Biomaterialia* **2015**, *18*, 186–195, doi:10.1016/j.actbio.2015.02.025.
4. Shen, Y.; Tang, H.; Huang, X.; Hang, R.; Zhang, X.; Wang, Y.; Yao, X. DLP Printing Photocurable Chitosan to Build Bio-Constructs for Tissue Engineering. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *235*, 115970, doi:10.1016/j.carbpol.2020.115970.
5. Feng, Z.; Li, J.; Zhou, D.; Song, H.; Lv, J.; Bai, W. A Novel Photocurable Pullulan-Based Bioink for Digital Light Processing 3D Printing. *Int J Bioprint* **2022**, *9*, doi:10.18063/ijb.v9i2.657.
6. Galarraga, J.H.; Dhand, A.P.; Enzmann, B.P.; Burdick, J.A. Synthesis, Characterization, and Digital Light Processing of a Hydrolytically Degradable Hyaluronic Acid Hydrogel. *Biomacromolecules* **2023**, *24*, 413–425, doi:10.1021/acs.biomac.2c01218.
7. Tomal, W.; Ortyl, J. Water-Soluble Photoinitiators in Biomedical Applications. *Polymers* **2020**, *12*, 1073, doi:10.3390/polym12051073.
8. Melilli, G.; Carmagnola, I.; Tonda-Turo, C.; Pirri, F.; Ciardelli, G.; Sangermano, M.; Hakkarainen, M.; Chiappone, A. DLP 3D Printing Meets Lignocellulosic Biopolymers: Carboxymethyl Cellulose Inks for 3D Biocompatible Hydrogels. *Polymers* **2020**, *12*, 1655, doi:10.3390/polym12081655.
9. Cafiso, D.; Septevani, A.A.; Noè, C.; Schiller, T.; Pirri, C.F.; Roppolo, I.; Chiappone, A. 3D Printing of Fully Cellulose-Based Hydrogels by Digital Light Processing. *Sustainable Materials and Technologies* **2022**, *32*, e00444, doi:10.1016/j.susmat.2022.e00444.
10. Hossen, M.R.; Dadoo, N.; Holomakoff, D.G.; Co, A.; Gramlich, W.M.; Mason, M.D. Wet Stable and Mechanically Robust Cellulose Nanofibrils (CNF) Based Hydrogel. *Polymer* **2018**, *151*, 231–241, doi:10.1016/j.polymer.2018.07.016.
11. Flory, P.J.; Rehner, J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks. 9.
12. Ganji, F.; Vasheghani-Farahani, S.; Vasheghani-Farahani, E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iranian Polymer Journal* **2010**, *5*, 375–398.
13. Pagac, M.; Hajnys, J.; Ma, Q.-P.; Jancar, L.; Jansa, J.; Stefek, P.; Mesicek, J. A Review of Vat Photopolymerization Technology: Materials, Applications, Challenges, and Future Trends of 3D Printing. *Polymers* **2021**, *13*, 598, doi:10.3390/polym13040598.
14. Murphy, C.M.; Haugh, M.G.; O'Brien, F.J. The Effect of Mean Pore Size on Cell Attachment, Proliferation and Migration in Collagen–Glycosaminoglycan Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2010**, *31*, 461–466, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.063.
15. Han, Y.; Lian, M.; Wu, Q.; Qiao, Z.; Sun, B.; Dai, K. Effect of Pore Size on Cell Behavior Using Melt Electrowritten Scaffolds. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 629270, doi:10.3389/fbioe.2021.629270.
16. Murphy, C.M.; O'Brien, F.J. Understanding the Effect of Mean Pore Size on Cell Activity in Collagen-Glycosaminoglycan Scaffolds. *Cell Adhesion & Migration* **2010**, *4*, 377–381, doi:10.4161/cam.4.3.11747.
17. Chaudhuri, O.; Cooper-White, J.; Janmey, P.A.; Mooney, D.J.; Shenoy, V.B. Effects of Extracellular Matrix Viscoelasticity on Cellular Behaviour. *Nature* **2020**, *584*, 535–546, doi:10.1038/s41586-020-2612-2.

18. Abbasi, N.; Hamlet, S.; Love, R.M.; Nguyen, N.-T. Porous Scaffolds for Bone Regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* **2020**, *5*, 1–9, doi:10.1016/j.jsamd.2020.01.007.
19. Sindhu, K.A.; Prasanth, R.; Thakur, V.K. Medical Applications of Cellulose and Its Derivatives: Present and Future. In *Nanocellulose Polymer Nanocomposites*; Thakur, V.K., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2014; pp. 437–477 ISBN 978-1-118-87224-6.
20. BÃ©guin, P.; Aubert, J.-P. The Biological Degradation of Cellulose. *FEMS Microbiology Reviews* **1994**, *13*, 25–58, doi:10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x.
21. Sannino, A.; Demitri, C.; Madaghiele, M. Biodegradable Cellulose-Based Hydrogels: Design and Applications. *Materials* **2009**, *2*, 353–373, doi:10.3390/ma2020353.
22. Karlsson, J.; Momcilovic, D.; Wittgren, B.; Schülein, M.; Tjerneld, F.; Brinkmalm, G. Enzymatic Degradation of Carboxymethyl Cellulose Hydrolyzed by the Endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola Insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from *Trichoderma Reesei*: Enzymatic Degradation of Carboxymethyl Cellulose. *Biopolymers* **2002**, *63*, 32–40, doi:10.1002/bip.1060.
23. Reese, E.T.; Mandels, M. Stability of the Cellulase Of *Trichoderma Reesei* under Use Conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **1980**, *22*, 323–335, doi:10.1002/bit.260220207.
24. Schülein, M. Cellulases of *Trichoderma Reesei*. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1988; Vol. 160, pp. 234–242 ISBN 978-0-12-182061-9.
25. Lakhundi, S.; Siddiqui, R.; Khan, N.A. Cellulose Degradation: A Therapeutic Strategy in the Improved Treatment of *Acanthamoeba* Infections. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 23, doi:10.1186/s13071-015-0642-7.
26. Kiely-Collins, H.; Winter, G.E.; Bernardes, G.J.L. The Role of Reversible and Irreversible Covalent Chemistry in Targeted Protein Degradation. *Cell Chemical Biology* **2021**, *28*, 952–968, doi:10.1016/j.chembiol.2021.03.005.
27. Fujisawa, N.; Takanohashi, M.; Chen, L.; Uto, K.; Matsumoto, Y.; Takeuchi, M.; Ebara, M. A Diels-Alder Polymer Platform for Thermally Enhanced Drug Release toward Efficient Local Cancer Chemotherapy. *Science and Technology of Advanced Materials* **2021**, *22*, 522–531, doi:10.1080/14686996.2021.1939152.
28. Bilgin, R.; Yalcin, M.S.; Yildirim, D. Optimization of Covalent Immobilization of *Trichoderma Reesei* Cellulase onto Modified ReliZyme HA403 and Sepabeads EC-EP Supports for Cellulose Hydrolysis, in Buffer and Ionic Liquids/Buffer Media. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2016**, *44*, 1276–1284, doi:10.3109/21691401.2015.1024842.
29. Singh, S.; Singh, A.N.; Verma, A.; Dubey, V.K. Biodegradable Polycaprolactone (PCL) Nanosphere Encapsulating Superoxide Dismutase and Catalase Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* **2013**, *171*, 1545–1558, doi:10.1007/s12010-013-0427-4.
30. Jing, X.; Fu, H.; Yu, B.; Sun, M.; Wang, L. Two-Photon Polymerization for 3D Biomedical Scaffolds: Overview and Updates. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 994355, doi:10.3389/fbioe.2022.994355.
31. Della Giustina, G.; Gandin, A.; Brigo, L.; Panciera, T.; Giulitti, S.; Sgarbossa, P.; D'Alessandro, D.; Trombi, L.; Danti, S.; Brusatin, G. Polysaccharide Hydrogels for Multiscale 3D Printing of Pullulan Scaffolds. *Materials & Design* **2019**, *165*, 107566, doi:10.1016/j.matdes.2018.107566.

Conclusion générale

Depuis une vingtaine d'années, les **hydrogels** sont de plus en plus étudiés pour leur utilisation dans des applications biomédicales. Cependant, leur structure est souvent grossière et non adaptée à la morphologie particulière de certains tissus biologiques. Dans ce contexte, les hydrogels imprimés en 3D se développent de manière croissante, notamment à partir de polysaccharides biocompatibles voire biorésorbables. En particulier, la **carboxyméthylcellulose** (CMC), dérivé hydrophile de la cellulose est un des polymères naturels les plus étudiés dans le domaine du biomédical [1]. Cependant, sa mise en œuvre sous forme d'hydrogel par fabrication additive reste encore à explorer.

Dans ce contexte, cette thèse a apporté une contribution significative à la compréhension et à l'amélioration de la formation d'hydrogels de CMC par fabrication additive de type "*vat photopolymerization*", en particulier grâce à l'utilisation de la technologie de digital light processing (DLP) et de la polymérisation à deux photons (P2P). Pour cela, la méthacrylation de la CMC a été rigoureusement étudiée et a permis d'obtenir une carboxyméthylcellulose méthacrylate (mCMC) avec un degré de méthacrylation maximum (DM) de 76 %, supérieur aux valeurs reportées dans la littérature. Le développement de différentes formulations aqueuses de mCMC, en faisant varier à la fois le DM et la concentration de mCMC, a permis de mettre en lumière des relations entre la structure et les propriétés viscoélastiques et physico-chimiques des hydrogels obtenus après photo-réticulation sous rayonnement UV, ainsi que des cryogels obtenus par lyophilisation. Une méthode originale basée sur la résonance magnétique nucléaire du carbone du solide par polarisation croisée et rotation à l'angle magique (RMN ^{13}C CP-MAS) a été mise au point pour calculer la densité de méthacrylates réticulés et libres à la fin de la réaction de photo-réticulation. Il a été démontré que l'augmentation de la densité de nœuds de réticulation est accompagnée d'une diminution du taux de gonflement. De plus, il a été constaté que ce paramètre n'est pas le facteur le plus influant sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels de mCMC, celles-ci étant principalement influencées par la concentration en polymère. Enfin, le processus de lyophilisation entraîne une agrégation des chaînes de mCMC, conduisant également à un élargissement des parois des pores dans la structure du cryogel, ce qui rend la structure hydratée plus résistante que celle des hydrogels initiaux. Les différentes propriétés obtenues permettent d'envisager les hydrogels pour des applications telles que la délivrance de principes actifs ou la réparation de tissus biologiques mous comme les poumons ou le cerveau.

