



HAL
open science

Développement d'une bio-imprimante 3D opto-fluidique pour l'impression haute résolution et multimatériaux d'hydrogel

Victor Fournié

► **To cite this version:**

Victor Fournié. Développement d'une bio-imprimante 3D opto-fluidique pour l'impression haute résolution et multimatériaux d'hydrogel. Mécanique des fluides [physics.class-ph]. INSA de Toulouse, 2023. Français. NNT : 2023ISAT0057 . tel-04633104v2

HAL Id: tel-04633104

<https://laas.hal.science/tel-04633104v2>

Submitted on 23 Jul 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

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : *l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)*

Présentée et soutenue le 5 Décembre 2023 par :

Victor Fournié

Développement d'une bio-imprimante 3D opto-fluidique pour l'impression
haute résolution et multimatériaux d'hydrogel

JURY

JÉRÉMY GRISOLIA
CATHERINE VILLARD
OLIVIER SOPPERA
COLINE PINÈSE
LUCIANO VIDAL
EMMANUELLE TREVISIOL
LAURENT MALAQUIN

Professeur d'Université
Professeur d'Université
Directeur de Recherche
Chargée de Recherche
Chargé de Recherche
Directrice de Recherche
Directeur de Recherche

Président du Jury
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directrice de thèse
Directeur de thèse

École doctorale et spécialité :

SDM : Physique - COR 02

Unité de Recherche :

LAAS : Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Directeur(s) de Thèse :

Laurent Malaquin et Emmanuelle Trevisiol

Rapporteurs :

Catherine Villard et Olivier Soppera

Abstracts - Résumé

English abstract

In this thesis report, we introduce a pioneering concept in 3D printing applied to biological applications. The 3D-FlowPrint platform has been devised to execute high-resolution prints using multiple materials. This approach addresses the current limitations inherent in existing technologies. Microextrusion, stereolithography, and microfluidic probes possess individual capabilities to handle heterogeneous objects printing, achieve high resolutions, and manipulate fluids with precision. However, these capabilities have never been fully united in a proper technic. The 3D-FlowPrint platform draws inspiration from each of these concepts. It employs a microfluidic system to channel fluids to a submerged printhead, where the injected solution undergoes photopolymerization. By decoupling material deposition from polymerization, this platform attains both high resolution and the versatility to work with diverse materials.

The heart of this platform resides in the design of its printhead. This printhead enables fluid injection and retrieval without environmental contamination, while facilitating laser transmission through an integrated optical fiber. To achieve these goals, we have developed four successive generations of printheads. The first generation, machined and molded, demonstrated the feasibility of the concept but presented room for improvement. The second generation, entirely 3D printed, introduced new geometric possibilities and rapid prototyping but faced challenges with optical interfaces. The third generation combined 3D printing with optically compatible material assembling. It enabled reproducible PEGDA prints to develop and characterize the platform, yet it encountered limitations for GelMA printing. The fourth generation overcame this challenge by introducing an air bubble under the printhead, resolving third-generation issues.

This manuscript also analyzes the microfluidic system. The printheads operate immersed, enabling printing in cultured environments. These heads include an injection channel and an aspiration channel, along with surface reliefs ensuring complete collection of the injected solution to minimize contamination. Utilizing finite element-based numerical simulations, phase diagrams have been established to evaluate the material collection capacity. These simulations guided the optimization of surface reliefs to enhance the performance of the printheads. Additionally, the ability to transition from one fluid to another in multi-material printing was analyzed.

The introduction of an optical fiber between the microfluidic channels allowed the photopolymerization of the injected solution. The platform gained versatility with dual printing speeds enabled by the insertion of two optical fibers in the 3D printed printheads. Photopolymerization thresholds of PEGDA and GelMA were investigated, and the impact of in-flow photopolymerization was verified. These analyses culminated in the printing of 2D, 2.5D, 3D, and multi-material structures with reproducible precision down to 7 micrometers.

Serving as proof of concept for biological applications, the platform was employed in four distinct approaches. First, PEGDA objects prevented cell adhesion, enabling the study of geometrically constrained cellular assemblies. Second, scaffold structures for 3D tissues were printed. Third, the printing of suspension of cells in GelMA was achieved, along with the characterization of cellular viability using this method.

This manuscript aims to address the research question of creating a new 3D printer for high-resolution heterogeneous objects fabrication. It also provides a deep platform characterization and detailed protocols for users.

Résumé français

Au cours de cette étude, nous avons introduit un concept novateur d'impression 3D à des fins biologiques. La plateforme 3D-FlowPrint a été conçue pour réaliser des impressions en haute résolution avec plusieurs matériaux. Cette approche vise à pallier les lacunes actuelles des technologies existantes. La micro-extrusion, la stéréolithographie et les sondes microfluidiques ont parfois la capacité d'imprimer des objets hétérogènes, d'imprimer en hautes résolutions ou de précisément manipuler des fluides, mais jamais toutes ces conditions ne sont réunies de manière satisfaisante. La plateforme 3D-FlowPrint adopte un système microfluidique pour acheminer les fluides jusqu'à une tête d'impression immergée, où la solution injectée est photopolymérisée. En dissociant l'apport du matériau de sa polymérisation, cette plateforme parvient à offrir à la fois une haute résolution et la possibilité de travailler avec divers matériaux.

Le cœur de cette plateforme réside dans la conception de sa tête d'impression. Cette tête permet l'injection et la récupération des fluides sans contamination de l'environnement, tout en facilitant la transmission de la lumière d'un laser via une fibre optique intégrée. Pour atteindre ces objectifs, nous avons élaboré quatre générations successives de têtes d'impression. La première génération, usinée et moulée, a démontré la faisabilité du concept, mais avait des marges d'amélioration. La deuxième génération, entièrement imprimée en 3D, offrait de nouvelles possibilités géométriques et un prototypage rapide, mais posait des problèmes en matière d'interface optique. La troisième génération, combinant impression 3D et assemblage de matériaux optiquement compatibles, a permis des impressions reproductibles de PEGDA pour développer et caractériser la plateforme. Cependant, cette génération avait des limitations pour l'impression d'hydrogel naturels fonctionnalisés tels que le GelMA. La quatrième génération a surmonté ce problème en introduisant une bulle d'air sous la tête et résolvant ainsi les défis de la troisième génération.

Ce manuscrit analyse aussi le système microfluidique en place. Les têtes d'impression fonctionnent en immersion pour autoriser l'impression dans des environnements cellulaires. Ces têtes comprennent un canal d'injection et un canal d'aspiration, ainsi que des reliefs de surface pour assurer la collecte complète de la solution injectée, minimisant la contamination. Via des simulations numériques, des diagrammes de phase ont été établis pour évaluer le taux de récupération du matériau injecté. Ces simulations ont orienté l'optimisation des reliefs de surface pour améliorer les performances des têtes d'impression. De plus, la capacité à changer de fluide au cours d'une impression multimatériaux a été analysée.

L'introduction d'une fibre optique dans la tête d'impression a permis la photopolymérisation de la solution injectée. La plateforme a gagné en versatilité avec deux vitesses d'impression grâce à des têtes d'impression imprimées en 3D comprenant deux fibres optiques. Les seuils de photopolymérisation du PEGDA et du GelMA ont été étudiés, et l'impact des flux sur la photopolymérisation a été vérifié. Ces analyses ont abouti à l'impression de structures 2D, 3D et multimatériaux de manière reproductible avec une résolution jusqu'à 7 μm .

En tant que preuve de concept pour des applications biologiques, la plateforme a été utilisée pour quatre approches différentes. Premièrement, des objets en PEGDA permettent un guidage et un confinement cellulaire. Deuxièmement, des structures de soutien (*scaffold*) pour des tissus en 3D ont été imprimées. Troisièmement, l'impression de cellules en suspension dans du GelMA a été réalisée ainsi que la caractérisation de la viabilité cellulaire de cette méthode.

"Or, l'homme ne sera parfait que lorsqu'il saura créer et détruire comme Dieu ; il sait déjà détruire, c'est la moitié du chemin de fait."

Le comte de Monte-Cristo, Alexandre Dumas

La bioimpression 3D est-elle un premier pas sur la seconde moitié du chemin que l'humanité doit parcourir ?

Remerciements

Un travail de thèse ne peut s'effectuer seul. Il faut s'entourer scientifiquement, socialement, amicalement et familialement.

Tout au sommet de la grande pyramide du soutien, je souhaite remercier ma compagne Sarah Gelon. C'est elle qui se trouve à mes côtés depuis plus de dix ans et qui me tire vers le haut. Elle s'intéresse et me soutient dans ma recherche. Elle m'ouvre les yeux sur d'autres horizons et m'aide à prendre du recul. Elle me félicite dans les bons moments et me reconforte dans les plus durs. Elle a subi toutes mes dérives et explications loufoques sur mes problématiques techniques durant la thèse, écouté patiemment pendant mes répétitions de présentations et m'a grandement aidé dans la rédaction du manuscrit. C'est sûrement grâce à elle que je me suis détourné de la physique théorique vers le monde plus tangible et humain de la biophysique. Il est évident que je n'en serais pas là aujourd'hui sans elle.

Je souhaite aussi remercier chaleureusement mes directeurs de thèse. Laurent a su m'intéresser dès les premiers TPs à l'INSA vers ces nouveaux domaines qu'étaient la microfluidique et la 3D. À travers une première expérience en stage, nous avons pu développer un lien scientifique et amical. Je le remercie pour son écoute et son humanité sur des questions qui dépassent la science. Bravo aussi pour l'encadrement de toute l'équipe et cette dynamique que tu as réussi à mettre en place. De nombreuses équipes nous l'envient. Mais surtout, ensemble, nous avons pu développer cette fameuse plateforme d'impression 3D jusqu'à des concepts étonnants avec des bulles d'air... Merci aussi d'avoir accepté mes circonvolutions autour des codes en python. Je remercie aussi Emmanuelle, Pierre, Arnaud et Serge qui m'ont encadré, chacun avec leurs approches techniques. Il est agréable d'avoir un bol d'air frais venu d'autres équipes, laboratoires, villes et entreprises.

Une thèse se vit parfois de façon solitaire, mais le groupe ELIA, et le LAAS plus généralement, peuvent se targuer de leurs esprits d'équipe. Depuis des travaux communs avec Justine et Rémi en stage, puis de nombreux projets parallèles avec Sandrine et Julie, nous avons pu avancer tous ensemble. J'adresse un remerciement particulier à mes collègues de travail : Alexis et Mélanie. Dans l'équipe ELIA, ce n'est pas seulement le monde de la science qui était refait tous les midis, mais la société tout entière! Merci aux Elise, à Victor, à Claire, à Matthieu, à Ianis, à Nicolas, à Ophélie, à Bastien, aux Christophe, à Etienne, etc. Merci à tous les amis des autres équipes. De façon plus large, je remercie toutes les personnes techniques des plateformes, personnels administratifs et transverses du LAAS. Merci aussi aux membres du jury qui ont fait l'effort de relire ce manuscrit, de participer à la soutenance et de donner vie à mon projet.

Je souhaite aussi remercier chaleureusement mes parents qui m'ont permis d'atteindre ce point. Ils m'ont donné accès et soutenu dans mes études. Jusqu'à la fin du doctorat, j'ai pu compter sur eux, bien que je n'aie jamais vraiment réussi à leur expliquer de façon claire ma recherche. Plus largement, merci à ma famille et mes amis de respecter mon métier et de cautionner mes lubies capillaires. Tous les cercles ont besoin de quelqu'un avec la coiffure d'Einstein, à défaut d'en avoir le talent...

Notes

Le lecteur peut retrouver la table des protocoles d'utilisation de la plateforme à la fin du manuscrit (page 167).