Dans le but de renforcer les hydrogels, des nanocristaux de cellulose (NCC) ont été incorporés dans une formulation de mCMC. Parallèlement, les NCC ont été fonctionnalisés en

suivant le même protocole d'estérification que celui utilisé pour la mCMC, marquant ainsi une première dans la littérature où cette méthode est présentée en détail. Des NCC méthacrylates (mNCC) obtenus avec un DM de 0,83 % ont été ajoutés à la formulation de mCMC pour participer au réseau réticulé et renforcer la structure 3D. L'ajout de NCC a entraîné une diminution significative du taux de conversion des méthacrylates et de la densité de réticulation, tandis que l'effet inverse s'est produit avec l'ajout de mNCC, démontrant ainsi leur participation au réseau de réticulation. Par conséquent, la viscoélasticité des hydrogels après gonflement est presque préservée en présence des mNCC en comparaison aux hydrogels initiaux. Au contraire, les NCC ne participant pas dans le réseau tridimensionnel, diffusent au cours du temps et sont éliminés de l'hydrogel, limitant ainsi la durabilité du renforcement initial. De plus, l'incorporation de mNCC permet non seulement d'améliorer de manière significative la durée nécessaire pour former un hydrogel, mais également de réduire l'épaisseur de la couche réticulée. Ces deux propriétés sont des paramètres essentiels dans le contexte de la fabrication additive par DLP. Cependant, l'intégration des nanocristaux conduit à une augmentation des phénomènes de diffusion du faisceau UV, et donc à un contrôle difficile des dimensions des hydrogels à imprimer. Enfin, des études de cytotoxicité ont démontré la viabilité des cellules (fibroblastes L929) sur les cryogels, et aucune cytotoxicité n'a été détectée, répondant ainsi à l'un des critères essentiels de biocompatibilité. Cependant, la taille des pores des matériaux obtenus, qui est d'environ 20 μm , ne permet pas une adhésion et une croissance cellulaires suffisantes, nécessitant généralement des pores d'une centaine de micromètres. Pour pallier cette limitation, il a été envisagé d'imprimer une structure en échafaudage par DLP ou P2P afin de fournir un environnement plus propice à l'adhésion et à la croissance des cellules.

Dans ce contexte, des hydrogels de mCMC ont été imprimés par DLP. Cependant, en raison de leur composition majoritairement aqueuse, les hydrogels pouvant être obtenus avec une faible résolution sont principalement de forme conique. En effet, il a été observé un phénomène de réticulation périphérique lorsque les différentes couches imprimées ont une surface identique. D'autre part, la résolution minimale obtenue dans les directions X et Y est de 84,9 μm , se rapprochant ainsi de la taille d'un pixel de l'imprimante DLP utilisée (62 μm). Cette résolution représente un résultat cinq fois plus fin que ce qui avait été précédemment rapporté dans la littérature pour des hydrogels à base de mCMC. Néanmoins, en raison de la diffusion du faisceau UV à travers la formulation aqueuse, il n'est pas possible de réaliser des objets creux dans la direction Z. Afin de parvenir à la fabrication d'une structure de type échafaudage, essentielle pour permettre la croissance cellulaire, une approche de fabrication additive par P2P a été explorée pour la première fois dans la littérature en utilisant de la CMC. Ces essais ont été effectués avec succès en collaboration avec la société Microlight3D, permettant d'atteindre une résolution d'environ 10 μm dans les directions X, Y et Z. Enfin, les objets imprimés par DLP présentent l'avantage de ne pas gonfler dans un milieu physiologique tel que le PBS, tout en

conservant les mêmes propriétés rhéologiques que l'hydrogel initial. De plus, ces hydrogels se révèlent biodégradables en présence de cellulases dans des conditions physiologiques, ce qui ouvre la voie à la possibilité de favoriser la résorption *in vivo* et contrôlée du matériau lors de la croissance du tissu. Cette caractéristique est prometteuse pour des applications biomédicales visant à soutenir la régénération tissulaire.

Pour compléter ces travaux et démontrer les hypothèses faites sur les applications possibles des matériaux développés, des tests de relargage de différentes molécules devraient permettre de valider la possibilité d'applications pour la délivrance de principes actifs. De même, il faudrait étudier l'adhésion et la croissance de certaines cellules en modifiant la structure et les dimensions des *scaffolds* imprimés par P2P. De manière générale, des tests complémentaires de propriétés mécaniques par compression des hydrogels et cryogels pourraient consolider les résultats obtenus en rhéologie. De plus, des études complémentaires pourraient être réalisées sur la synthèse des mNCC de manière à ce qu'ils impactent de manière significative les propriétés des hydrogels de mCMC. De plus, des études complémentaires pourraient être réalisées sur la synthèse des mNCC de façon à modifier significativement les propriétés des hydrogels de mCMC.

Enfin, pour approfondir l'étude et engager une discussion générale et actuelle, il serait pertinent de réaliser des études sur la biodégradabilité en milieu naturel ainsi qu'une analyse du cycle de vie (ACV). En effet, dans le contexte écologique actuel, la production croissante de matériaux biosourcés en remplacement des matériaux pétrosourcés présente de nombreux avantages [2,3]. Tout d'abord, les matériaux issus de ressources renouvelables offrent une diversité favorisant la résilience et la durabilité. Différentes plantes, cultures ou déchets organiques peuvent servir de base à leur production, réduisant la dépendance aux ressources épuisables et permettant la diminution de l'empreinte carbone, notamment dans le domaine du bâtiment ou du packaging [4,5]. Dans certains cas, ils peuvent également être recyclables, biodégradables ou compostables, favorisant ainsi une économie circulaire sans causer de dommages significatifs à l'environnement, réduisant la quantité de déchets, minimisant l'accumulation dans les sites d'enfouissement et préservant les écosystèmes [6–8]. Enfin, le remplacement des matériaux pétrosourcés par des matériaux biosourcés stimule l'innovation et le développement technologique [9,10]. En effet, les chercheurs et les industriels s'engagent dans le développement de nouvelles sources et dans l'amélioration des performances de ces matériaux.

Cependant, l'adoption généralisée de ces matériaux requiert des ajustements au niveau des chaînes d'approvisionnement, des processus de fabrication et des normes de qualité, tout en

évaluant l'impact environnemental global, comprenant leur cycle de vie complet. Les matériaux biosourcés peuvent présenter certaines limitations en termes de performances et de propriétés par rapport aux polymères pétrosourcés, qui offrent une polyvalence étendue en matière de propriétés mécaniques, chimiques et physiques. Afin de combler ces écarts de performance, des modifications et des améliorations technologiques supplémentaires provenant de sources pétrosourcées peuvent être nécessaires [11,12]. En conséquence, tous les matériaux biosourcés modifiés ne sont pas biodégradables ou recyclables [6,7,13,14]. Cependant, des progrès continus sont réalisés dans le développement de matériaux issus de ressources renouvelables, et de nouvelles techniques et innovations peuvent atténuer certaines de ces limitations.

Il est essentiel de souligner qu'une augmentation significative de la demande mondiale d'«éco matériaux » nécessiterait une évaluation minutieuse de ces facteurs afin de garantir une transition durable et responsable vers leur utilisation à grande échelle. Cela impliquerait la mise en place de réglementations appropriées et la promotion d'une gestion responsable des ressources, afin de maximiser les avantages tout en minimisant les impacts négatifs sur l'environnement et les écosystèmes [15]. En effet, une demande croissante pourrait entraîner une utilisation accrue des terres, de l'eau, une déforestation ou une concurrence avec la production alimentaire [16–18]. En conclusion, l'utilisation de matériaux biosourcés présente des avantages significatifs, mais leur adoption à grande échelle nécessite une approche prudente et une gestion responsable. Pour cela, l'étude de l'ACV est essentielle afin de privilégier le recyclage et la réutilisation plutôt que la production graduelle de matériaux « neufs ».

Dans ce contexte, l'utilisation de la fabrication additive telle qu'elle est employée dans cette thèse représente une perspective intéressante pour éviter la production de masse [19]. Bien que cette méthode présente certains inconvénients, tels que la modification potentielle des matériaux biosourcés et un coût de fabrication souvent plus élevé par rapport à une production classique industrielle, elle offre la possibilité d'élaborer des structures complexes et des géométries non réalisables par d'autres méthodes de fabrication traditionnelles couramment utilisées telles que l'extrusion, l'injection ou le moulage [20]. De plus, dans le processus de production additive, seuls les matériaux nécessaires sont utilisés pour créer un objet. Cela permet de réduire la perte de matière première, ce qui est un avantage considérable. L'impression 3D peut aussi permettre la production locale à l'unité évitant l'empreinte carbone liée au transport et au volume d'espace correspondant au stockage des pièces.

Pour terminer de manière humoristique, il semblerait que Baloo, le sage ours du Livre de la Jungle, avait anticipé bien à l'avance la pertinence du sujet de cette thèse (**Figure C-1**) [21]. Tout en fredonnant joyeusement « il en faut peu pour être heureux, il faut se satisfaire du nécessaire. Un peu d'eau fraîche et de verdure que nous prodigue la nature, quelques rayons de miel et de soleil », il semblait prévoir l'avenir des matériaux celluloseux se transformant en hydrogels sous l'exposition aux rayons UV, tels que ceux élaborés dans ce travail de recherche.



Figure C-1 : Transmission du savoir de Baloo à Lénéaïc [21].

1. Rahman, Md.S.; Hasan, Md.S.; Nitai, A.S.; Nam, S.; Karmakar, A.K.; Ahsan, Md.S.; Shiddiky, M.J.A.; Ahmed, M.B. Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose. *Polymers* **2021**, *13*, 1345, doi:10.3390/polym13081345.
2. Yu, X. Bio-Based Polymers: A Mini Review.
3. Koczoń, P.; Bartyzel, B.; Iuliano, A.; Klensporf-Pawlik, D.; Kowalska, D.; Majewska, E.; Tarnowska, K.; Zieniuk, B.; Gruczyńska-Sękowska, E. Chemical Structures, Properties, and Applications of Selected Crude Oil-Based and Bio-Based Polymers. *Polymers* **2022**, *14*, 5551, doi:10.3390/polym14245551.
4. Anissa Ben Yahmed Neutralité carbone dans la construction : Les atouts des matériaux biosourcés Available online: <https://www.cerema.fr/fr/actualites/neutralite-carbone-construction-atouts-materiaux-biosources> (accessed on 23 June 2023).
5. Porta, R.; Sabbah, M.; Di Piero, P. Bio-Based Materials for Packaging. *IJMS* **2022**, *23*, 3611, doi:10.3390/ijms23073611.
6. Rosenboom, J.-G.; Langer, R.; Traverso, G. Bioplastics for a Circular Economy. *Nat Rev Mater* **2022**, *7*, 117–137, doi:10.1038/s41578-021-00407-8.
7. Kumar, R.; Sadeghi, K.; Jang, J.; Seo, J. Mechanical, Chemical, and Bio-Recycling of Biodegradable Plastics: A Review. *Science of The Total Environment* **2023**, *882*, 163446, doi:10.1016/j.scitotenv.2023.163446.
8. Hatti-Kaul, R.; Nilsson, L.J.; Zhang, B.; Rehnberg, N.; Lundmark, S. Designing Biobased Recyclable Polymers for Plastics. *Trends in Biotechnology* **2020**, *38*, 50–67, doi:10.1016/j.tibtech.2019.04.011.