Dans ce manuscrit, des règles orthographiques d'accord par proximité ou majorité sont employées.¹

Table des matières

Abstracts - Résumé	1
Remerciements	4
Introduction	7
1 Technologies de bio-impression 3D	9
1.1 Enjeux et besoins technologiques pour le développement de modèles d'études en biologie tissulaire	9
1.2 La bioimpression pour produire des modèles de tissus hétérogènes	13
2 Description de la technologie 3D-FlowPrint	35
2.1 Principe de la photopolymérisation en flux	35
2.2 Développement de la plateforme expérimentale	44
2.3 Environnement logiciel	47
2.4 Méthodologie et préparation d'une impression	51
3 Développement de têtes d'impression opto-fluidiques	55
3.1 Architecture et objectifs fonctionnels	56
3.2 Génération 1 : Têtes d'impression usinées en matériau silicone	59
3.3 Génération 2 : Têtes monolithiques obtenues en impression 3D	61
3.4 Génération 3 : Têtes d'impression hybrides	69
3.5 Génération 4 : Têtes hybrides avec bulle d'air	72
4 Contrôle et caractérisation microfluidique	83
4.1 Développement d'un modèle hydrodynamique numérique	84
4.2 Optimisation de l'architecture des têtes d'impression	95
4.3 Influence de la viscosité de la solution injectée	99
4.4 Influence des paramètres d'impression	101
4.5 Étude des concentrations et des temps caractéristiques de renouvellement de matériaux dans la zone de polymérisation	106
5 Photopolymérisation sous écoulements microfluidiques	111
5.1 Caractérisation optique et contrôle du faisceau laser	112
5.2 Aspects physico-chimiques du processus de la photopolymérisation	117
5.3 Dose seuil, largeur de ligne imprimée, résolution et temps d'impression	124
5.4 Influence de structures préexistantes sur l'impression	130
5.5 Influence de la transparence des matériaux	131
5.6 Création de pièces 2D, 2.5, 3D et multimatériaux	134
6 Études biologiques avec la plateforme d'impression 3D	147
6.1 Réalisation de structures en PEGDA pour le guidage de cellules et de sphéroïdes	147
6.2 Réalisation de structures support en 3D pour la culture cellulaire	152
6.3 Étude de la viabilité des cellules dans un procédé de bioimpression	152
Conclusion	165

Liste des protocoles	167
Annexes	168
Liste des figures	187
Liste des tableaux	190
Abréviations	191
Bibliographie	192

Introduction

Le développement de modèles *in-vitro* permettant d'accéder à des modèles 3D biomimétiques des organes réels afin de progresser sur la compréhension des processus biologiques ou pour pratiquer la médecine régénérative est une nécessité et une attente des biologistes. Dans ce contexte, le domaine de l'impression 3D et plus particulièrement de la bioimpression constituent des technologies particulièrement prometteuses. Malgré de nombreux développements récents, les difficultés technologiques sont nombreuses. Elles concernent d'une part la nécessité de développer des procédés à haute résolution, permettant la structuration de la matière à l'échelle cellulaire. Elles concernent d'autre part la nécessité de pouvoir reproduire l'architecture et l'hétérogénéité des tissus vivants et donc d'offrir un processus de fabrication multimatériaux, avec contrôle précis et robuste de la composition des matériaux. Dans ce contexte, le couplage de la lithographie laser et de la microfluidique sont particulièrement avantageuse et ont donné naissance à la technologie 3D-FlowPrint dont la mise au point et la validation ont constitués le coeur de ces travaux de thèses. La première partie de ce manuscrit a pour vocation de décrire l'état de l'art dans le domaine de la bioimpression 3D.

Le chapitre suivant présente la plateforme 3D-FlowPrint et met en avant son fonctionnement qui pourrait surpasser les fonctionnalités des bio-imprimantes 3D existantes. Ce chapitre décrit les processus fluidiques et optiques à l'œuvre. Il passe en revue l'ensemble des particularités de la plateforme afin de comprendre le fonctionnement global de l'imprimante. Ce chapitre permet ainsi d'appréhender en toute lumière les chapitres plus spécifiques suivants. Il détaille aussi le fonctionnement instrumental de la plateforme et fournit une liste de protocoles aux utilisateurs de la plateforme. Le sommaire des protocoles se trouve à la fin du manuscrit.

Une fois la plateforme détaillée et la compréhension générale acquise, le troisième chapitre se focalise sur les têtes d'impression. Ce chapitre met en avant les objectifs de la plateforme qui se transposent dans les têtes d'impression. Celles-ci doivent principalement permettre une gestion fluidique des fluides polymérisables et intégrer une interface optique pour la réalisation de la photo-réticulation. Le chapitre met en avant les processus de manufacture additives d'impression 3D qui ont permis la création de têtes aux géométries précises et reproductibles. Nous présentons quatre générations de tête qui ont pu successivement atteindre des exigences de plus en plus élevées. Les têtes d'impression permettent ainsi de manipuler des fluides à la manière des sondes microfluidiques.

Le quatrième chapitre s'attelle quant à lui à la description et à la caractérisation du système fluide des têtes d'impression, qui travaillent en immersion dans un milieu liquide. La capacité de collecte du fluide injecté non polymérisé est caractérisée afin de ne pas contaminer le milieu. Différentes variables d'impression jouent un rôle fluide, à savoir la vitesse de déplacement, la direction, la hauteur de la tête par rapport au substrat et les débits fluidiques. La compréhension des processus microfluidiques a aussi permis l'amélioration des têtes microfluidiques *via* une structuration de la surface des têtes.

L'environnement fluide est alors assez bien contrôlé pour pouvoir polymériser le matériau injecté. Les têtes d'impression comprennent un canal optique où une fibre optique est insérée afin de photo-réticuler le matériau sous la tête d'impression. Le cinquième chapitre développe la caractérisation optique du système. Il détaille la chimie de la photopolymérisation et la dose optique seuil à fournir pour polymériser les hydrogels PEGDA et GelMA. Ce chapitre vérifie aussi que l'impression en flux est compatible avec nos objectifs de résolution. Ainsi, avec des têtes d'impression optimisées et un système fluide fiable, nous avons produit une bibliothèque d'objets en 2D, 2.5D, 3D et en multimatériaux. Certains objets servent de démonstrations technologiques et d'autres ont des applications biologiques.

Quelques-uns de ces objets sont décrits dans le dernier chapitre de ce manuscrit. Plusieurs approches ont été envisagées pour utiliser les capacités de la plateforme 3D-FlowPrint. Des structures

de guidage et de confinement de la croissance cellulaire ont été créés avec des solutions de PEGDA. D'autres objets ont été imprimés avec du PEGDA fonctionnalisé afin de permettre une croissance cellulaire sur une surface 3D. Ce chapitre détaille aussi l'influence des paramètres d'impression sur la viabilité de cellules encapsulées dans la solution d'impression lors de la photopolymérisation en flux. Ce dernier point est l'aboutissement du processus de développement d'une bioimprimante 3D.

Ce manuscrit passe donc en revue l'ensemble des aspects de la bioimprimante 3D-FlowPrint depuis les têtes d'impression, le système microfluidique, la photopolymérisation et les applications biologiques. Il apporte donc une preuve de concept au domaine de la bioimpression pour la manufacture d'objet multimatériaux à haute résolution.

Chapitre 1

Technologies de bio-impression 3D

1.1	Enjeux et besoins technologiques pour le développement de modèles d'études en biologie tissulaire	9
1.1.1	Contexte	9
1.1.2	Les limites et avantages des modèles <i>in-vitro</i>	10
1.1.3	Les types de modèles et leur évolution	11
1.2	La bioimpression pour produire des modèles de tissus hétérogènes	13
1.2.1	L'apport de la bioimpression	13
1.2.2	Extrusion	16
1.2.3	Impression de gouttes	19
1.2.4	Transfert assisté par laser (LIFT)	20
1.2.5	Technologie hybride multimatériaux	22
1.2.6	Approches Photo-lithographiques	23

Dans ce chapitre, nous proposons une réflexion autour des évolutions technologiques récentes dans le domaine de la bioimpression 3D appliquée la réalisation de modèles de tissus. Le développement de modèles de culture hétérogènes, reproduisant fidèlement l'architecture des tissus biologiques a motivé de nombreux développements permettant d'améliorer les performances en termes de résolution d'impression multimatériaux pour atteindre la haute résolution (10 μm). Outre l'amélioration continue de la précision de ces technologies, le couplage de l'impression 3D et de la microfluidique a permis de lever un verrou important pour améliorer les capacités de multiplexage et d'automatisation des méthodes conventionnelles. Nous aborderons dans ce chapitre les enjeux autour du développement de modèles, puis nous décrivons les technologies de bioimpression 3D en accentuant sur les capacités haute résolution et multimatériaux.

1.1 Enjeux et besoins technologiques pour le développement de modèles d'études en biologie tissulaire

1.1.1 Contexte

La biologie fondamentale, le diagnostic biomédical et le criblage pharmaceutique sont trois domaines applicatifs dans le domaine de la médecine et de la santé pour lesquels le développement de modèles d'études constitue un enjeu commun. Dans la partie ci-dessous, nous évoquons les difficultés présentes notamment pour le développement de nouvelles molécules pharmaceutiques, car ce domaine

fournit des informations chiffrées plus facilement analysables. Nous considérons que les problématiques mises en lumière dans ce domaine précis sont transférables au diagnostic et à la biologie fondamentale.

La production de médicaments est un enjeu majeur pour nos sociétés. L'objectif est de trouver des molécules avec une balance bénéfices - risques positive. Le processus de développement de nouvelles molécules demeure un défi de taille au sein de l'industrie pharmaceutique, marqué par des contraintes de réduction de temps et des coûts associés à ce processus. Cette pression constante découle d'une quête pour accélérer la mise sur le marché des médicaments tout en maximisant la réussite dès la première tentative.² Au fil des années, le développement de médicaments est devenu de plus en plus complexe, entraînant une diminution significative du nombre de médicaments acceptés depuis les années 1990.³ Cette tendance à la baisse est attribuable à plusieurs facteurs notamment la complexité croissante des études cliniques.² En 2014, environ 15% des tentatives de développement parvenaient à franchir avec succès toutes les étapes nécessaires pour atteindre la commercialisation.⁴ Le développement d'une nouvelle molécule active peut coûter jusqu'à 1250 millions de dollars et durer jusqu'à douze ans.^{2,3,5,6}

Cette réalité souligne la complexité intrinsèque de la recherche et du développement de médicaments, qui nécessite des investissements importants en termes de temps, de ressources financières et d'expertise. La législation et les décideurs exercent une pression constante pour réduire les délais de développement et accroître les chances de réussite lors des essais cliniques. Dans ce contexte, les scientifiques et l'industrie continuent de rechercher des approches innovantes et des technologies émergentes qui pourraient contribuer à simplifier et à rationaliser le processus de développement de médicaments.^{7,8} Par projection, la compréhension de pathologie ou l'étude de biologie fondamentale subit des contraintes similaires qui freinent le progrès dans ces domaines. L'objectif est donc de trouver des moyens efficaces pour étudier plus précisément des systèmes en biologie fondamentale ou en recherche en pathologie et de tester de nouveaux moyens thérapeutiques.

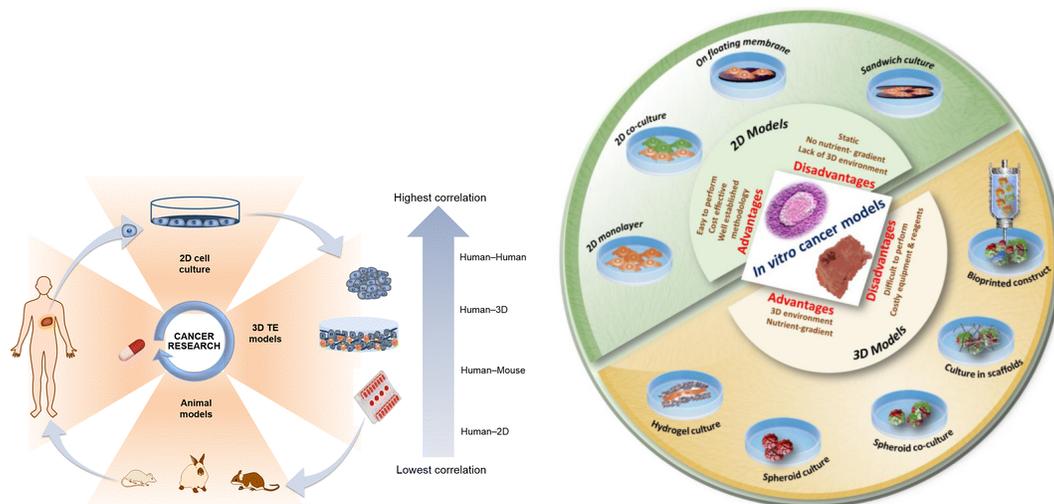
1.1.2 Les limites et avantages des modèles *in-vitro*

La recherche en biologie se base sur des modèles d'études, comme décrit sur la figure 1.1.A. L'étude directe du corps humain, sur des personnes en situation pathologique ou physiologique, soulève des problèmes éthiques et médicaux, mais fournit, pour l'instant, les résultats les plus précis.^{9,10} L'utilisation de modèles animaux, parfois modifiés génétiquement constitue une alternative pour s'approcher du système biologique humain.^{11,12} Néanmoins, au-delà des problèmes éthiques soulevées par la mise en place de ces tests, les questions de pertinence du modèle animal pour décrire la physiopathologie humaine est une question fondamentale et des nombreux biais induits par cette approche en recherche pharmaceutique ont été démontrés.¹³ Le principe des 3R élaboré en 1959 a défini des objectifs pour la diminution des expériences animales. Il s'agit de *réduire* l'expérimentation aux seuls cas indispensables, de *raffiner* l'expérimentation en diminuant la souffrance animale et de remplacer les modèles animaux par des méthodes *in-vitro*.

À l'opposé des modèles animaux, les modèles *in-vitro* offrent de nombreuses opportunités pour s'affranchir des problèmes éthiques et développer de façon parallélisée et standardisée, des plateformes d'étude et de criblage.^{7,8} Le modèle *in-vitro* le plus répandu est probablement la culture cellulaire en boîte de pétri ou en plaque à puits. Les modèles *in-vitro* sont des bio-artefacts dont le but est de mimer un compartiment tissulaire dans la perspective de servir de modèle représentatif pour tester une hypothèse biologique. Ils associent donc généralement des cellules vivantes à un microenvironnement, potentiellement au sein de chambres fluidiques ou équipé de capteurs. L'utilisation de modèles *in-vitro* permet une standardisation des paramètres de cultures du fait de méthodes de fabrications parallélisées et reproductibles, qui mènent à une dissémination plus large de ces modèles.

En revanche, ces modèles reconstruits ne permettent pas de reproduire la complexité des tissus ou d'un organe *in-vivo*. Ces modèles permettent donc d'adresser un nombre réduit de variables de l'étude ce qui implique également une réduction de la pertinence des résultats par l'éloignement au système physiologique humain.^{11,14,15} Le fait de passer de modèles *in-vitro* avec des cellules humaines, puis *in-vivo* sur des animaux, puis *in-vivo* sur des humains comme présenté sur la figure 1.1.A mènent aussi à de nombreuses difficultés dans l'interprétation et la transposition des modèles depuis l'animal vers l'humain.¹³ Lors du développement de médicaments, certaines molécules ne passent pas le stade de l'animal alors qu'elles auraient pu potentiellement fonctionner sur des humains, et au contraire, certaines molécules sont démontrées inefficaces sur des humains alors qu'elles l'étaient sur des animaux.¹⁶ L'utilisation de modèles proche de l'organe humain permettrait, à terme, de réduire l'importance de

l'étape animale.



(a) Schéma montrant la complexité et la pertinence des différents modèles pour l'étude de systèmes humains. 3D TE signifie ingénierie tissulaire 3D (*3D tissue engineering*). Issu de¹⁷

(b) Schéma des modèles existants de cultures cellulaires et tissulaires dans le cas de la recherche sur le cancer. Des plus simples à gauche en 2D (en haut) aux plus représentatifs à droite en 3D (en bas). Issu de¹⁸

FIGURE 1.1 – Schéma des modèles d'études en biologie et évolution des modèles de modèles

Un avantage majeur des modèles *in-vitro* réside dans leur capacité à réduire la dépendance aux modèles animaux,^{19–21} répondant ainsi aux préoccupations éthiques et aux exigences réglementaires.²² Les modèles pourraient aussi être implémentés à la suite de blessures, brûlures ou ablations, en accélérant la guérison de patients.^{23–27} À plus long terme, des modèles totalement fonctionnels pourraient même ouvrir la voie à la création d'organes fonctionnels destinés à la transplantation, surmontant ainsi les défis liés à la compatibilité et à la pénurie d'organes.^{28,29} Des preuves de concept encourageantes ont déjà été obtenues aussi bien sur des modèles animaux³⁰ que sur des tissus humains.²³ De plus, comme abordé précédemment, à courts et moyens termes, ces nouveaux modèles pourraient contribuer à l'accélération de la recherche médicale et la simplification du processus de développement de médicaments.^{7,8}

1.1.3 Les types de modèles et leur évolution

La figure 1.1.B décrit l'évolution des modèles de culture, des plus simples à gauche en 2D (en haut), aux plus représentatifs à droite en 3D (en bas). La culture en mono-couche d'un type cellulaire représente le cas le plus utilisé en culture cellulaire. Cependant, des différences significatives ont été constatées parmi les modèles en 2D et en 3D particulièrement en ce qui concerne la signalisation moléculaire, l'expression des protéines et des gènes, le phénotype cellulaire, la migration cellulaire, la viabilité cellulaire, la prolifération cellulaire et la réponse aux médicaments.^{31,32} Par ailleurs, l'absence d'une matrice extracellulaire adéquate en 2D pour soutenir et interagir avec les cellules peut également influencer la pertinence biologique de ces systèmes *in-vitro*.³³ La présence de plusieurs types cellulaires et d'une ou deux membrane poreuses améliore le système.^{34,35} Ces modèles restent statiques, majoritairement homogènes, sans gradient et sans arrangement 3D.

Les cultures en 3D, au contraire, permettent aux cellules d'atteindre des niveaux de fonctionnalité et d'organisation bien plus élevés par rapport à une culture en monocouche 2D.^{36–38} Plus ces environnements artificiels sont similaires à la réalité en termes de dimensionnalité, d'architecture, de composition cellulaire et de propriétés mécaniques, plus les cellules sont en mesure d'interagir avec leur environnement biochimique et cellulaire de façon similaire aux tissus réel et de recréer avec précision les fonctions biologiques spécifiques.^{19–21}

Entre autres, cette approche exige le choix judicieux de matériaux biocompatibles capables de

reproduire les propriétés mécaniques, la porosité, la dégradabilité et la plasticité des matrices extracellulaires. Une culture cellulaire dans un hydrogel compatible améliore les résultats par rapport à une culture équivalente en solution.^{39,40} De plus, les tissus ne sont pas des systèmes monolithiques isotropes, mais des constructions hétérogènes, présentent des contrastes cellulaires, mécaniques et chimiques. Le positionnement de plusieurs matériaux hétérogènes pour la formation de modèles est donc un objectif clé de ce domaine. Afin que ce concept soit pertinent, il faut que ces matériaux soient au moins déposés avec une résolution de l'ordre de la taille d'une cellule (10 μm).

L'augmentation de la cohérence et de la complexité des modèles *in-vitro* peut être atteinte en positionnant dans l'espace plusieurs types cellulaires. Par exemple, le placement de cellules spécifiques d'un organe ciblé avec des cellules endothéliales, chacune dans des sous-zones spécifiques, permettrait la création de modèles vascularisés.⁴¹⁻⁴⁴ De plus, la capacité à déposer des cellules souches aux endroits requis dans un bio-objet 3D constituerait une avancée significative pour la création de modèles plus proches de l'organe ciblé.⁴⁵⁻⁴⁸ Ce point rejoint le précédent dans la volonté de maîtriser précisément le placement de plusieurs matériaux et types cellulaires pour la création d'un modèle tissulaire.

L'intégration de sphéroïdes (agrégats de cellules), en tant qu'entités biologiques présentant des propriétés avancées par rapport aux cellules individuelles, améliorerait ces modèles.⁴⁹⁻⁵¹ Les sphéroïdes pourraient rapidement s'approprier les modèles *in-vitro* et générer de manière efficace les fonctions biologiques ciblées. L'utilisation de sphéroïdes peut être un avantage mais leur mise en forme est plus complexe et moins précise que celle de cellules en suspension dans un gel.

Les technologies de bioimpression 3D offrent des perspectives prometteuses pour accélérer le développement de nouveaux modèles. La bioimpression 3D est une technologie encore en développement qui permettrait de créer des tissus sur mesure en reproduisant avec précision des modèles biologiques 3D complexes, en supportant une culture cellulaire en surface (*scaffold*)ensemencée après impression⁵² ou à l'intérieur d'un hydrogel (*cell-laden*) avec les cellules encapsulées dès l'impression.^{21,53-55} Enfin, une fois le modèle imprimé, il pourra être implémenté dans une puce microfluidique pour incubation avec des nutriments, potentiellement sous forme de gradients, et stimuli. Cette étape est postérieure à la création de l'objet, étape sur laquelle nous nous concentrons dans ce manuscrit.

La bio-impression 3D réduirait considérablement le temps et les coûts associés au développement de médicaments en offrant des tests plus rapides et plus représentatifs de la réalité biologique. Cette avancée pourrait minimiser l'utilisation d'animaux dans la recherche. À long terme, cette technique pourrait faciliter la création d'organes fonctionnels pour la transplantation en surmontant les contraintes de compatibilité et de pénurie d'organes.^{28,29} Des preuves de concepts ont déjà été réalisées sur des animaux (dont études *in-vivo* de régénération d'os, cartilage, dent, peau³⁰) et humains (dont peau⁵⁶ et vessie²³).

En résumé, la bio-impression 3D permettrait la création de modèles tissulaires, pour autant qu'elle atteigne certains critères. Il faut qu'elle puisse déposer différents matériaux ou types cellulaires afin de reproduire l'hétérogénéité de l'organe ciblé. Ces matériaux doivent être mis en forme en 3D afin de respecter la géométrie externe (la surface du modèle) et interne (l'arrangement des différents matériaux et types cellulaires). La géométrie doit être fiable à l'échelle de grandeur d'une cellule, soit 10 μm . Dans le but d'identifier ou de concevoir une plateforme de bio-impression 3D capable de créer des modèles pertinents de tissus biologiques, nous retenons les deux critères suivants ; l'aspect multimatériau et la haute résolution.

En conclusion de cette première partie, l'objectif de ce travail est de contribuer aux développements de modèles microphysiologiques. La bioimpression 3D est une technologie prometteuse pour la réalisation de ces systèmes. Les critères d'hétérogénéité et de résolution des structures ont été mis en avant afin d'étudier les différentes plateformes de bio-impression 3D. Dans cette thèse, nous étudions donc les outils pour la création de modèles microphysiologiques et pour effectuer des tests *in-vitro*. Dans notre approche, nous ne développerons pas nous-mêmes les modèles d'études, mais développons un outil pour pouvoir les créer.

1.2 La bioimpression pour produire des modèles de tissus hétérogènes

La bioimpression 3D offre une approche technologique novatrice dans le domaine biomédical. Elle permet la fabrication précise de structures cellulaires tridimensionnelles en utilisant des bio-encres composées de cellules vivantes, de milieux biologiques et de biomatériaux de type hydrogels. La bioimpression 3D est le domaine qui applique l'impression 3D à la biologie et à la santé. Elle est basée sur les procédés d'impression 3D classiques, développés dans la première partie de cette section. Il s'agit ensuite d'adapter cette science à la biologie par l'utilisation de modèles cellulaires, de biomatériaux et de techniques biocompatibles. Les technologies principales de bioimpression 3D, à savoir la micro-extrusion, le jet d'encre et le transfert assisté par laser, sont présentées ensuite. La stéréolithographie, sur laquelle la technologie de la thèse est fortement basée, est mise en avant dans la dernière section. Le principe de base de chaque technologie est détaillé puis les différentes possibilités pour la création d'objets multimatériaux et haute résolution sont passées en revue. Dans l'étude des multiples plateformes d'impression 3D existantes, nous nous sommes concentrés la bio-impression de matériaux de type hydrogels qui sont à la base de nombreux modèles de microenvironnement tissulaire.

1.2.1 L'apport de la bioimpression

1.2.1.1 Le principe général de l'impression 3D classique

L'impression 3D est une méthode de fabrication additive. C'est une technologie qui permet de créer des objets tridimensionnels, traditionnellement par un procédé de construction couche par couche. La gamme de matériaux est très large et inclut les matériaux polymères, le métal, la céramique⁵⁷ ou des biomatériaux, ces derniers pouvant inclure des cellules.^{58,59}

Le processus d'impression 3D est décrit sur la figure 1.2.A. Il commence par une phase de conception assistée par ordinateur (CAO) qui permet de créer une image numérique de l'objet recherché. Les utilisateurs modélisent l'objet en 3D, en définissant ses dimensions, sa forme et sa structure. Le logiciel exporte le fichier en format numérique *STL*.

À l'aide d'un vectoriseur (*slicer*), le fichier est ensuite découpé virtuellement en couches fines, puis chaque couche en vecteurs, définissant ainsi la trajectoire que l'imprimante 3D suivra pour créer l'objet final. Le vectoriseur génère des instructions pour l'imprimante, indiquant la direction de la tête d'impression (ou du laser), la vitesse et les autres variables nécessaires à l'impression de chaque vecteur. Ces paramètres de l'imprimante 3D sont générés en fichier *Gcode*. Certaines imprimantes impriment des couches entières sans vecteurs,⁶⁰ et d'autres imprimantes utilisent encore des procédés plus spécifiques sans couche.^{61,62} Le vectoriseur doit être adapté à chaque méthode.