9. Des biomatériaux avancés qui offrent de grandes possibilités pour les dispositifs médicaux de nouvelle génération Available online: <https://ville.montreal.qc.ca/idmtl/des-biomateriaux-avances-qui-offrent-de-grandes-possibilites-pour-les-dispositifs-medicaux-de-nouvelle-generation/> (accessed on 23 June 2023).
10. Maastricht University, Netherlands; van der Meer, Y. Sustainable Bio-Based Materials: Opportunities and Challenges. In Proceedings of the Biotech France 2017 Conference Proceedings; SETCOR Conferences and Events, November 1 2017; pp. 2–6.
11. Mekonnen, T.; Mussone, P.; Khalil, H.; Bressler, D. Progress in Bio-Based Plastics and Plasticizing Modifications. *J. Mater. Chem. A* **2013**, *1*, 13379, doi:10.1039/c3ta12555f.
12. Wu, G.; Li, P.; Feng, H.; Zhang, X.; Chu, P.K. Engineering and Functionalization of Biomaterials via Surface Modification. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 2024–2042, doi:10.1039/C4TB01934B.
13. Foroughi, F.; Rezvani Ghomi, E.; Morshedi Dehaghi, F.; Borayek, R.; Ramakrishna, S. A Review on the Life Cycle Assessment of Cellulose: From Properties to the Potential of Making It a Low Carbon Material. *Materials* **2021**, *14*, 714, doi:10.3390/ma14040714.
14. Avérous, L. Les polymères biodégradables et biosourcés. *L'actualité chimique* **2013**, 83–90.
15. *Usages de Matières Plastiques Biosourcées, Biodégradables et Compostables*; ANSES, 2022; pp. 1–84;.
16. Gibigaye, D.M. OROU N'GOBI Bio Monti Sika. **2015**.
17. Cheneval, E.; Adam-Poupart, A.; Zayed, J. La crise alimentaire, le développement durable et les biocarburants : perspectives d'avenir. *vertigo* **2011**, doi:10.4000/vertigo.10734.
18. Emma Haziza Crise de l'eau, planète terre invivable ? Emma Haziza 2022.
19. Javaid, M.; Haleem, A.; Singh, R.P.; Suman, R.; Rab, S. Role of Additive Manufacturing Applications towards Environmental Sustainability. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research* **2021**, *4*, 312–322, doi:10.1016/j.aiepr.2021.07.005.
20. Attaran, M. The Rise of 3-D Printing: The Advantages of Additive Manufacturing over Traditional Manufacturing. *Business Horizons* **2017**, *60*, 677–688, doi:10.1016/j.bushor.2017.05.011.
21. Reitherman, W. Le Livre de La Jungle. *Studios Disney* **1967**.

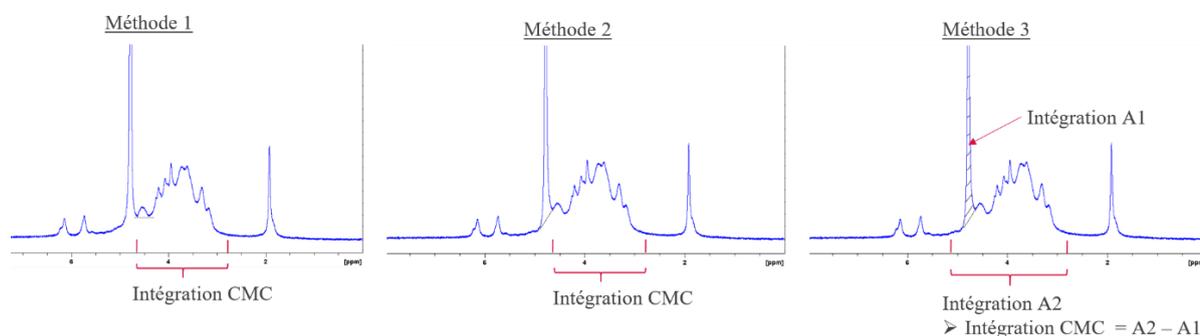
ANNEXES

Annexes chapitre II

Annexe II-1 : Tableau indiquant la densité de pastilles de CMC et mCMC et leur masse molaire calculée à partir de leur DM.

Echantillon	Densité (g/cm³)	M_w (g/mol)
CMC	1,618	90 500
mCMC 34 %	1,475	99 481
mCMC 50 %	1,423	104 314
mCMC 76 %	1,415	110 757

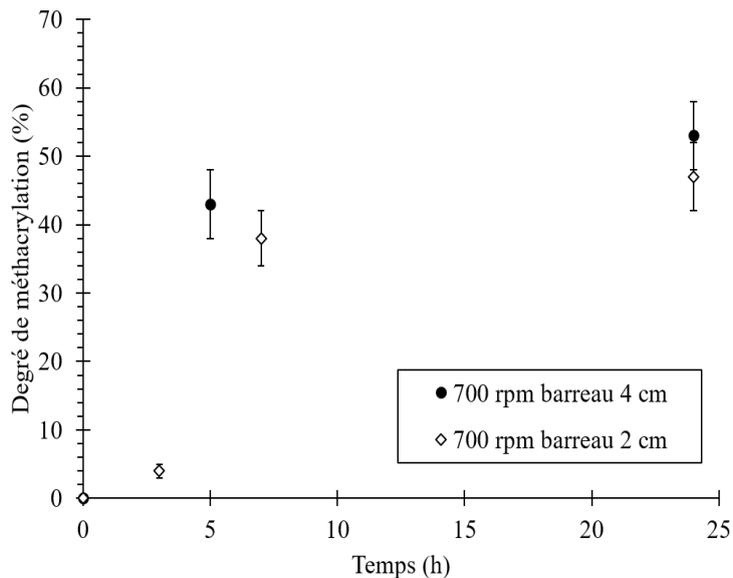
Annexes chapitre III



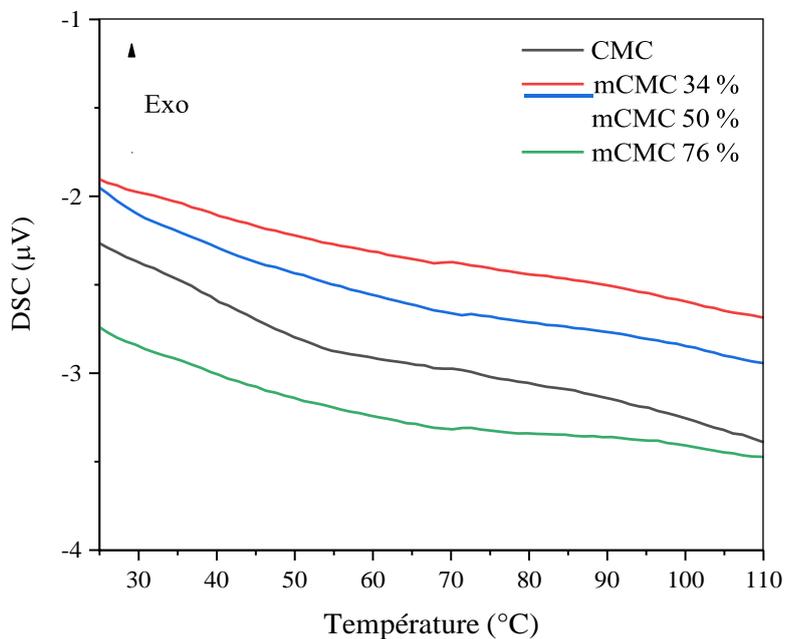
Neq AM/OH	Degré de méthacrylation (%)			DM moyen (%)	Incertitude moyenne (%)
	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3		
1,24	17	14	16	16	4
2,48	31	29	29	29	4
3,72	41	36	39	39	5
4,96	49	44	46	46	5

Annexe III-1 : Intégration des protons de la CMC à partir des spectres RMN ^1H du liquide et tableau des DM obtenus avec les différentes méthodes d'intégration pour des synthèses réalisées à 25 °C et avec différents nombres d'équivalents en AM par groupements hydroxyles de la CMC.

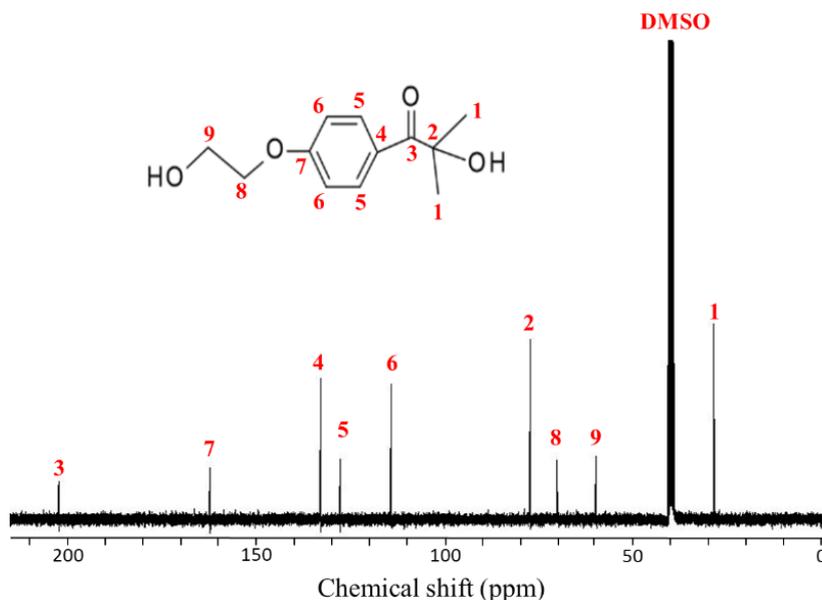
Différentes méthodes d'intégration des protons de la CMC ont été investiguées pour déterminer le DM des mCMC (**Annexe III-1**). Ces derniers intégrant dans un massif où le signal du H_2O est présent, il est difficile de quantifier l'importance de ce signal dans l'intégration. Les deux premières méthodes consistent en un ajustement de la phase du spectre et à une intégration entre 2,8 et 4,7 ppm. La méthode 3 consiste à intégrer le signal majoritaire du D_2O et à le soustraire du signal compris entre 2,7 et 5,2 ppm. Ces méthodes d'intégration ont donné des valeurs de DM proches, mais aucune des méthodes semble être la plus plausible. La méthode 3 semble être la méthode correspondant à la moyenne des méthodes 1 et 2. L'intégration correspond donc à la moyenne des trois méthodes. Les incertitudes présentées sur les valeurs du DM prennent en compte ces méthodes d'intégration.



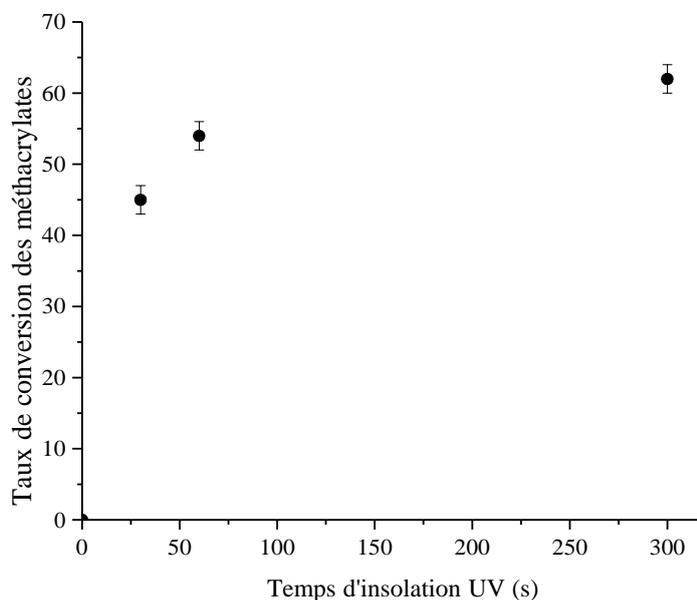
Annexe III-2 : Evolution du DM des mCMC en fonction du temps de réaction avec une agitation magnétique et pour barreaux de 2 cm et de 4 cm. La réaction se déroule à 700 rpm dans un même bécher, pour même volume de réaction (100 mL) et le $N_{eq} AM/OH_{CMC}$ est de 4,96.