Le *Gcode* est enfin transmis à l'imprimante qui crée finalement la pièce. Le procédé d'impression 3D proprement dit implique de positionner un matériau à l'emplacement désiré et de le transformer (physiquement ou chimiquement) afin qu'il se maintienne mécaniquement.

Les avantages de l'impression 3D sont nombreux. Elle permet en un temps réduit de créer des objets tridimensionnels complexes, d'accélérer le processus de prototypage et de production, de réduire les déchets de matériaux, d'accéder à des bibliothèques de matériaux aux propriétés très variées et d'éliminer souvent le besoin d'outils coûteux.⁶⁵ Il est intéressant de noter que la phase de conception peut être avantageusement remplacée par une étape d'imagerie, par scanner 3D, photogrammétrie ou encore par tomographie X, puis de le reproduire à l'identique pour effectuer des essais sur le modèle imprimé.⁶⁶

Dans les parties suivantes, nous analysons en détail les aspects clefs de la bio-impression, à savoir l'ajout de cellules dans ou sur les objets imprimés et la polymérisation de biomatériaux avant de continuer vers l'étude des technologies de mise en forme par bioimpression.

1.2.1.2 De l'impression 3D à la bioimpression

Deux approches peuvent être considérées dans le cas de la bioimpression : dans une première approche, l'objet réalisé est un support de culture, permettant d'accueillir des cellules en surface (*scaffold*).⁵² Dans une deuxième approche, les cellules peuvent être incorporées dans le volume, dans le matériau utilisé pour l'impression (*cell-laden*).⁵⁵ Une fois imprimées, les cellules se développent dans

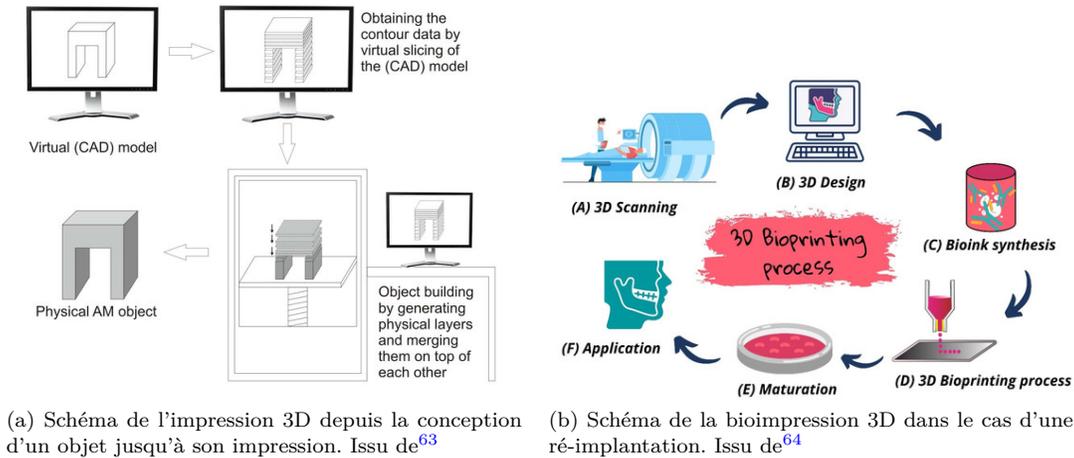


FIGURE 1.2 – Schéma du processus de l'impression 3D générale et plus particulièrement de la bioimpression 3D

l'objet 3D créé en fonction de l'application biologique choisie. Plus l'objet créé est proche de la réalité en termes de dimensionnalité, de facteurs biologiques, de positionnement des types cellulaires, de propriétés mécaniques, plus les cellules peuvent recréer des fonctions biologiques précises.^{37,38} Pour un modèle de type *scaffold*, la culture est surfacique, et c'est avant tout la géométrie 3D et les propriétés de surface qui sont mises en avant pour la création d'un modèle particulier.⁵²

Ces cultures peuvent s'effectuer avec des cellules de lignées immortalisées ou avec des cellules primaires prélevées sur des patients.^{67,68} Les cellules primaires donnent des résultats plus fiables par rapport à leur développement ou leur réponse à des molécules.⁶⁹ Les cellules de lignées, au contraire, fournissent des résultats plus reproductibles, mais plus éloignés de l'organe physiologique.

L'utilisation de plusieurs types cellulaires, comme la combinaison de cellules spécifiques (soma-tiques ou souches) d'un organe ciblé avec des cellules endothéliales, mène à des modèles d'étude plus représentatifs de l'organe physiologique.⁴¹⁻⁴⁸ Dans les deux cas de figures, il est important de définir de façon très précise et contrôlée les paramètres du microenvironnements auxquelles les cellules sont soumises. Ces conditions permettent de définir les conditions initiales de la culture qui permettront aux cellules de migrer, proliférer, le cas échéant se différencier et atteindre un stade fonctionnel similaire à celui de l'organe ou du tissu visé. De cette idée découle la nécessité de créer des microenvironnements hétérogène où les différents types cellulaires sont positionnés en accord avec le design de l'objet.

Pour la bio-impression 3D, le système d'impression doit être biocompatible, en gardant les cellules viables. Il faut être vigilant à l'impact de la lumière sur les cellules (pour les processus de photo-polymérisation des matériaux),⁷⁰⁻⁷³ du cisaillement sur les cellules (micro-extrusion, jet d'encre et impression assistée par microfluidique),⁷⁴⁻⁷⁸ de chocs cinétiques (impression assistée par laser (LIFT) et jet d'encre),^{79,80} de la présence d'espèces chimiques cytotoxiques (entre autres les photo-initiateurs en photo-polymérisation)⁸¹⁻⁸⁴ et du temps d'impression.^{79,85} Ces différents aspects sont abordés lors de la description de chaque technique.

1.2.1.3 Le choix de biomatériaux en bio-impression 3D

En bio-impression 3D, le matériau est appelé *bioencre* ou *biomatériau*. Ces matériaux sont d'origine biologique, comme la gélatine, l'acide hyaluronique, l'alginate, etc. ou synthétique, comme le Polyethylene Glycol, Diacrylate (PEGDA), le pluronic ou l'acide polylactique (voir tableau 1.1). Les polymères artificiels ont l'avantage d'être généralement peu coûteux, reproductibles et mécaniquement solides. Ils n'offrent cependant pas d'adhésion pour les cellules et ne sont pas dégradables. Les polymères artificiels au contraire présentent généralement des sites d'adhésion, en surface ou dans le volume. La variabilité est plus importante et ils sont généralement mécaniquement moins stables.⁸⁶⁻⁸⁸ La méthode d'extraction peut aussi conduire à des réponses biologiques variables, un phénomène connu avec le matrigel.⁸⁹

Matériaux	Origine biologique	Méthodes	Biodégradable	Adhésion cellulaire
Gélatine, méthacrylate (GelMA)	Oui	EBB, DBB, SLA	Oui	Oui
Acide hyaluronic, methacrylate (HAMA)	Oui	EBB, DBB, SLA	Oui	Oui
Alginate, méthacrylate (AlgMA)	Oui	EBB, DBB, SLA, LIFT	Oui	Non
collagen, méthacrylate (ColMA)	Oui	EBB, DBB, SLA	Oui	Oui
Agarose	Oui	EBB	Oui	Oui
Chitosan	Oui	EBB, SLA	Oui	/
Silk	Oui	EBB, DBB	Oui	Oui
Fibrin	Oui	EBB, DBB, LIFT	Oui	Oui
Méthyl cellulose	Oui	EBB, DBB	Oui	Non
Gellan gum	Oui	EBB	Oui	Non
Matrigel	Oui	EBB, DBB, LIFT	Oui	Oui
Decellularized ECM	Oui	EBB	Oui	Oui
Polyéthylene glycol, diacrylate (PEGDA)	Non	EBB, DBB, SLA	Non	Non
PVP	Non	EBB, DBB	Non	Non
PLGA	Non	EBB	Non	Non
Pluronic	Non	EBB, DBB, SLA	Non	Oui
PNIPAAAM	Non	EBB	Non	/
Poly(lactique acide) (PLA)	Non	EBB	Non	Non
Poly(e-caprolactone) (PCL)	Non	EBB	Non	Non

TABLE 1.1 – Tableau des principaux matériaux de bio-impression. Méthodes : EBB : *Extrusion based bioprinting* - Micro-extrusion, DBB : *Droplet based bioprinting* - Jet d'encre, SLA : stéréolithographie, LIFT : *Laser induced forward transfer* - transfert laser. Non-exhaustif. Construit à partir de⁸⁶⁻⁸⁸

Les matériaux de bio-impression 3D doivent posséder des propriétés spécifiques biologiques (afin de permettre la culture cellulaire sans être toxique), mécaniques (afin de maintenir leur forme 3D) et ils doivent pouvoir être mis en forme par le procédé d'impression choisi. Les spécificités de chaque méthode par rapport aux matériaux sont décrites dans les parties suivantes. Le tableau 1.1 montre plusieurs polymères d'origine naturelle modifiés avec des groupements acrylates afin de pouvoir être photo-polymérisés.

La bioimpression 3D peut aussi concerner l'impression de pièces en métal ou céramique pour l'impression de pièces inertes, mais avec des propriétés biologiquement pertinentes. Par exemple, sur la figure 1.2.B, le schéma du remplacement d'une mandibule personnalisée est décrit.⁶⁴ Les cellules et tissus ne coloniseront pas ou peu cet objet mais il peut tout de même faire partie du corps du patient et reproduire les fonctions de l'organe d'origine. Le matériau doit tout de même être biocompatible afin de ne pas engendrer de réponse immunitaire ou de cytotoxicité. L'imagerie couplée à l'impression 3D apporte une précision inégalée pour la médecine régénérative.

1.2.2 Extrusion

1.2.2.1 Principe général

La micro-extrusion 3D est une technique parmi les plus employées en bioimpression.⁹⁰ La méthode de micro-extrusion repose sur l'utilisation de buses extrudeuses, de diamètres généralement de l'ordre de quelques centaines de micromètres.⁹¹ Ces buses sont mises en mouvement suivant un système de déplacement triple axes au-dessus d'un substrat. Ces buses permettent de contrôler la quantité et la disposition des matériaux biologiques déposés. Plusieurs méthodes pour le contrôle de l'extrusion existe : avec des vis sans fin, avec de la pression ou avec un piston.⁹²

Le dépôt de matériaux biologiques est réalisé sous forme de cylindres juxtaposés. Ces cylindres sont assemblés pour former une couche, puis ils sont stratifiés pour former des structures tridimensionnelles. Le processus d'extrusion requiert un contrôle précis des propriétés rhéologique du matériau. Afin de stabiliser l'objet 3D, le matériau extrudé doit se solidifier une fois extrudé. Il peut être photo-polymérisé par une lampe externe, réticulé chimiquement (extrudé dans un bain réticulant ou projection d'un spray par exemple) ou solidifié par contrôle de ses propriétés rhéologiques.^{93,94} Ce dernier cas est le plus courant. Le matériau est très visqueux, de l'ordre de 100 - 10 000 mPa.s généralement,⁹⁵ voire solide, mais possède des propriétés rhéofluidifiantes sous cisaillement (*shear thinning*). Sous contrainte, il devient moins visqueux, facilitant son extrusion. Une fois extrudé, il redevient stable et garde sa forme. Afin d'obtenir une viscosité compatible avec l'impression, la méthode de micro-extrusion demande parfois la modification de la température d'extrusion, de la concentration en polymère, du poids moléculaire ou l'ajout de molécules tierces, ce qui rajoute des contraintes sur la formulation.⁹⁶ La micro-extrusion peut aussi impliquer l'utilisation d'un mécanisme de polymérisation externe par l'utilisation d'une source lumineuse dans le cas d'un matériau photosensible ou d'un agent de chélation (tel que l'utilisation de solutions concentrées en calcium pour l'alginate).⁹⁷ Nous voyons au travers de ces exemple que le procédé d'extrusion et les modalités de mises en forme sont intimement dépendantes des propriétés rhéologique et physico-chimiques des matériaux.