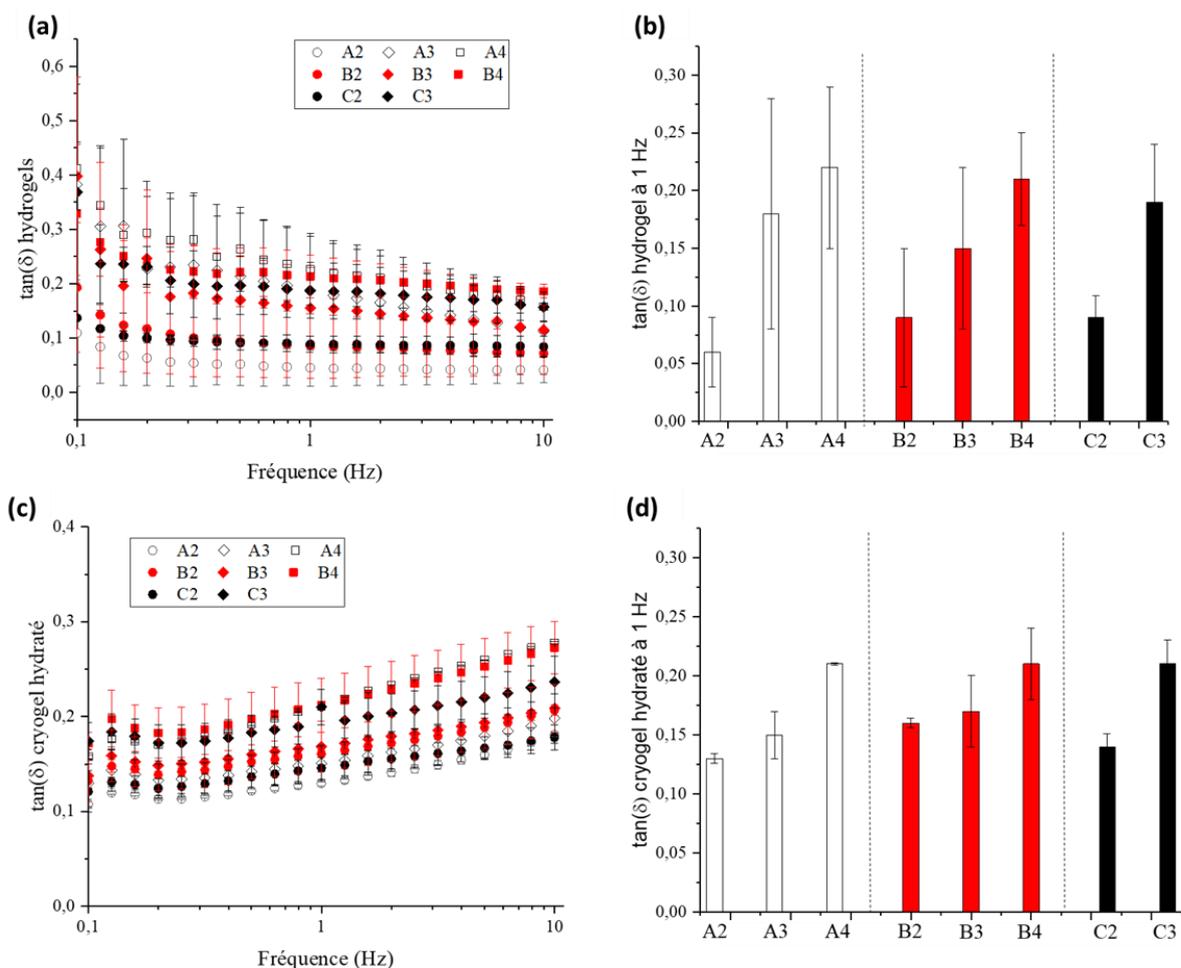
Annexe III-3 : Courbes de DSC entre 25 et 110 °C des CMC et mCMC possédants des DM de 34, 50 et 76 %.



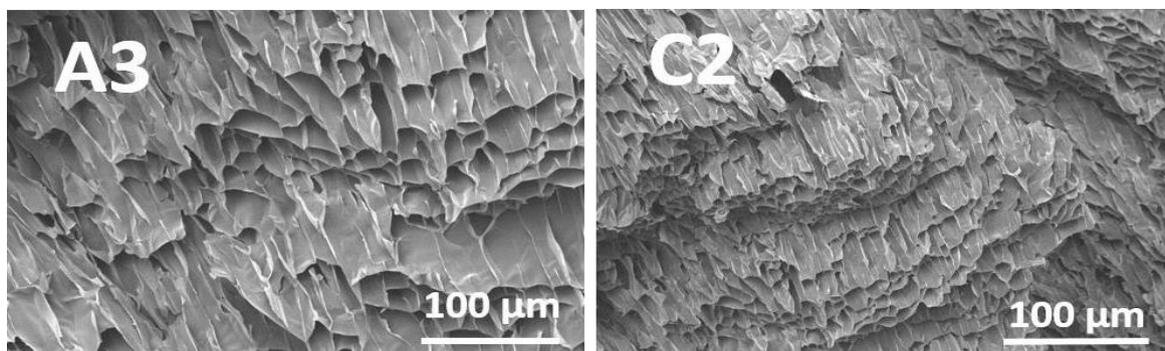
Annexe III-4 : Spectre RMN ^{13}C du liquide de l'I2959. 10 mg d'I2959 ont été solubilisés dans 650 μL de DMSO- d_6 . Le spectre est enregistré sur un spectromètre Spectrospin 300 MHz (Bruker, Allemagne) à 25 °C avec 4096 scans successifs et avec un temps de relaxation D1 de 10 s. δ 28,6 ppm (2C, s), 59,9 ppm (1C, s), 70,2 ppm (1C, s), 77,1 ppm (1C, s), 114,1 ppm (2C, s), 127,9 ppm (2C, s), 132,9 ppm (1C, s), 162,3 ppm (1C, s), 202,4 ppm (1C, s).



Annexe III-5 : Evolution du taux de conversion des méthacrylates pendant la durée d'insolation UV (365 nm, 82 mW/cm 2) pour des cryogels issus de la formulation C3 contenant 3 %m de mCMC(DM = 76 %). Ces résultats montrent que le taux de conversion n'a pratiquement pas changé après 1 minute dans ces conditions expérimentales. La photo-réticulation a été considérée comme terminée après 5 minutes.

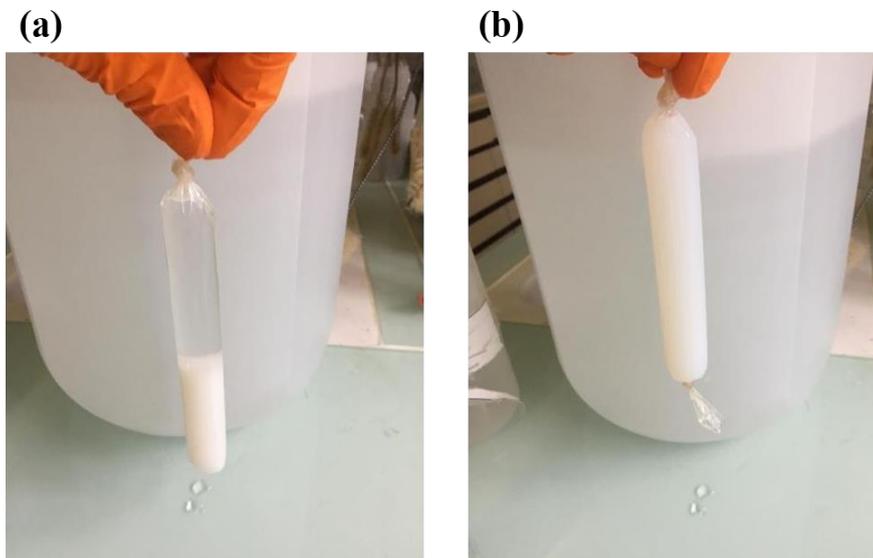


Annexe III-6 : Evolution des $\tan(\delta)$ à 1 % de déformation et à 25 °C pour les hydrogels issus des formulations A2 à C3 contenant des mCMC à 2, 3 ou 4 % et des DM de 34, 50 ou 76 % (a) de 0,1 à 10 Hz et (b) 1 Hz et des cryogels hydratés (c) de 0,1 à 10 Hz et (d) à 1 Hz. Les valeurs de $\tan(\delta)$ des hydrogels et cryogels hydratés semblent diminuer avec le DM et la concentration en mCMC, signifiant que moins d'énergie est dissipée pendant les oscillations. Cela peut être lié à une structure de réseau de réticulation plus souple qui permet au matériau de stocker davantage d'énergie élastique et de dissiper moins d'énergie lors des déformations.

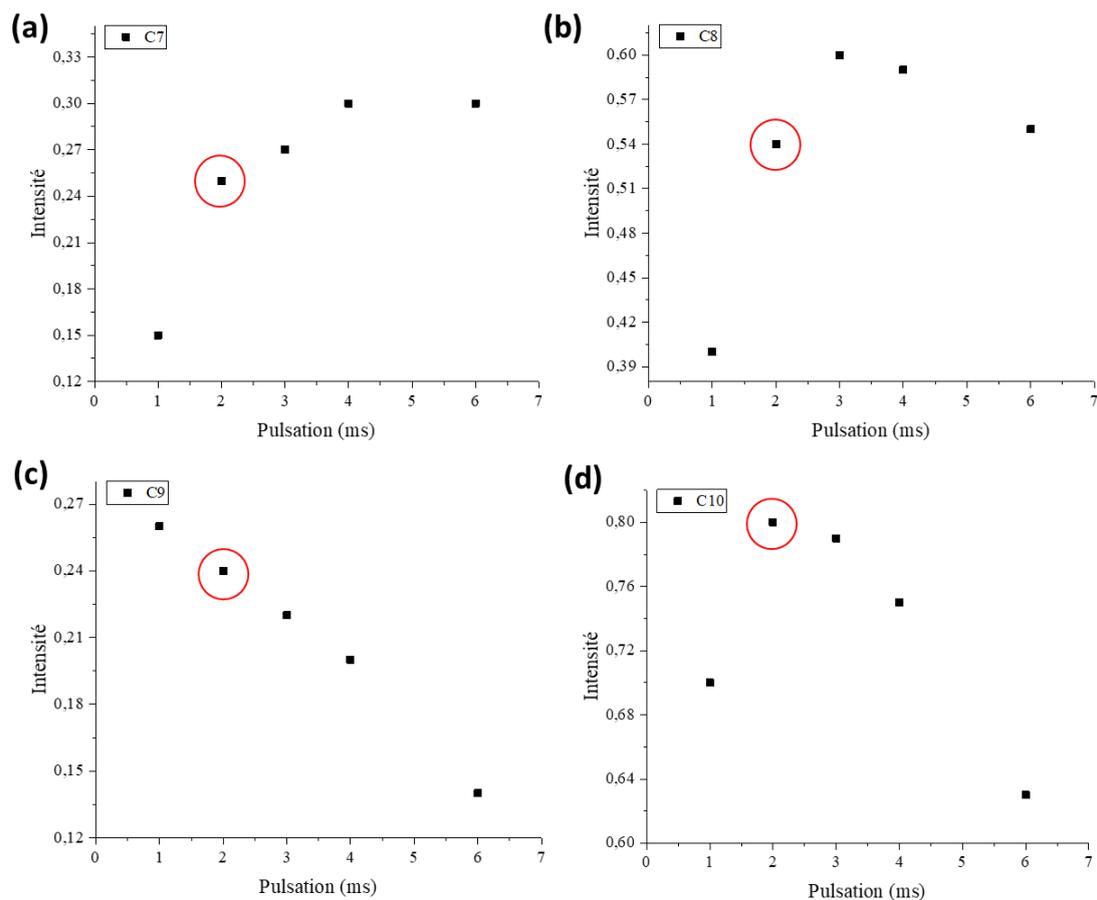


Annexe III-7 : Images MEB des cryogels A3 et C2 montrant l'orientation des pores due à la congélation dans l'azote liquide provoquant la croissance des cristaux dans l'axe de congélation.

Annexes chapitre IV

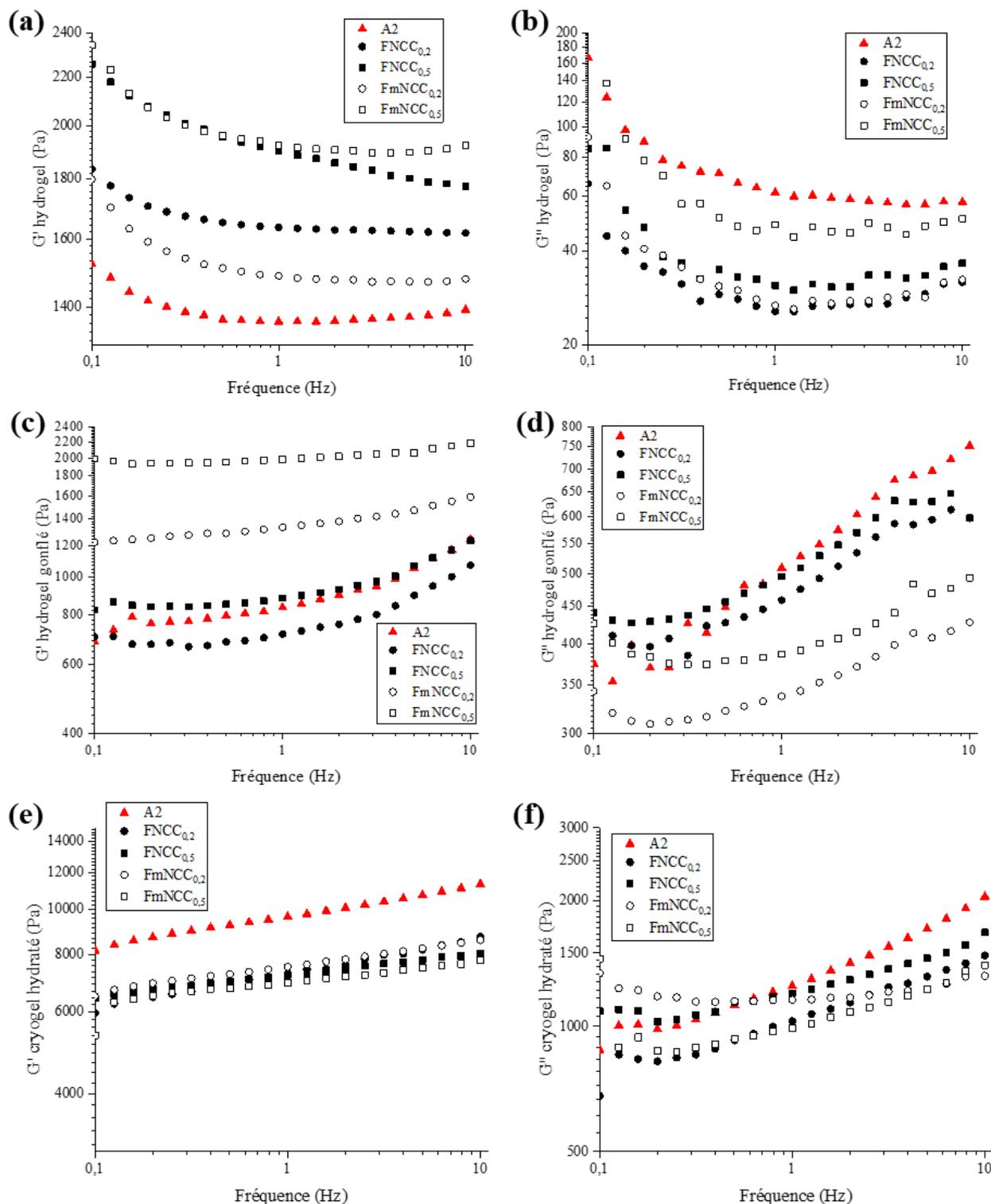


Annexe IV-1 : (a) Sédimentation lors de la dialyse des mNCC produits avec un nombre d'équivalents en AM par groupements hydroxyles en surface des NCC de 24 et (b) dispersion lors de la dialyse des mNCC produits avec un nombre d'équivalents en AM par groupements hydroxyles en surface des NCC de 3,0.



Annexe IV-2 : Intensité des carbones C7-10 (a-d) des groupements méthacrylates greffés sur les mNCC en fonction du temps de contact. L'acquisition des spectres RMN ^{13}C CP-MAS du solide a été réalisée sur le même échantillon (mNCC DM = 12,6 %) dans le même rotor et avec 4000 scans.

Dans le contexte de la RMN ^{13}C CP-MAS, le temps de contact se réfère à la période pendant laquelle l'aimantation est transférée des noyaux d'hydrogène (protons) vers les noyaux de carbone. Lorsque les noyaux d'hydrogène, préalablement polarisés dans un matériau solide, entrent en contact avec les noyaux de carbone, l'aimantation est transmise des protons aux carbones grâce à un processus connu sous le nom de "cross-polarization". Ce transfert d'aimantation est optimisé en ajustant judicieusement la durée du temps de contact. Un temps de contact correctement calibré permet d'atteindre un équilibre optimal entre la quantité d'aimantation transférée et la résolution spectrale obtenue dans la mesure de RMN. En atteignant une polarisation optimale des carbones (intensité maximale), le temps de contact contribue à maximiser la sensibilité du signal de RMN, à améliorer la qualité des données spectrales et à fournir des informations quantitatives cruciales sur la composition et la structure des échantillons. Le temps de contact des spectres réalisés dans ces travaux de thèse est de 2 ms, correspondant à la quantification des NCC et à la polarisation maximale du CH_3 (C10) du méthacrylates et non à ceux des carbones C7-9. C'est pourquoi le C10 a été utilisé pour déterminer le DM des mNCC.



Annexe IV-3 : Evolution pour les différentes formulations contenant 2 % de mCMC ($DM = 34$ %) sans et avec 0,2 ou 0,5 % de NCC ou mNCC des (a) modules élastiques (G') des hydrogels (b) modules visqueux (G'') des hydrogels (c) modules élastiques (G') des hydrogels gonflés (d) modules visqueux (G'') des hydrogels gonflés (e) modules élastiques (G') des cryogels hydratés (f) modules visqueux (G'') des cryogels hydratés mesurés par rhéologie plan-plan, entre 0,1 et 10 Hz, à 1 % de déformation à 25 °C.

Annexe IV-4

Les tests de cytotoxicité des cryogels ont été réalisés par Béatrice Labat (université Rouen Normandie).

Matériel et méthodes

Pour ces tests, les fibroblastes L929 (CCL-1TM) ont été obtenus auprès de l'ATCC® (LGC Standards, UK), α -Minimum Essential Medium (α -MEM), la streptomycine/pénicilline et la L-glutamine ont été achetés auprès de Sigma Aldrich (France) et le sérum bovin fœtal (FBS) auprès de Gibco (Gibco-BRL, USA). Le kit Live/Dead a été acheté à Molecular Probes (Invitrogen, USA).

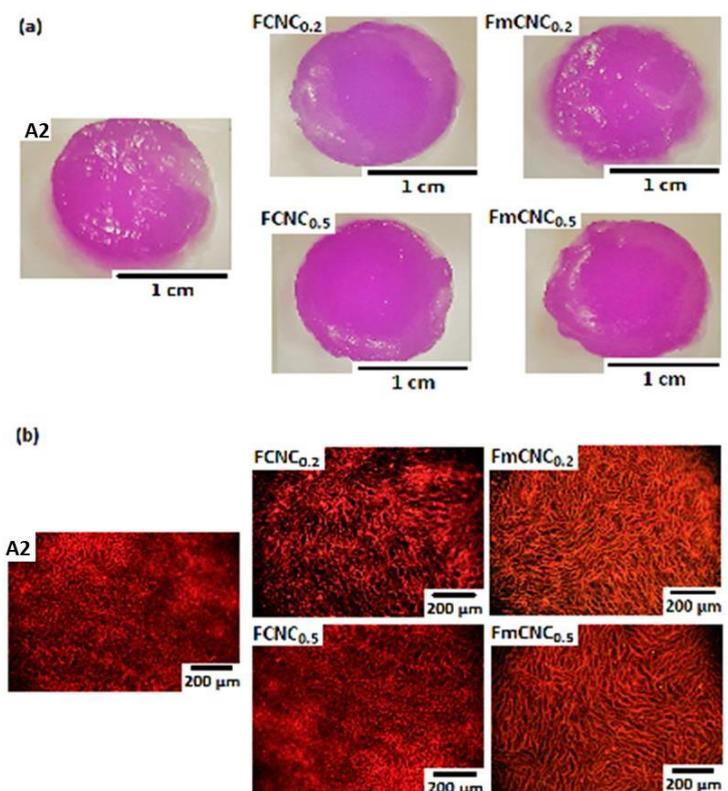
Avant l'évaluation de la cytotoxicité, tous les cryogels sont stérilisés dans un bain d'éthanol/eau (70/30 %m) pendant 24 heures sous une légère agitation rotative. Ils sont ensuite placés dans de l'eau ultrapure stérile (Milli-Q - 18,2 M .cm) pendant 24 heures supplémentaires pour éliminer l'éthanol, puis, sont transférés dans un milieu de culture cellulaire complet composé de α -MEM supplémenté de 10 % de FBS, de streptomycine/pénicilline (100 mg.mL⁻¹/100 mM respectivement) et de 2 mM de L-glutamine, pendant au moins 48 heures et conservés tels quels dans des conditions stériles jusqu'à leur utilisation. Les cellules de fibroblastes de souris L929 sont systématiquement cultivées dans des flacons de culture tissulaire en plastique de 75 cm², avec le même milieu de culture complet que celui décrit ci-dessus, et incubées dans une atmosphère contrôlée et humidifiée avec 5 % de CO₂ à 37 °C. Lorsqu'elles sont sous-confluentes, les cellules sont détachées par voie enzymatique à l'aide de 0,25 % de trypsine-1 mM EDTA (Sigma-Aldrich).