Afin de contourner les problématiques de tenue du matériau, la méthode de micro-extrusion en suspension (*Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels Bioprinting*) a été développée. Elle consiste à extruder le matériau imprimable dans un matériau support sacrificiel qui agit comme un échafaudage temporaire, permettant de maintenir la structure pendant l'impression.⁹⁸ Le matériau est extrudé par une buse dans le volume du matériau support dont les propriétés rhéologiques, notamment de viscosité, permettent le déplacement de la buse sans perturbation de la structure de la pièces imprimée. Une fois la bioimpression terminée, le matériau support peut être éliminé en laissant derrière lui une structure 3D ou être gardé pour servir au développement biologique.⁹⁹ Cette méthode facilite la création de structures 3D complexes, car le matériau à imprimer n'a pas de contrainte de tenue. Cela a par exemple permis l'extrusion de biomatériaux à très haute densité cellulaire.⁹⁹

Enfin, la micro-extrusion applique des contraintes mécaniques de cisaillement sur les solutions lors de l'extrusion dans la buse. Si des cellules sont en suspension dans le matériau, ces contraintes peuvent affecter leur viabilité. Il est important d'optimiser ces processus pour maximiser la viabilité cellulaire.^{78,100}

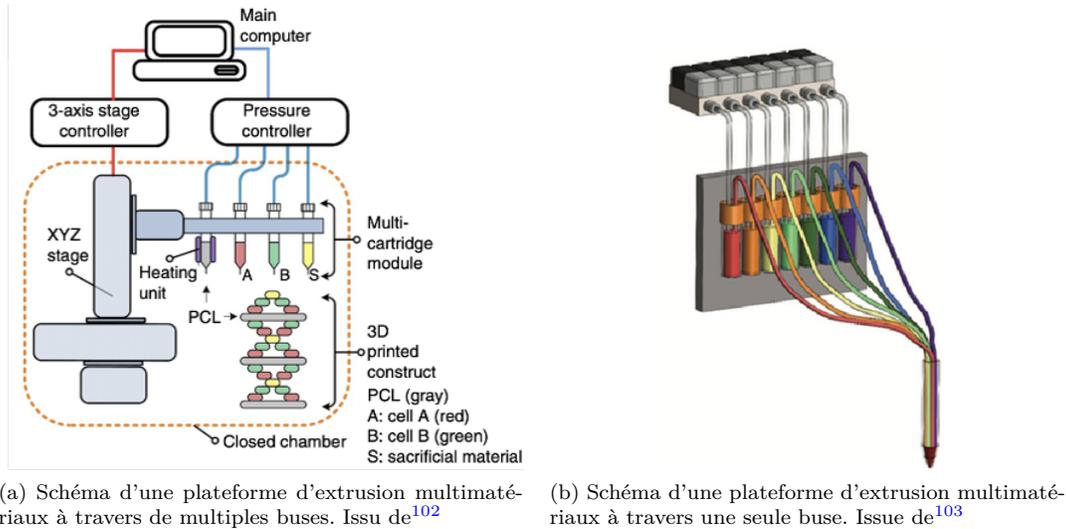
1.2.2.2 Extrusion multivoies

Un des avantages de l'extrusion provient de sa capacité d'impression de différents matériaux. La méthode la plus classique est la juxtaposition de plusieurs buses extrudeuses, mais il est aussi possible d'intégrer plusieurs canaux dans une même buse ou de coupler microfluidique et extrusion afin d'injecter successivement les différents matériaux.

L'extrusion multimatériaux avec plusieurs seringues La technique la plus simple en micro-extrusion est d'alterner entre plusieurs buses d'extrusion. Il est possible d'aligner plusieurs buses sur le système d'axes 3D et de les motoriser entre deux positions *passives* ou *actives*. Seule la buse active est positionnée pour extruder du matériau. Les buses sont ensuite alternées afin d'imprimer successivement les matériaux pour former l'objet multimatériaux.

La littérature est prolifique sur ce sujet. Par exemple, en 2014, Kolesky *et al.* ont démontré la

bioimpression de trois types cellulaires avec trois buses d'extrusion.¹⁰¹ Ils ont imprimé des objets mélangeant fibroblastes et cellules endothéliales pour la création de tissus irrigués. Ils ont pu réaliser cette expérience sans se soucier de la tenue des gels extrudés par une impression encapsulée dans un bloc de GelMA (*embedded printing*). De manière similaire, Kang *et al.* ont pu imprimer en 2016 des objets implantables *in-vivo*¹⁰² (voir Fig. 1.3.A). Ils ont imprimé des cellules de cartilages / muscles / os, du matériau de maintien en poly ϵ -caprolactone (PCL) et du matériau sacrificiel pluronic F-127.



(a) Schéma d'une plateforme d'extrusion multimatériaux à travers de multiples buses. Issu de¹⁰²

(b) Schéma d'une plateforme d'extrusion multimatériaux à travers une seule buse. Issu de¹⁰³

FIGURE 1.3 – Techniques multivoies pour impressions multimatériaux en extrusion

La proposition de Lee *et al.* d'une imprimante 3D multimatériaux par extrusion en open-source, au niveau pièces et logiciels,¹⁰⁴ démontre la maturité du domaine. D'autres équipes ont enfin développé des techniques plus complexes comme Hong *et al.* avec une imprimante cinq axes multimatériaux qui s'affranchit de l'impression planaire.¹⁰⁵

L'extrusion multimatériaux avec une seule tête multicanaux Il existe d'autres technologies d'extrusion multimatériaux qui n'utilisent qu'une tête d'impression. Liu *et al.* ont proposé une méthode en 2017¹⁰³ dans laquelle ils ont connecté jusqu'à sept canaux en verre ou en métal pour créer une buse d'extrusion multimatériaux (voir Fig. 1.3.B). Ces canaux sont chacun reliés à un réservoir de bioencres actionnés sous pression. Par une commande numérique d'un réseau de vanne, l'utilisateur peut décider d'extruder une seule ou plusieurs résines. Puisque chacune des résines est acheminée jusqu'à l'extrémité de la buse, le temps de changement de matériaux est extrêmement faible. L'utilisateur peut aussi décider d'extruder plusieurs matériaux en même temps afin de créer des mélanges ou des gradients. La contrainte reste le besoin d'avoir des matériaux avec des propriétés similaires d'extrusion, ce qui est rarement le cas. Rocca *et al.* ont développé une technologie similaire pour de l'extrusion encapsulée.¹⁰⁶ Cameron *et al.* ont utilisé en 2020 une imprimante commerciale Cellink avec plusieurs seringues pour les recombinaison en une seule seringue d'extrusion.¹⁰⁷ Par un système de connecteurs fluidiques, ils acheminent jusqu'à quatre différents matériaux, initialement contenus dans les quatre seringues individuelles de l'imprimante. Ils ont prouvé que cette méthode permettait la production d'un objet moins discontinu biologiquement et mécaniquement qu'avec plusieurs buses.

Certaines équipes ont développé des technologies plus originales. Gao *et al.* ont décidé de positionner deux buses de façon juxtaposée pour imprimer en simultané deux matériaux.¹⁰⁸ Ils peuvent imprimer un seul des deux matériaux ou les deux à la fois. Larson *et al.* ont eux combiné quatre matériaux dans une tête d'extrusion particulière.¹⁰⁹ Cette tête contient une couche extérieure enrobant les trois autres matériaux, deux canaux internes pour approvisionner les matériaux d'intérêt, et un matériau central transparent qui sépare les matériaux d'intérêt. L'ensemble de la tête peut être en rotation. Ils ont ainsi démontré l'impression d'une structure en double hélice (les deux matériaux d'intérêt) supportée par le matériau central et celui de la couche externe. Ces deux équipes ont pu caractériser leurs systèmes, mais leurs méthodes semblent peu applicables à des situations nouvelles.

L'extrusion multimatériaux à travers une seule seringue est une méthode efficace dans le cas de

matériaux compatibles. Cette méthode permet une extrusion continue avec des temps courts de changement et aucun problème d'alignement.

1.2.2.3 Couplage de la microfluidique et de l'impression par extrusion

La microfluidique est une science permettant la manipulation précise des fluides pour contrôler les phénomènes physico-chimiques aux échelles nano-micrométriques.¹¹⁰⁻¹¹⁴ En réduisant considérablement les volumes de réactifs nécessaires dans les expériences, la microfluidique permet notamment des économies substantielles des coûts par rapport aux méthodes traditionnelles.^{115,116} Cette science a été maintes fois décrite et nous faisons ici le choix de nous concentrer directement sur les technologies de bioimpression qui profitent de ses avantages. La microfluidique peut en effet être combinée à l'extrusion. Cela permet de sélectionner le fluide à extruder avec une capacité de multiplexage ou d'extruder une combinaison de plusieurs matériaux.

L'extrusion multimatériaux avec une tête d'impression microfluidique Avec des fluides peu visqueux, il est possible d'utiliser la microfluidique pour fabriquer des objets multimatériaux par extrusion. Les têtes d'impression peuvent être considérées comme des puces microfluidiques qui contiennent plusieurs canaux d'entrées et convergent vers un même canal de sortie. En choisissant d'appliquer une pression ou un débit sur l'un de ces canaux, sans en appliquer sur les autres voies, ce canal sera extrudé au profit des autres. L'avantage est qu'il n'y a qu'une seule buse d'extrusion.

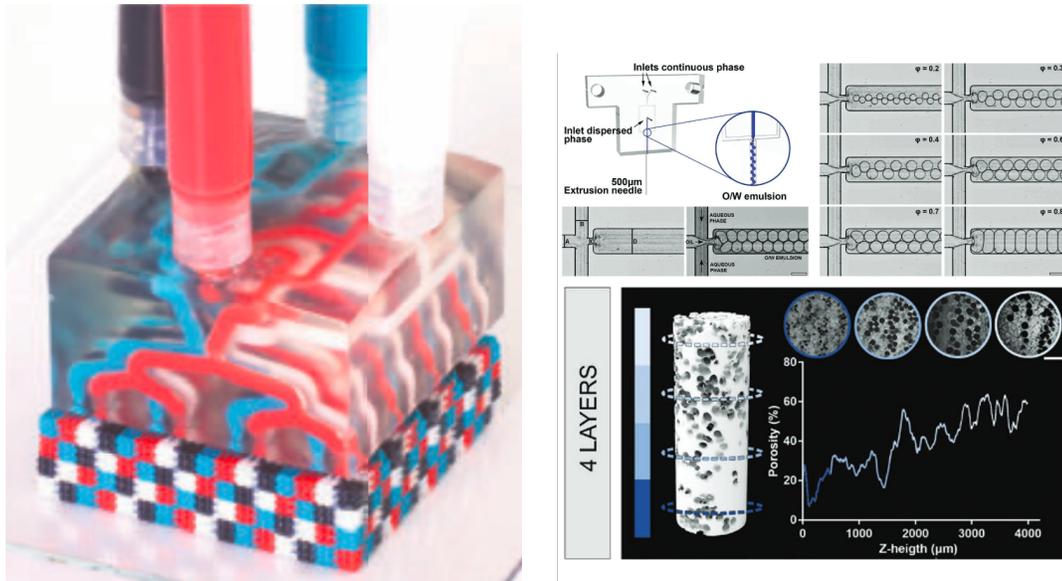
Serex *et al.* ont créé une tête avec une technologie planaire pour bénéficier de trois canaux d'entrée.¹¹⁷ Ils ont ensuite implémenté des jonctions en T ou des 'mixeurs' pour obtenir un seul canal d'extrusion. Cette approche leur permet d'imprimer un matériau, une combinaison de plusieurs ou un mélange. Ils ont par exemple montré une fréquence de changement entre deux fluides successifs de 2 Hz. Feng *et al.* ont proposé une plateforme similaire dans laquelle la tête peut tourner sur elle-même.¹¹⁸ L'entreprise *Aspect Biosystems* commercialise une tête d'impression microfluidique multimatériaux.

Skylar-Scott *et al.* ont optimisé cette idée *via* des têtes d'impression où quatre canaux fluidiques convergent¹¹⁹ (voir Fig. 1.4.A). Ils commandent en pression l'extrusion d'un des matériaux en évitant que ce matériau remonte dans les autres canaux. Par un jeu d'optimisation de la longueur des canaux, et donc de la résistance microfluidique, une pression équivalente est nécessaire pour l'extrusion de matériaux à viscosités différentes. Ils ont pu prouver une vitesse de changement de fluide extrêmement rapide jusqu'à 50 Hz. Ils ont choisi de positionner plusieurs buses équivalentes, toutes reliées de la même façon aux réservoirs, pour pouvoir extruder en parallèle. Ce procédé permet d'imprimer seulement des motifs identiques sous la forme de réseaux 2D. Pour des objets répétitifs, le gain de temps est important, mais cela semble une application de niche.

L'impression coaxiale et assistée par microfluidique La méthode de micro-extrusion coaxiale, assistée par la microfluidique, représente une méthode spécifique de la micro-extrusion 3D. Cette approche repose sur le dépôt simultané et précis de deux matériaux distincts à travers des buses coaxiales. Le matériau central, parfois une bioencore contenant des cellules, est entouré d'un matériau externe qui agit comme une matrice ou un support.¹²¹ Ce matériau externe peut aussi servir de réticulant pour le matériau interne.¹²² La microfluidique est utilisée pour réguler les flux liquides des matériaux à l'échelle microscopique à travers les buses, ce qui permet de maintenir une cohérence dans le dépôt des matériaux et d'obtenir des ratios de composition contrôlée.

Il est possible de combiner l'impression coaxiale avec l'extrusion multimatériaux microfluidiques. Dans ce cas, le fluide enveloppe peut rester identique. Les changements, couplages ou mélanges des fluides d'intérêt se font en amont de la juxtaposition avec l'enveloppe coaxiale.^{123,124}

De manière proche de l'impression coaxiale, il est possible d'emprisonner des gouttes d'un second matériau dans un fluide porteur polymérisable. À la place de flux continu de matériau central, le fluide intérieur est discrétisé et segmenté en gouttes dans le matériau porteur. Li *et al.* ont créé des objets multimatériaux, en changeant le contenu des gouttes.¹²⁵ Grâce aux procédés microfluidiques, ils ont pu imprimer un matériau porteur contenant des gouttes d'un matériau A, d'un matériau B ou de composition A-B variable. Il est aussi possible d'imprimer un matériau hétérogène contenant une densité variable de gouttes. Marcotulli *et al.* ont ainsi imaginé un procédé pour contrôler la porosité dans un gel¹²⁰ (voir Fig. 1.4.B) En effet, ils impriment avec une tête microfluidique en créant des gouttes de matériau soluble dans une enveloppe de biomatériau. Puis, ils développent l'objet imprimé



(a) Image d'une tête d'impression multimatériaux par séquentialisation microfluidique des matériaux. Issue de¹¹⁹

(b) Schéma et images de la création de gouttes de matériaux solubles dans une enveloppe de matériau polymérisable et objet 3D avec porosité variable sur quatre couches. Issus de¹²⁰

FIGURE 1.4 – Techniques microfluidiques pour impressions multimatériaux en extrusion

et obtiennent des parties creuses à la place des gouttes.

La micro-extrusion est la méthode la plus utilisée en bioimpression 3D.⁹⁰ Dans cette partie, nous avons pu voir que de nombreuses équipes ont pu l'appliquer à la création d'objets multimatériaux. Toutefois, le procédé d'extrusion peut être amélioré, car il possède une résolution limitée par la taille de la buse d'extrusion ou la difficulté d'obtenir des pièces à rapports de forme élevés. Il remplit donc un seul des deux objectifs pour la création de modèles (impression multimatériaux mais non haute résolution). Cette méthode est aussi majoritairement limitée aux matériaux à forte viscosité et aux propriétés de *shear-thinning*.

1.2.3 Impression de gouttes

1.2.3.1 Principe général

L'impression par jet d'encre en bioimpression 3D est une autre méthode de fabrication de structures tridimensionnelles à partir de biomatériaux. Cette approche repose sur le dépôt précis de gouttelettes de bioencre, composées de biomatériaux et parfois de cellules vivantes, sur une surface de construction, suivant un modèle de conception prédéterminé.

Le processus d'impression par jet d'encre met en œuvre des buses d'impression déplacées sur un système triple axes, comme en micro-extrusion. Par une impulsion appliquée à la buse, la pression intérieure augmente, provoquant l'éjection contrôlée d'une gouttelette par l'orifice de la buse. La taille et la vitesse de l'éjection des gouttelettes sont soigneusement régulées pour assurer une précision et une uniformité optimales dans le dépôt des matériaux. L'impulsion peut être soit thermique, avec la génération d'une bulle d'air, soit électrique avec le mouvement d'un composant piézo-électrique, soit électrodynamique avec un champ électrique, soit mécanique avec une microvalve.^{88,126,127} Une équipe a aussi pu créer une tête par procédé de lithographie qui aspire passivement du liquide avant de le déposer avec une précision micrométrique grâce à un système triple axes.¹²⁸

Les gouttelettes déposées fusionnent et durcissent sur la surface de construction, couche après couche, pour construire la structure finale. La solidification des gouttelettes se fait par des procédés similaires à ceux de l'extrusion : photo-polymérisation par une lampe extérieure, polymérisation

chimique ou solidification physique. La précision de l'impression par jet d'encre dépend de plusieurs facteurs, notamment la taille des gouttelettes, la fréquence d'éjection, la résolution du positionnement de la buse et la composition de la bioencre. À ses spécifications techniques se rajoute la sélection appropriée de la viscosité et la densité de la bioencre. Ces paramètres influencent directement la qualité, la résolution et la viabilité des structures tissulaires créées.^{127,129}

Généralement, l'impression par jet d'encre nécessite des viscosités spécifiques de l'ordre de 0.4-100 mPa.s et des propriétés de capillarité par rapport à la buse.^{130,131} D'autres procédés proches du dépôt de gouttes ont été développés pour imprimer à haute viscosité jusqu'à 25 000 mPa.s.¹³²

Grâce aux puces microfluidiques, il est possible de mixer plusieurs matériaux en amont de la formation de la goutte.¹³³ Il est aussi possible avec des procédés optiques de détecter la présence d'une cellule ou d'un sphéroïde dans les gouttes afin de les positionner sur un substrat ou de les éjecter vers un canal de déchets. Une puce microfluidique permet aussi de créer des gouttelettes d'un matériau dans un fluide porteur non-miscible. En reliant une telle puce à un système de déplacement 3D, il est possible de positionner ces gouttes sur un substrat, lui-même immergé dans ce même fluide porteur.^{133,134} Le concept est transposable à celui du jet d'encre habituel en transférant le concept de l'air au liquide.

L'impression 3D par jet d'encre est une méthode utile pour la création d'objets. Cependant, le matériau doit avoir la bonne viscosité et les bonnes propriétés de capillarité pour pouvoir être éjecté. La structuration 3D précise est difficile à atteindre à cause de l'écrasement des gouttes lors de leurs atterrissages sur l'objet. Les matériaux doivent toujours avoir des propriétés de maintien, comme en micro-extrusion, ce qui peut limiter leur choix. Enfin, la viabilité de cellules en suspension peut être impactée par le procédé d'éjection des gouttes.⁷⁹

1.2.3.2 Le jet d'encre multimatériaux

De façon similaire à la micro-extrusion multimatériaux, il est possible de positionner plusieurs têtes d'impression à jet d'encre de façon juxtaposée. Chaque tête contient un matériau différent. Puisque les buses ne sont pas en contact avec le substrat (ou la couche précédente), il est possible de garder toutes les buses au même niveau, au contraire de la micro-extrusion multibuses qui doit les motoriser en position verticale active ou passive.

Dès 2003, des travaux sont publiés sur des impressions multimatériaux avec la technique du jet d'encre.¹³⁵ Mironov *et al.* ont amélioré le procédé d'impression par jet d'encre contenant des agrégats cellulaires. Ils ont proposé, mais n'ont pas démontré, l'impression multimatériaux d'agrégats de cellules endothéliales d'une part et de cellules musculaires d'autre part. L'impression d'objets 3D multimatériaux par jet d'encre a entre autres été réussie par Sakai *et al.*¹³⁶ (voir Fig. 1.5.A). Ils ont imprimé des structures d'alginate qu'ils ont recouvertes de gélatine. Leur système permettait aussi de dispenser le polymère par une buse et le catalyseur réticulant par une autre buse.

En dehors de construction 3D, Jones *et al.* ont développé un système de dispense dans des plaques à puits.¹³⁹ Ce système permet de titrer de manière précise certaines solutions dans chacun des puits afin de mesurer l'influence de ces solutions sur des cultures cellulaires. Ils n'ont pas fait de construction 3D, mais ont employé de manière puissante la capacité de mitigation de leur système.

La projection de goutte est une méthode rapide capable de déposer plusieurs matériaux. Cependant, cette technique est toujours limitée dans sa capacité à créer des objets réellement 3D par l'aplatissement des gouttes à leur point d'atterrissage. La résolution du système reste aussi contrainte par la méthode d'éjection des gouttes. Enfin, les matériaux doivent posséder des propriétés compatibles avec la formation des gouttes (viscosités faibles et propriétés de capillarité adaptées à la buse). Par l'analyse de ces différentes limitations, la bio-impression 3D par jet d'encre n'atteint pas les objectifs fixés pour la création de modèles fonctionnels.

1.2.4 Transfert assisté par laser (LIFT)

1.2.4.1 Principe général

L'impression 3D par transfert assisté par laser (*Laser Induced Forward Transfer*, LIFT) est une méthode à part des deux précédentes par le fait qu'elle ne requière pas de buse. En LIFT, un laser est

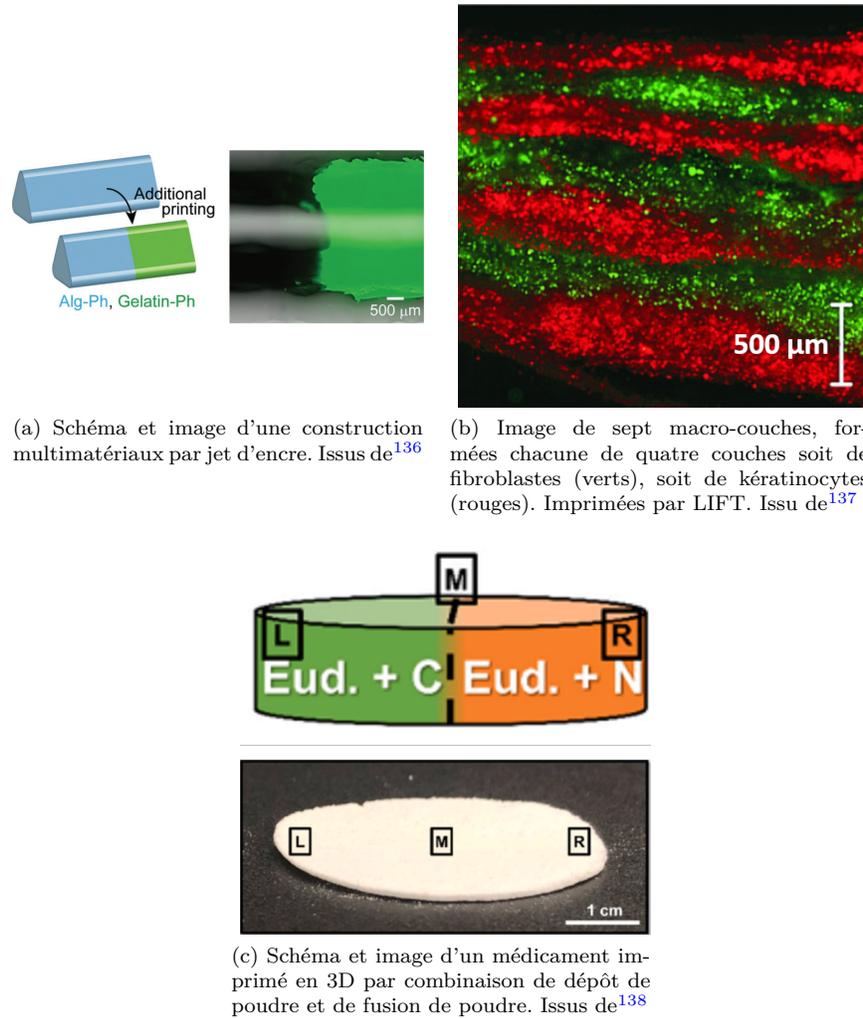


FIGURE 1.5 – Images d'impressions multimatériaux par jet d'encre, LIFT et techniques hybrides

focalisé sur une surface porteuse d'un film de bioencre, située au-dessus du substrat de l'objet 3D à créer. Le laser induit l'éjection contrôlée de microgouttelettes de bioencre, contenant potentiellement des cellules vivantes, sur le substrat.¹⁴⁰

Le processus LIFT met en œuvre un laser pulsé qui est focalisé sur une plaque mince de matériau absorbant. Sous cet absorbant est placée une couche de bioencre. Lorsque le laser est activé, il génère une onde de choc thermique au point de l'impact qui propulse une gouttelette de bioencre de manière précise et dirigée vers le substrat.^{80, 141} La taille, la vitesse et la trajectoire de l'éjection des gouttelettes sont soigneusement contrôlées en ajustant les paramètres du laser, la composition et la viscosité de la bioencre et la distance entre la source du laser et la surface de construction.⁸⁰ Les gouttelettes éjectées se déposent sur la surface de construction et fusionnent pour former une structure tridimensionnelle. Cette méthode permet de différencier le matériau source de l'objet final. Il est par exemple possible de viser des cellules individuelles sur la surface source afin d'obtenir un objet final à haute densité cellulaire.^{142, 143}

1.2.4.2 L'impression 3D par transfert laser multimatériaux

La technique LIFT permet d'atteindre une résolution de l'ordre de la cellule unique, ce qu'elle est la seule à permettre. Cependant, sa capacité à créer des structures multimatériaux est limitée, car chaque matériau doit être préparé et positionné sur une plaque spécifique au-dessus du substrat. Imprimer

plusieurs matériaux nécessite de préparer autant de plaques ou de sectionner la plaque en plusieurs parties hétérogènes.