La cytotoxicité des différentes formulations est évaluée conformément à la norme ISO 10993-5 2009 avec quelques adaptations (I.S. EN ISO 10993-5 : Évaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 5 : Essais de cytotoxicité in vitro). En bref, deux tests sont réalisés : l'éluion in situ et le contact direct. Les échantillons sont soigneusement répartis dans des plaques à 12 puits à l'aide de pinces stériles. Ensuite, des cellules L929 sontensemencées au fond des puits (test d'éluion in situ) et sur les échantillons (test de contact direct), à une densité de 50x10³ cellules par cm², et sont laissées en croissance pendant 48 h. Le DMSO (10 %) et le milieu de culture cellulaire complet sont utilisés comme contrôles négatifs (Ctrl -) et positifs (Ctrl +), respectivement. Pour le test d'éluion in situ, l'inspection morphologique des cellules adhérant tout autour des échantillons au fond des puits est réalisée à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase (Motic, Chine). Pour le test de contact direct, il est d'abord vérifié la viabilité des cellules en utilisant le kit Live/Dead® composé de deux produits fluorogènes. La calcéïne AM, un substrat d'estérase, donne une fluorescence verte lorsqu'elle est hydrolysée, ce qui indique que les membranes cellulaires ne sont pas endommagées et que les cellules sont viables. L'éthidium homodimère-1, un fluorophore d'acide nucléique rouge-fluorescent, révèle les membranes cellulaires endommagées puisque ce composé ne devrait pas pénétrer dans les

cellules. Par la suite, les cellules viables sont colorées en vert tandis que les cellules endommagées/mortes apparaissent en rouge. Les cellules sont imagées à l'aide d'un microscope à épifluorescence Zeiss Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Allemagne) équipé d'une caméra CCD (Motic, Chine). Parallèlement, l'activité métabolique des cellules en utilisant le test Alamar Blue® (AB - Bio-Rad, UK) sur une période de culture de 7 jours est étudié. Cet indicateur quantitatif courant de la viabilité cellulaire est basé sur les réactions d'oxydo-réduction qui se produisent dans les mitochondries des cellules. À J2, J5 et J7, le milieu de culture complet est remplacé par un milieu de culture contenant 10 % (v/v) d'AB pendant 3 heures. Ensuite, des mesures d'absorbance sont effectuées à 570 et 600 nm avec un lecteur de microplaques (BioTeck - Synergy 2, USA).

Résultats et discussion

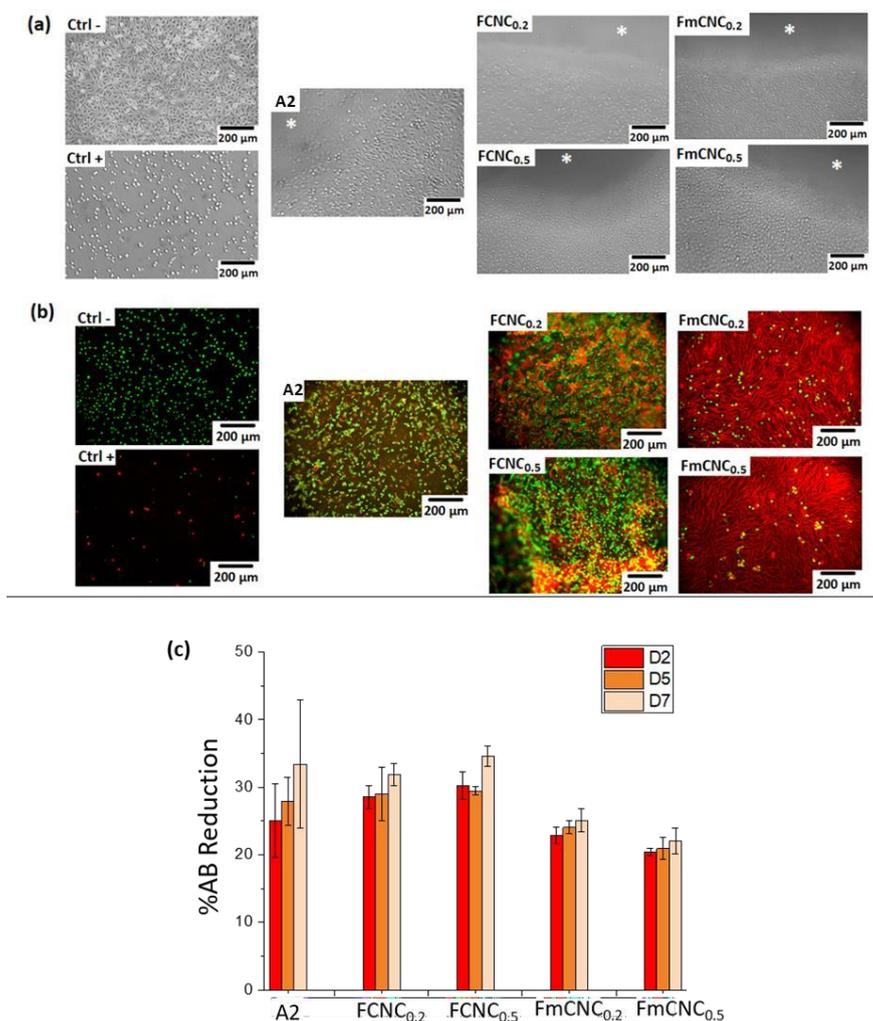
Avant l'ensemencement des cellules, tous les cryogels sont stérilisés et conservés dans un milieu de culture jusqu'à leur utilisation. L'inspection visuelle des échantillons a révélé un aspect rosâtre dû à la couleur intrinsèque du milieu de culture (**Annexe IV-4.1a**). Parallèlement, leur marquage à l'éthidium homodimère-1 (lors du test Live/Dead®) a révélé une fluorescence rouge inattendue mais très utile permettant d'observer leur structure (**Annexe IV-4.1b**). Contrairement aux cryogels à NCC libre (A2), les cryogels avec des NCC et mNCC présentent des pores répartis de façon homogène et plus allongés pour les NCC méthacrylés (FmNCC_{0,2} et FmNCC_{0,5}). Ce phénomène est également observé dans la structure du cryogel. La morphologie des pores des matériaux contenant à la fois de la NCC et de la mNCC est plus uniforme, bien que la taille moyenne des pores ne soit pas significativement différente (**Figure IV-14**). A titre de comparaison, la taille moyenne des pores des cryogels est plus petite que celle des cryogels hydratés. Par exemple, les cryogels FNCC_{0,5} et FmNCC_{0,5} ont une taille de pore moyenne de $14,6 \pm 2,9 \mu\text{m}$ et $15,4 \pm 4,6 \mu\text{m}$, alors que la taille de pore des cryogels hydratés correspondant aux mêmes échantillons est de $22,5 \pm 6,8 \mu\text{m}$ et $26,7 \pm 8,3 \mu\text{m}$ respectivement. Cela peut s'expliquer par l'hydratation des pores qui implique un léger gonflement des parois du réseau.



Annexe IV-4.1 : (a) Inspection visuelle des cryogels stérilisés et conditionnés dans un milieu de culture cellulaire et (b) images représentatives des cryogels par microscopie à fluorescence après marquage avec de l'éthidium homodimère-1. La taille des pores est déterminée par traitement d'image avec ImageJ. Des lignes horizontales ou verticales sont tracées sur chaque pore, donnant la taille moyenne de ce dernier. Cette procédure a été effectuée sur 50 pores par image et par échantillon, 1 seule image par échantillon.

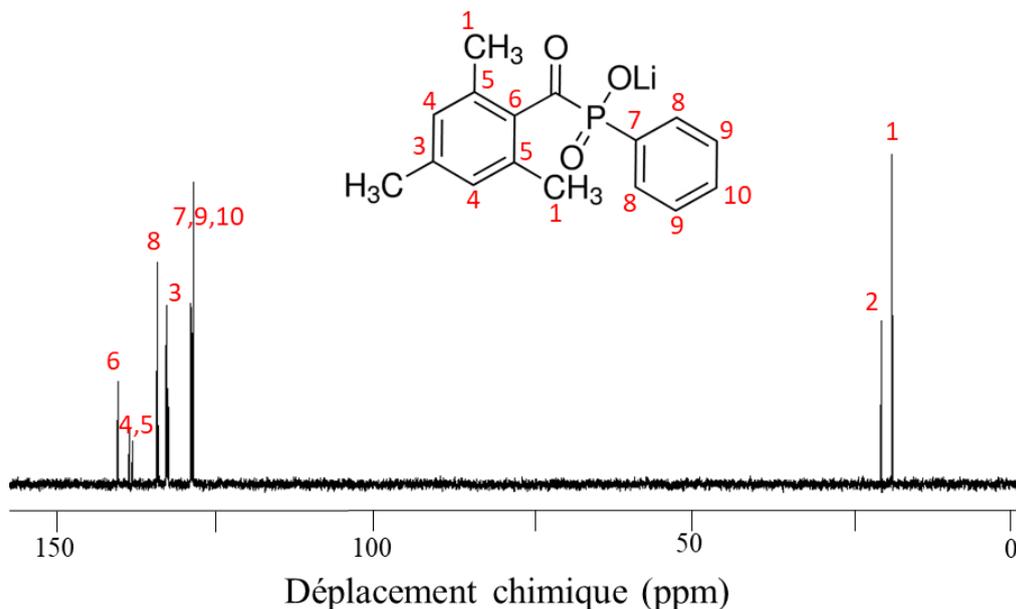
Ensuite, la cytotoxicité des cryogels est d'abord évaluée par un test d'élution in situ afin de vérifier la lixiviation potentielle des composés toxiques dans le milieu de culture cellulaire. Après l'ensemencement des cellules, tous les échantillons sont entièrement immergés dans le milieu de culture pendant 48 heures et les cellules à proximité sont observées à l'aide d'un microscope inversé. Pour chaque cryogel gonflé, les cellules présentent une bonne morphologie avec un aspect bien étalé (**Annexe IV-4.2a**). Elles ont même proliféré au fond des puits, ce qui indique qu'aucun composé toxique n'a été libéré par les cryogels. Deuxièmement, le test de contact direct est réalisé en plaçant des cellules sur les échantillons pendant 48 heures. Globalement, le test Live/Dead a révélé que les cellules sont viables car elles apparaissent en vert au microscope à fluorescence (**Annexe IV-4.2b**). Cependant, certaines différences sont observables entre les formulations. Alors que de nombreuses cellules arrondies sont observées au contact des cryogels A2, FNCC_{0.2} et FNCC_{0.5}, moins de cellules sont détectées avec les mNCC (FmNCC_{0.2} et FmNCC_{0.5}). Ces observations indiquent que la présence de mNCC altère l'ancrage des cellules ou leur implantation dans les cryogels. Différents paramètres pourraient expliquer un tel comportement (viscoélastique, composition chimique, tension de surface,

équilibre hydrophile/hydrophobe...) mais la composition et les propriétés élastiques sont probablement une explication clé. De plus, la forme étroite et allongée des pores, dont la taille moyenne est d'environ 25 μm , et la faible épaisseur de leurs parois présentent des dimensions qui ne sont pas compatibles avec l'étalement ou l'invasion des cellules. Les cellules L929 ont un diamètre d'environ 20 μm lorsqu'elles sont arrondies et d'environ 80 - 100 μm lorsqu'elles sont étalées, ce qui démontre la difficulté de pénétrer le réseau dans ce dernier état. Enfin, l'activité métabolique des cellules L929 en contact avec les cryogels confirme que les cellules restaient viables jusqu'à 7 jours de culture (**Annexe IV-4.2c**), bien que nous n'ayons pas observé d'augmentation significative de l'activité cellulaire au fil du temps, ce qui est conforme aux observations microscopiques précédentes.