En 2010, Guillotin *et al.* ont démontré la capacité d'impression de plusieurs matériaux, à savoir des cellules endothéliales marquées en rouge ou en vert.¹⁴² Ils ont pu montrer la création de deux cercles concentriques de couleurs différentes. De la 2D à la 2.5D, Koch *et al.* ont préparé une plaque avec des fibroblastes et des kératinocytes¹³⁷ (voir Fig. 1.5.B). Ils ont imprimé quatre couches de kératinocytes puis quatre couches de fibroblastes et ont recommencé pour obtenir sept macro-couches. Cette méthode a permis la reconstruction d'un modèle de peau. La construction d'objet 3D ne semble pas réalisable à ce point.

La technologie LIFT fait face à certaines limites, comme la complexité de création de la plaque absorbante, qui doit être recouverte d'une couche de biomatériaux. Il est aussi difficile de créer des objets réellement 3D car, comme en jet d'encre, l'écrasement de la goutte à l'atterrissage sur le substrat complique les rapports de forme. En revanche, cette technologie est bien adaptée à la création d'objets surfaciques, comme la peau.¹³⁷ Enfin, la création d'objets multimatériaux est compliquée par le besoin d'échanger entre plusieurs surfaces absorbantes supportant les biomatériaux. Par l'analyse de ces différentes limitations, la bio-impression 3D par LIFT n'atteint pas les objectifs fixés pour la création de modèles fonctionnels.

1.2.5 Technologie hybride multimatériaux

D'autres équipes ont atteint l'impression 3D multimatériaux en combinant plusieurs technologies. Ghosh *et al.* ont décrit des combinaisons d'extrusion 3D avec de l'électrospinning.¹⁴⁴ L'électrospinning est une méthode qui permet l'extrusion de grandes fibres d'un matériau par création d'une différence de potentiel. Cette méthode est adaptée pour les applications biologiques où les fibres jouent un rôle clef,¹⁴⁵ mais permet difficilement la création d'objets 3D. La jonction des deux techniques, micro-extrusion et électrospinning, permet un meilleur contrôle de la porosité et du taux de gonflement du matériau final. L'extrusion permet un contrôle 3D des objets et l'électrospinning ajoute une dimension biologiquement favorable au développement cellulaire (os, nerf, muscle, etc.).

Kopp *et al.* ont associé des techniques de dépôts de poudre (electrographical powder application, EPA) avec la fusion de poudre par laser (powder bed fusion - laser beam, PBF-LB) pour imprimer des médicaments en 3D¹³⁸ (voir Fig. 1.5.C). Ils ont intitulé leur technique EPA-PBF-LB. L'EPA permet de déposer des couches minces de molécules actives. Les couches sont assez minces pour être fusionnées par un laser CO₂. Ils ont pu imprimer un comprimé mélangeant caféine et nicotinamide sans mesurer d'altération des molécules actives. Cette application est destinée à la médecine plutôt qu'à la bio-impression et il semble que cette technique ne soit pas adaptable à une grande diversité de matériaux. Les hydrogels, dans lesquels ou sur lesquels les cultures cellulaires peuvent prendre place, ne sont pas imprimables ainsi.

Dans cette partie, les technologies phares de la bioimpression que sont la micro-extrusion, le jet d'encre et le transfert assisté par laser ont été présentées. Nous avons pu étudier leur capacité à être adaptées aux impressions multimatériaux de manière plus ou moins complexes et adaptables à une variété d'applications. Le tableau 1.2 fournit la résolution typique de chacune des techniques d'impression 3D adaptée à la biologie.

Nous avons pu mettre en lumière qu'aucune de ces techniques n'était totalement versatile et satisfaisante sous le prisme des bio-impressions multimatériaux - haute résolution - structures 3D complexes. La micro-extrusion est actuellement la technique la plus utilisée et produisant les meilleurs résultats. Ses capacités d'impression multimatériaux sont bien avancées, d'autant plus par l'utilisation de têtes d'impression microfluidique. Cette technique reste cependant limitée par la méthode de solidification des matériaux et par sa résolution. Dans les parties suivantes, nous étudions les capacités de bio-impression par stéréolithographie.

Micro-extrusion	Jet d'encre	Transfert laser	Stéréolithographie	Deux photons
$\simeq 100 \mu\text{m}$	$\simeq 50 \mu\text{m}$	$\simeq 30 \mu\text{m}$	$\simeq 20 \mu\text{m}$	$< 1 \mu\text{m}$

TABLE 1.2 – Tableau présentant les résolutions typiques des techniques de bioimpression 3D^{53,146}

1.2.6 Approches Photo-lithographiques

1.2.6.1 Principe général

Dans cette partie, nous détaillons le principe des technologies reposant sur la photopolymérisation de matériaux photo-sensibles, plus particulièrement la stéréolithographie et de la polymérisation deux photons (2PP). Cette présentation nous permettra ensuite d'étudier les technologies de stéréolithographie multimatériaux dans les parties suivantes.

Photo-initiateur, photo-réaction et fonctionnalisation des matériaux

La réticulation des polymères En stéréolithographie, le matériau doit posséder des propriétés photo-réticulantes. Le plus souvent, un photo-initiateur est ajouté afin d'amorcer la réaction. Une fois la réaction initiée par les photo-initiateurs, les chaînes de polymères réagissent entre elles afin de former un réseau réticulé. Pour les acrylates, les photo-initiateurs doivent créer des radicaux libres.¹⁴⁷ Ces radicaux permettent une polymérisation radicalaire en chaîne permettant de lier de façon covalente les chaînes de polymère.

Les radicaux libres peuvent aussi actionner des réactions thiolènes.¹⁴⁸ Dans ces réactions, un polymère possède un groupement *thiol* et un autre polymère une fonction *alcène*. Par une réaction radicalaire, la double liaison C=C réagit avec l'atome de soufre. L'hydrogène libéré devient un radical qui peut continuer la propagation de la polymérisation. La réaction est cyclique ce qui permet la polymérisation globale de l'objet à fabriquer.

Enfin, certaines méthodes de polymérisations reposent sur la chimie des époxydes. Le polymère d'intérêt est formé par réaction entre des chaînes fonctionnalisées avec des groupements amines, hydroxyles ou thiols qui vont réagir avec le groupement époxyde de façon à former des liaisons covalentes et ainsi aboutir au polymère final.¹⁴⁹

En bioimpression 3D, la majorité des technologies s'appuient sur la chimie des acrylates avec des polymères comme le PEGDA (Poly(éthylène glycol) diacrylate), le GelMA (Gélatine-méthacrylate), HA-MA (acide hyaluronique-méthacrylate), colMA (collagène méthacrylate), etc. Dans ce manuscrit, ce sont aussi les polymères sur lesquels nous nous sommes focalisés.

Les photo-initiateurs pour acrylates Les photo-initiateurs, comme leur nom le précise, peuvent initier la réaction de polymérisation avec une impulsion lumineuse, en créant des radicaux libres. La plupart des photo-initiateurs réagissent dans l'UV, mais certains peuvent réagir dans le domaine du visible proche de 400 nm comme le LAP⁸¹ ou plus loin dans la gamme du visible comme l'éosine.¹⁵⁰

Dans certaines situations, une interaction lumière-matériau existe dans la gamme des UVs profonds permettant de réticuler le matériau en réagissant directement avec les groupes acrylates de polymères.¹⁵¹ Cette méthode n'est pas adaptée à l'encapsulation de cellules qui sont dégradées par les UV lointains. Au contraire, avec des longueurs d'ondes plus élevées vers l'infrarouge, il est possible de réticuler thermiquement grâce à la chaleur transférée par le laser.¹⁵² En revanche, la chaleur peut aussi être dommageable pour des tissus biologiques. Néanmoins, ces deux méthodes sont utiles, car elles s'affranchissent de l'usage de photo-initiateurs.

Stéréolithographie (SLA) L'impression en stéréolithographie (SLA) est une technique de bioimpression 3D qui permet la fabrication précise de structures tridimensionnelles à partir de biomatériaux. Cette approche repose sur la photopolymérisation de résines liquides à l'aide d'un laser, pour construire progressivement l'objet souhaité. Au contraire de la micro-extrusion et du jet d'encre, il n'y a pas de buse en SLA.

Une résine photosensible, contenant potentiellement des cellules, est contenue dans un réservoir. Une plateforme substrat est positionnée, depuis le dessus, à faible distance du fond du réservoir (typiquement 50 µm). Un laser est ensuite utilisé pour durcir sélectivement la résine en suivant les coordonnées spécifiques du modèle CAO. Le laser atteint la résine par le dessous du bac, qui est transparent. Le laser polymérise la résine contenue entre le fond du bac et la plateforme. L'objet polymérisé adhère

uniquement à la plateforme et non au bac. Puis la plateforme est remontée afin qu'une nouvelle épaisseur de résine liquide soit disponible entre le fond du bac et la couche précédente. Le processus est répété pour que, couche par couche, la structure tridimensionnelle soit formée. La plupart des méthodes utilisent un laser, mais certaines techniques polymérisent à l'aide d'un objectif de microscope, d'un rétroprojecteur ou en réflexion sur une matrice de micro-miroirs afin de projeter une image 2D.^{153,154} Dans les derniers cas, la polymérisation est alors directement réalisée par couches entières et non par déplacement vectoriel d'une source ponctuelle. Une fois l'objet créé, il est décroché de la plateforme, puis développé afin de retirer la résine liquide non polymérisée. Puis, il peut être placé dans un four et/ou soumis à une source lumineuse afin d'activer les groupements chimiques n'ayant pas réagi lors de l'écriture et de finaliser la réaction de réticulation.

La première version de la stéréolithographie,¹⁵⁵ et certaines techniques actuelles,^{156,157} fonctionnent en projetant le laser sur le dessus d'un réservoir contenant la résine photosensible. Le laser polymérise cette couche mince. Puis le porte-échantillon s'enfonce dans le réservoir pour qu'une nouvelle couche de résine recouvre la surface de l'échantillon en cours de construction. Cette technique a l'inconvénient de nécessiter un grand réservoir de matériau. L'objet est aussi plus difficile à développer, car il est totalement immergé dans la résine. À ce jour la majorité des systèmes de stéréolithographie utilise une configuration inverse où le porte-échantillon est placé au-dessus du réservoir. Le laser traverse alors la surface inférieure de ce dernier et l'objet est créé à l'envers. La construction est réalisée par polymérisation de la couche située entre le fond du réservoir et la surface du porte-échantillon située à faible distance au-dessus de ce dernier (typiquement 50 μm). Cette configuration permet un meilleur contrôle de l'épaisseur des couches de matériaux et permet de travailler dans des volumes de matériaux limités.

Les spécifications techniques de l'impression par stéréolithographie incluent la sélection précise de paramètres tels que la puissance du laser, la longueur d'onde, la vitesse de balayage et la forme du spot laser.⁶⁰ Ces paramètres influencent la résolution, la précision et la qualité de la structure imprimée, ainsi que la viabilité des cellules encapsulées.^{79,153} La résolution typique de la stéréolithographie varie généralement entre 10 et 100 micromètres, ce qui permet la création de structures complexes comportant des détails.^{60,158} Certaines équipes arrivent à atteindre la résolution de 0.6 μm par projection d'une image 2D.⁶⁰ Cette technique oblige à insoler le biomatériau, contenant potentiellement des cellules en suspension, ce qui peut affecter leur devenir et leur viabilité.⁷⁰⁻⁷³

Les biomatériaux, et les photo-initiateurs, utilisés doivent être compatibles avec la photopolymérisation et répondre aux exigences de viabilité cellulaire et de propriétés mécaniques.¹⁵⁹ Nous détaillons la photopolymérisation des biomatériaux via des photo-initiateurs dans les paragraphes suivants.