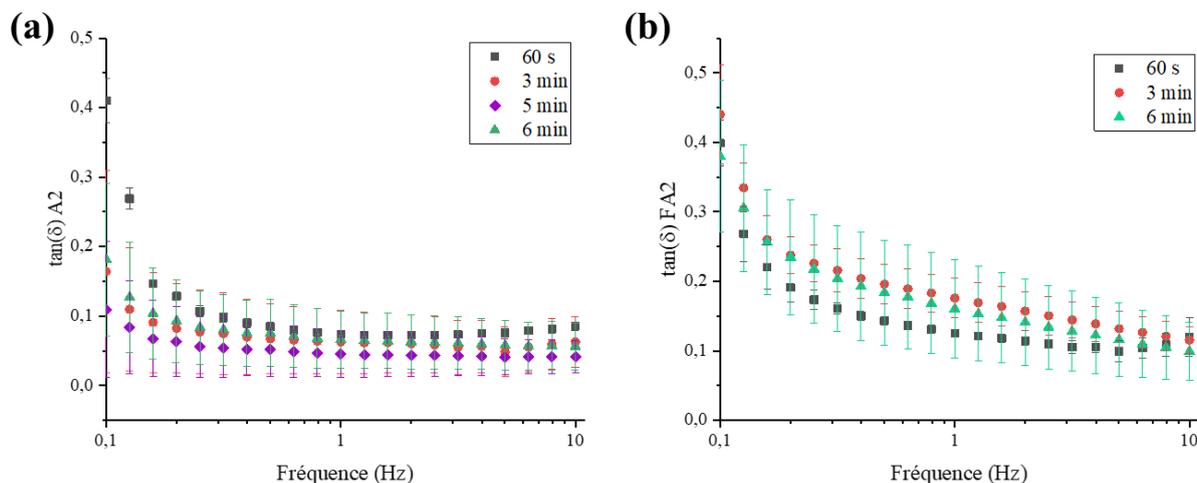


Annexe IV-4.2 : Evaluation de la cytotoxicité avec les fibroblastes L929 (a) Test d'éluion in situ : images de microscopie inversée à contraste de phase de cellules après 48h de culture en présence de cryogels (A2, FNCC_{0,2}, FNCC_{0,5}, FmNCC_{0,2} et FmNCC_{0,5}). Les Ctrl- et Ctrl+ correspondent aux contrôles (milieu de culture complet et milieu de culture 10% DMSO, respectivement). (b) Test de contact direct : microscopie à épifluorescence de cellules ensemencées sur les cryogels pendant 48 h après un test Live/Dead®. A noter : les cryogels apparaissent en rouge après marquage à l'éthidium homodimère-1 et (c) test Alamar Blue® à J2, J5, J7.

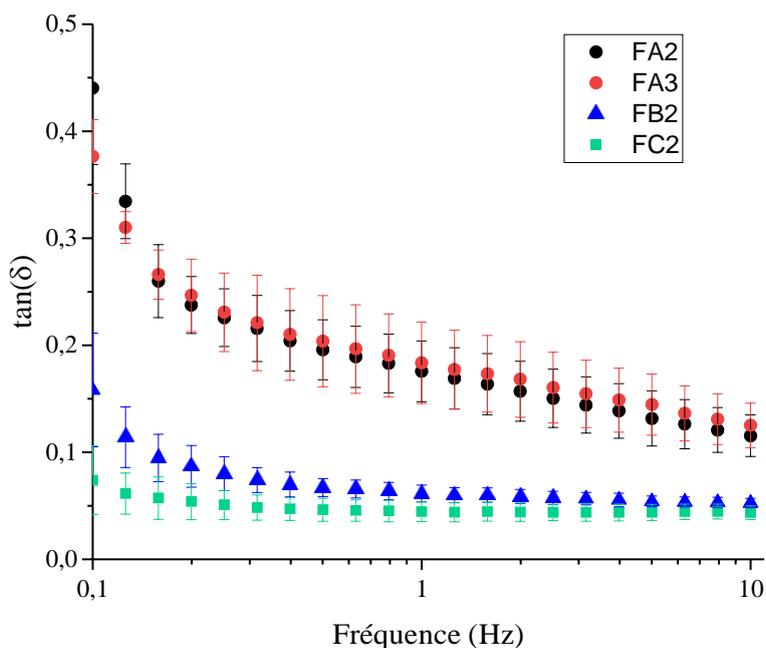
Annexes chapitre V



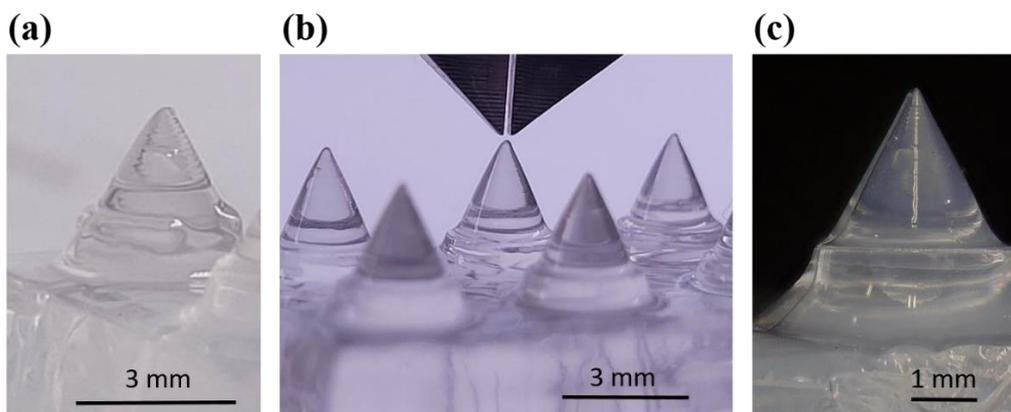
Annexe V-1 : Spectre RMN ^{13}C du liquide du LAP. 8 mg de LAP ont été solubilisés dans 650 μL de D_2O . Le spectre est enregistré sur un spectromètre Spectrospin 300 MHz (Bruker, Allemagne) à 25 °C avec 4096 scans successifs et avec un temps de relaxation D1 de 10 s. δ 18,6 (2C, s), 20,2 (1C, s), 128,1(1C, s), 128,4 (1C, s), 128,5 (2C, s), 128,9 (2C, s), 132,2 (2C, s), 133,8 (2C, s), 137,7 (1C, s), 140,0 (1C, s).



Annexe V-2 : Evolution des $\tan(\delta)$ pour les hydrogels mesurés entre 0,1 et 10 Hz, à 1 % de déformation et à 25 °C, pour des hydrogels d'une couche de 3,6 mm d'épaisseur (a) insolés pendant 60 s, 3, 5 et 6 min à partir d'une formulation contenant 2 %m de mCMC (DM =34 %) et 0,12 %m de d'I2959 et (b) insolés pendant 60 s, 3 et 6 min à partir d'une formulation contenant 2 %m de mCMC (DM =34 %) et 0,15 %m de LAP.



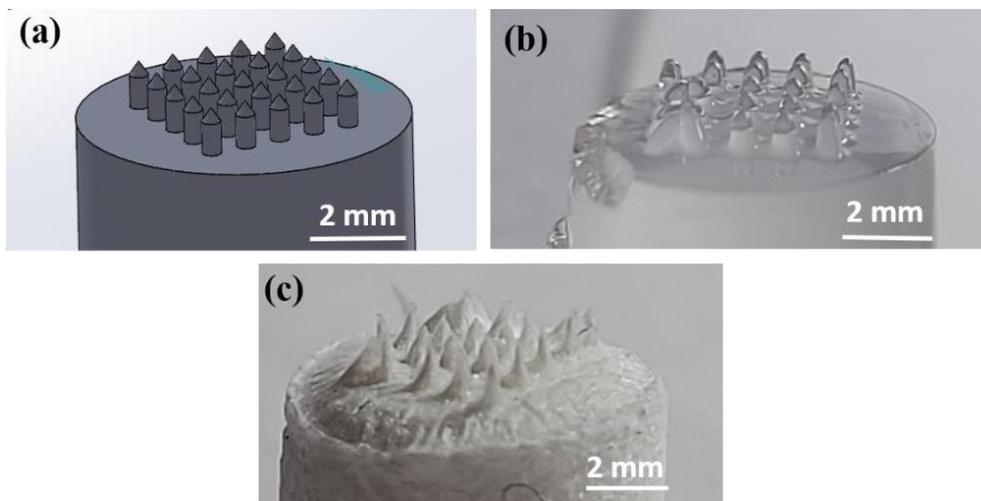
Annexe V-3 : Evolution des $\tan(\delta)$ pour les hydrogels issus des formulations FA2, FA3, FB2 et FC2, mesurés par rhéologie plan-plan, entre 0,1 et 10 Hz, à 1 % de déformation et à 25 °C.



Annexe V-4 : Hydrogels coniques imprimés par DLP avec un durée d'insolation de 4 s par couche et des épaisseurs de couches de (a) 200 μm , (b) 100 μm et (c) 500 μm . Pour chaque expérience, la base a été imprimée avec une épaisseur de couches de 500 μm et des durées d'insolation de 5 s pour la première couche et de 4 s pour les couches suivantes. Il est possible d'observer les différentes couches imprimées en (a) et le phénomène de « sur-réticulation » en (c).

Les cônes imprimés peuvent être comparés à des microaiguilles. En effet, les microaiguilles sont de petites aiguilles de 150 à 1500 μm de hauteur, de 50 à 400 μm de large et présentant une pointe de 0,1 à 50 μm réparties sur une surface donnée (**Annexe V-5a**). Elles peuvent être utilisées pour l'administration contrôlée de médicaments, notamment pour les injections intradermiques et sous-cutanées, évitant ainsi les injections traditionnelles plus invasives. Les microaiguilles peuvent également être utilisées pour prélever de petites quantités de liquides biologiques tels que le sang ou le liquide interstitiel pour des analyses diagnostiques. Elles peuvent également être utilisées pour réaliser des biopsies de tissus. La formation de

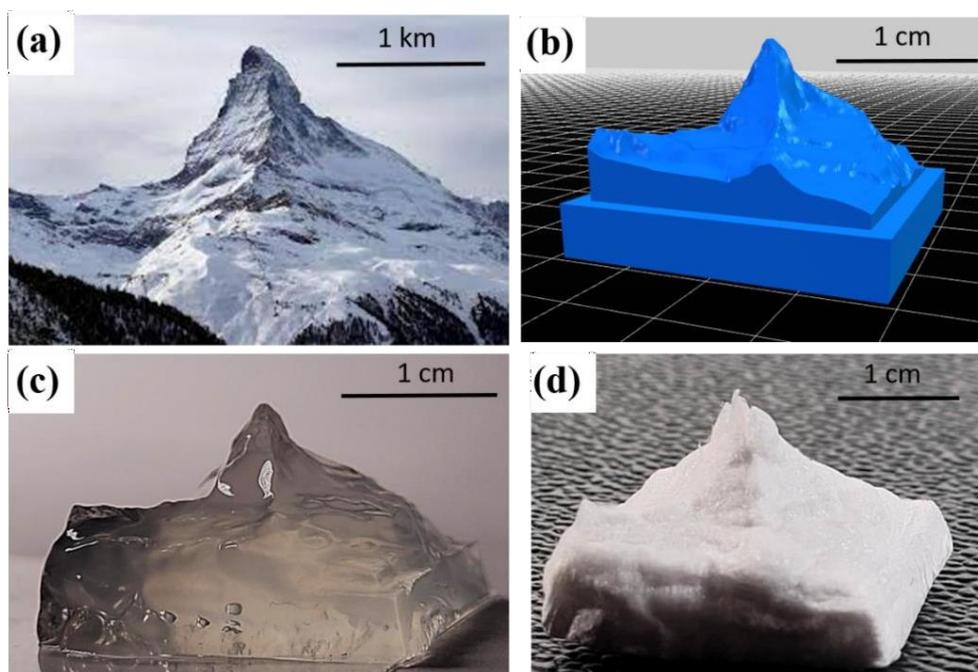
microaiguilles par DLP avec différents polymères permet d'obtenir les dimensions et les propriétés mécaniques souhaitées. Bien que la DLP soit principalement utilisée pour imprimer des objets avec une géométrie complexe et une haute résolution, la formation directe de microaiguilles en hydrogel avec la formulation étudiée n'est pas possible (**Annexe V-5b**). En effet, la principale difficulté réside dans la nature des hydrogels obtenus, qui sont des matériaux mous ne pouvant pas pénétrer à l'intérieur de l'épiderme. Également, la formation de microaiguilles nécessite un contrôle minutieux de la géométrie de l'aiguille pendant l'impression pour obtenir des structures fonctionnelles. En utilisant une épaisseur de couche de 50 μm sur la pointe, les hydrogels formés possèdent une géométrie proche de la structure d'une microaiguille, même si la taille des microaiguilles est inhomogène et parfois mal orientées après affaissement à la manipulation (**Annexe V-5b**). La DLP Asiga MAX possède toutefois une résolution trop faible car la pointe de la microaiguille doit posséder un diamètre ($\leq 50 \mu\text{m}$) inférieur au pixel de l'imprimante (62 μm). L'utilisation d'une autre DLP, telle que l'Asiga MAX X qui possède une résolution de 27 μm , pourrait permettre de respecter les contraintes géométriques des microaiguilles. Enfin, le cryogel, matériau mécaniquement plus résistant et dont la structure est orientée verticalement pourrait être une alternative pour obtenir une pointe d'un diamètre $< 50 \mu\text{m}$ (**Annexe V-5c**). Cependant, en ce qui concerne les cryogels obtenus, leur résistance n'est pas suffisante pour pénétrer l'épiderme, car ils s'affaissent lorsqu'on exerce une pression avec le doigt sur eux.



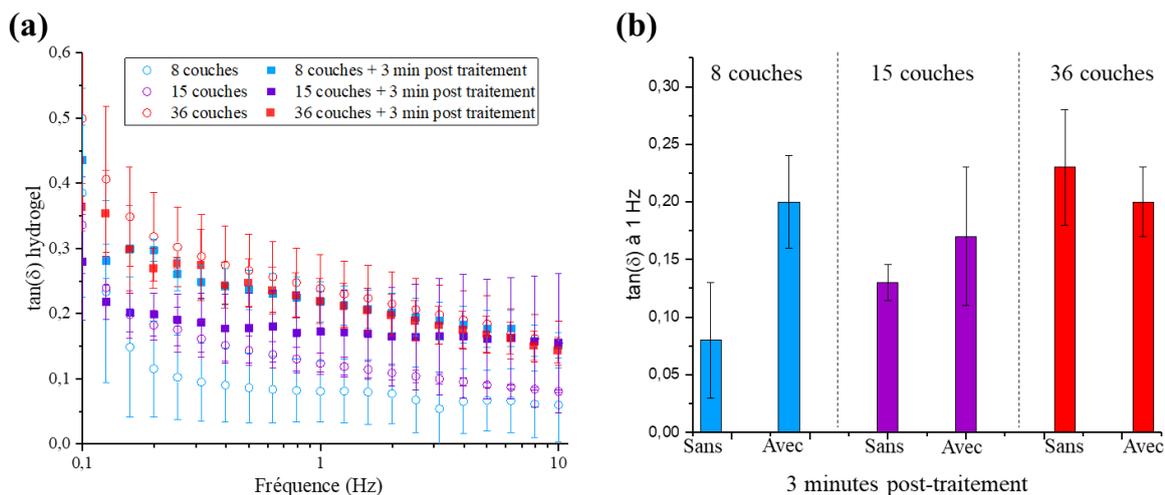
Annexe V-5 : (a) Modèle CAO de microaiguilles de 1 mm de hauteur et de 500 μm de largeur à la base à imprimer avec une formulation de FA2 contenant 2 %m de mCMC DM =34 % et 0,15 %m de LAP. (b) Hydrogel de la forme de microaiguilles imprimé avec une épaisseur de couche en Z de 50 μm sur les pointes et une durée d'insolation de 4 s par couche, et (c) cryogel correspondant.

Le Cervin, également connu sous le nom de Matterhorn, est une montagne emblématique située à la frontière entre la Suisse et l'Italie. Avec sa forme unique et son sommet atteignant une altitude de 4 478 mètres, en fait l'une des montagnes les plus célèbres à gravir

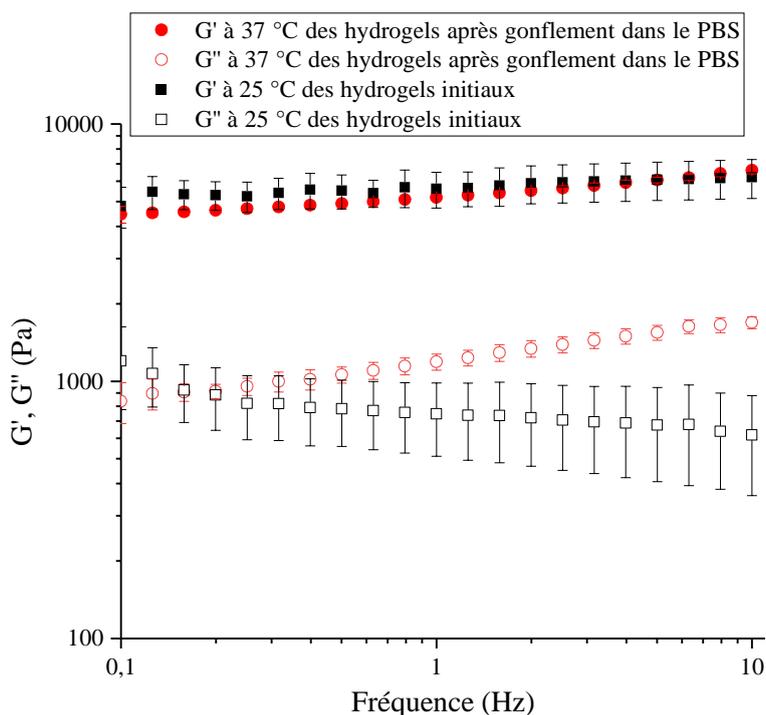
dans les Alpes (**Annexe V-6a**). L'hydrogel correspondant à cette montagne, imprimé avec des couches de 100 μm respecte la texturation du modèle (**Annexe V-6 b et c**). Ceci est une preuve supplémentaire montrant que la sur-polymérisation n'a pas lieu lorsque que les couches successives possèdent une surface différente. En effet, une sur-réticulation apparaît sur la partie correspondant à une marche au-dessus du socle car la surface de couche est identique jusqu'à ce que les couches formées correspondent aux détails de la montagne. En somme, il est possible d'atteindre des résolutions permettant de représenter les détails fins d'une structure en ayant une épaisseur de couche relativement basse tout en minimisant la sur-polymérisation lorsque que les hydrogels présentent une morphologie non géométrique mais dont la surface des couches diminue au cours de l'impression. De même, le cryogel conserve la structure de l'hydrogel imprimé (**Annexe V-6d**).



Annexe V-6 : (a) Le Cervin (b) modèle à imprimer avec une formulation de FA2 contenant 2 %m de mCMC DM =34 % et 0,15 %m de LAP, représentant le Cervin (c) Cervin imprimé en hydrogel avec une épaisseur de couche Z de 100 μm sur la montagne et 4 s d'insolation par couche (d) Cervin en cryogel issu de l'hydrogel représenté en (c). Pour la base, les paramètres d'impression de 5 s d'insolation la première couche, 4 s les autres et une épaisseur de couche de 500 μm conviennent.



Annexe V-7 : Evolution des $\tan(\delta)$ pour les hydrogels imprimés à partir d'une formulation contenant de 2 %m de mCMC DM =34 % et 0,15 %m de LAP avec 8, 15 et 36 couches des durées d'insolation de 5 s pour la première couche puis 4 s les autres puis avec et sans post traitement de 3 minutes aux UV (a) 0,1 et 10 Hz (b) à 1 Hz à 1 % de déformation et à 25 °C. Les valeurs de $\tan(\delta)$ des hydrogels diminuent avec le nombre de couche et augmentent avec le post traitement aux UV. Cela peut être lié à une structure de réseau de réticulation plus souple en diminuant le nombre de couches qui permet au matériau de stocker davantage d'énergie élastique et de dissiper moins d'énergie lors des déformations.



Annexe V-8 : Evolutions des modules élastiques (G') et de perte (G'') des hydrogels imprimés en 15 couches et ayant subi un post-traitement aux UV de 3 minutes, après gonflement dans le PBS à 37 °C et des hydrogels initiaux, mesurés par rhéologie plan-plan de 0,1 à 10 Hz, à 1 % de déformation et à 37 °C et 25 °C respectivement.