L'impression en stéréolithographie offre des avantages significatifs, notamment la haute résolution et la possibilité de créer des objets stables mécaniquement. Les biomatériaux imprimés en SLA ont généralement de meilleurs rapports de forme que ceux produits par micro-extrusion, jet d'encre ou transfert par laser.^{160,161}

Lithographie multi-photonique L'impression par polymérisation à deux photons (*two-photon printing* ou *2PP*) est une méthode dérivée de la stéréolithographie 3D qui permet la création hautement précise de structures tridimensionnelles.

Cette approche se fonde sur l'utilisation d'un laser pulsé ultra-focalisé qui déclenche une réaction de polymérisation à deux photons dans une résine photosensible.^{146,162} Le laser est concentré sur un point spécifique dans le volume de la résine, créant une réaction de polymérisation tridimensionnelle autour de ce point focal. La polymérisation a lieu seulement lorsque la densité de puissance est assez élevée pour que la réaction de photopolymérisation soit activée par deux photons simultanément. La réaction de polymérisation peut donc avoir lieu en tout point de l'espace où le faisceau laser est focalisé et la construction de structures tridimensionnelles ne requiert pas de stratégie d'empilement de couches comme dans le cas de la SLA. Pour l'utilisation d'un mécanisme fonctionnant classiquement à 400 nm, le laser utilise une longueur d'onde à 800 nm (ou proche de cet ordre de grandeur en prenant en compte les effets non linéaires).¹⁶³

La focalisation précise du laser et le contrôle de la puissance lumineuse permettent de polymériser des points de polymère avec une résolution submicrométrique.¹⁴⁶ La taille de voxel peut atteindre 200 nm dans le plan XY et 300 à 400 nm suivant l'axe optique. L'objet polymérisé est maintenu par la résine liquide l'entourant comme en extrusion incorporée (*embedded microextrusion*).

Les spécifications techniques de l'impression en polymérisation deux photons comprennent la sélection

tion minutieuse des paramètres tels que la puissance du laser, la longueur d'onde, la vitesse de balayage et l'intensité lumineuse. Ces paramètres influencent la résolution, la précision et la qualité de la structure imprimée. La haute intensité présente au point de polymérisation rend difficile l'encapsulation de cellules dans le matériau. Aussi, un voxel typique $((200 \text{ nm})^3)$ est si petit qu'une cellule ne peut pas être contenue, au contraire d'un voxel d'autres technologies $((20 \mu\text{m})^3)$ en SLA classique, $(50 \mu\text{m})^3)$ en jet d'encre ou micro-extrusion). Ovsianikov *et al.* ont tout de même réussi à imprimer un gel avec des cellules en suspension en augmentant la largeur du point focal. Ils ont pu prouver que les dommages sur les cellules provenaient majoritairement des composés chimiques plutôt que l'impact direct du laser sur les cellules.¹⁶⁴ Finalement, cette technique est aussi adaptée à la structuration de surface, la création de porosité contrôlée ou de membranes.^{162, 165, 166}

La polymérisation à deux photons est une technique ultra-haute résolution qui permet de descendre en dessous de la longueur d'onde en termes de dimensions de voxel. En termes d'application biologique, le 2PP est surtout utilisé pour réaliser des structures échafaudages (*scaffold*).

Concepts originaux de photopolymérisation Dans cette partie, nous étudions les concepts de photopolymérisation avec des méthodes originales. Ces techniques permettent d'accélérer l'impression via un renouvellement efficace de la solution polymérisable, de s'affranchir de la plateforme se déplaçant sur l'axe Z en polymérisant dans le volume ou de combiner plusieurs technologies.

Afin d'augmenter la vitesse d'impression, des équipes ont développé l'impression en continu (Continuous printing en anglais).¹⁶⁷ Une des limitations de la SLA est le mouvement de la plateforme entre chaque couche en Z. Usuellement, à la fin de l'impression d'une couche, la plateforme est relevée, afin que de la résine liquide puisse réapprovisionner la zone d'impression, puis redescendue pour définir l'épaisseur de la couche de résine à polymériser dans la couche suivante. En impression continue, la plateforme est relevée en continu, et la résine est aussi approvisionnée en continu. Cela peut avoir lieu si la polymérisation ne se fait pas au contact d'une surface. Dans le cas d'une plateforme imprimant les pièces au fond d'un réservoir, l'illumination se fait par le bas du bac qui doit être transparent. Si le bac crée une inhibition de la polymérisation, la résine au contact du bas du bac reste liquide et peut donc se renouveler par simple flux.¹⁶⁸ Walker *et al.* ont mis en place un procédé similaire en ajoutant une couche d'huile entre le matériau polymérisable et le fond du bac.¹⁶⁹ Ainsi, le matériau polymérisé solide n'a pas d'effet de succion avec le fond du bac puisqu'il est seulement en contact avec un liquide. La plateforme de soutien peut donc se relever de manière continue. Une couche d'huile permet aussi d'évacuer la chaleur due à la photopolymérisation. Enfin, Lipkowitz *et al.* ont proposé une méthode où la solution est réapprovisionnée sous l'objet à la fois par le bac, mais aussi par l'intérieur de l'objet lui-même.¹⁷⁰ Les objets sont dessinés afin de contenir des canaux qui s'impriment à l'intérieur, contenu dans le design CAO. L'approvisionnement en matériau se fait par ces canaux, au centre de l'objet. Ces méthodes ont permis un gain de temps d'écriture significatif, de 5 à 10 par rapport à la SLA classique, d'après les auteurs.

Cao *et al.* ont réussi à dépasser les limites de la haute résolution contrainte par la taille du faisceau optique.¹⁷¹ Deux couleurs sont projetées à travers un objectif. Un faisceau rouge (780 nm) peut polymériser le matériau, alors qu'un faisceau vert (532nm) inhibe la réaction. Par activation du vert, malgré l'activation continue du rouge, la polymérisation est stoppée. En illuminant avec un anneau de lumière verte, seule la partie centrale de la lumière rouge, qui n'est pas superposée à du vert, peut polymériser le matériau. Ainsi, la taille du spot optique n'est pas limitante puisque c'est la combinaison des couleurs qui régit l'activation de la polymérisation. L'équipe a pu fabriquer des structures de 39 nm de large. Cette technique est impressionnante en termes de résolution, mais est très spécifiquement contrainte en termes de matériau.

Une autre technique a été développée par Shusteff *et al.* pour polymériser dans le volume d'un bac de matériau.⁶² L'illumination se fait par trois cotés orthogonaux de la cuve de matériau. La photopolymérisation se fait à la limite du seuil de polymérisation. Le motif de chaque face est un niveau de gris. La combinaison des images se recoupant en 3D crée un cumul de dose permettant d'atteindre le seuil de polymérisation. L'illumination par une seule face ne permet pas de polymériser. Cette technique requiert un calcul spécifique du motif en niveaux de gris. Cette méthode utilise un photo-initiateur spécifique qui augmente la non-linéarité du processus photochimique afin de mieux le contrôler. Cette méthode reste limitée en termes d'objets 3D complexes.

La xolographie est une autre technique de photopolymérisation.⁶¹ Cette technique combine deux faisceaux lumineux à deux longueurs d'onde. Une couleur permet la modification de la molécule de

photo-initiateur. La seconde permet l'activation du photo-initiateur. Seule la combinaison des deux faisceaux permet la photopolymérisation. En projetant dans une cuve par deux cotés, il est possible de créer une pièce 3D dans le volume, sans avoir besoin de platine XYZ. La lumière activatrice projette un plan de lumière à l'avant de la cuve. Par une face perpendiculaire, le motif de l'objet à ce plan est transmis. Puis, de manière continue, le plan de lumière se déplace vers l'arrière de la cuve. Le motif est modifié au fur et à mesure pour correspondre au plan illuminé. Cette méthode est remarquable par sa possibilité de polymérisation dans le volume du matériau. Elle reste spécifique à des catégories très particulières de photo-initiateurs. Stuer *et al.* ont proposé une approche similaire où le plan illuminé ne bouge pas. Dans cette approche, le matériau est en mouvement dans une puce fluïdique.¹⁷² Le motif dans la seconde lumière est modifié au fur et à mesure du mouvement du matériau par le flux. Cette méthode se rapproche de l'impression en flux décrite auparavant.

Enfin, d'autres équipes ont combiné l'impression stéréolithographique classique et deux photons.^{167, 173} Cela permet d'imprimer des motifs macroscopiques et nanoscopiques sur la même plateforme. Par exemple, Sarker *et al.* ont imprimé une pièce macroscopique contenant des canaux fluïdiques en SLA, puis des aiguilles microscopiques reliés à ces canaux en 2-photons. Les approches hybrides permettent parfois de s'affranchir des difficultés des technologies prises seules. Ici, la faible vitesse de l'impression deux photos et la résolution parfois limitée en SLA.

Nous avons ici développé différentes techniques aux méthodes spécifiques. Ces techniques permettent de gagner en vitesse, en résolution ou de s'affranchir de l'impression couche par couche. Cependant, pour la création de modèles biologiques aux contraintes élevées, la vitesse est rarement un point clef, la résolution atteinte par la SLA est suffisante et l'impression couche par couche satisfaisante. Ces différentes technologies ne permettent donc pas de révolutionner le domaine de la bioimpression 3D.

Polymérisation en flux : *Stop - Continuous flow lithography* Nous développons ici le concept de la polymérisation en flux (*Stop or Continuous flow lithography*) qui prend part dans une puce microfluïdique. En 2005, Dendukuri *et al.* ont créé des structures en photo-polymérisant des gouttes d'un matériau polymérisable encapsulé dans un fluïde porteur dans un canal microfluïdique.¹⁷⁴ Dans un espace non contraint, ces gouttes sont rondes, et dans un canal fin, elles prennent une forme ovoïde (voir Fig. 1.6.A). En éclairant ces objets, il est possible de les figer dans leur forme (sans polymériser le fluïde porteur qui est photo-inerte) puis de les collecter. Les parois des zones dans lesquelles ces objets sont créés ne doivent pas avoir d'affinité avec ces objets afin qu'ils puissent continuer d'avancer dans les canaux. Ce procédé, bien qu'ingénieux limitait la diversité de formes des pièces aux disques et ovoïdes.

Dendukuri *et al.* à nouveau ont proposé un concept en 2006 pour créer des pièces plates avec des formes 2D choisies.¹⁷⁶ Ils ont positionné un masque au-dessus de l'objectif du microscope. Le faisceau n'éclairait plus toute une section de tube ou toute une chambre fluïdique, mais transmettait le motif du masque à la solution polymérisable. L'ensemble de la puce est remplie de la solution photopolymérisable, mais seulement une partie d'une chambre est insolée. Il n'y a plus besoin de créer des gouttes ce qui peut simplifier l'expérience. Ils ont ainsi pu créer des motifs complexes en 2D. Toujours dans la photopolymérisation de gouttes, en 2023, une équipe a proposé un concept original en créant des gouttes avec des formes de *méduses* dans un fluïde porteur.¹⁷⁷ Avec l'aide d'une impulsion, lors de l'encapsulation des gouttes, la partie avant crée une cloche et la partie arrière une queue. Ils ont aussi créé des méduses en deux matériaux capables de se contracter et de se déplacer sous l'influence d'un laser.

Il est possible de stopper le flux pour permettre une photopolymérisation plus homogène. La polymérisation en flux continu devient la polymérisation en flux stoppé (*Stop flow lithography* en anglais). Tan *et al.* ont ainsi créé des pièces encodées avec des codes barres pour identification grâce à des motifs 2D précis.¹⁷⁸

La polymérisation en flux a été étendue à la photopolymérisation à deux photons pour la création d'objets plus petits.¹⁷⁵ Plutôt qu'une insolation planaire comme décrite précédemment, la polymérisation se fait au point focal du faisceau (voir Fig. 1.6.B). Le faisceau optique est allumé et la polymérisation du matériau commence au point focal, puis l'objet polymérisé est emporté par le flux fluïdique alors que la photopolymérisation continue à son contact au point focal. Cette technologie crée ainsi des cylindres dont la longueur est définie par la combinaison temps d'exposition - vitesse fluïdique. Avec la résolution atteignable par la polymérisation deux photons, il est possible de créer des objets

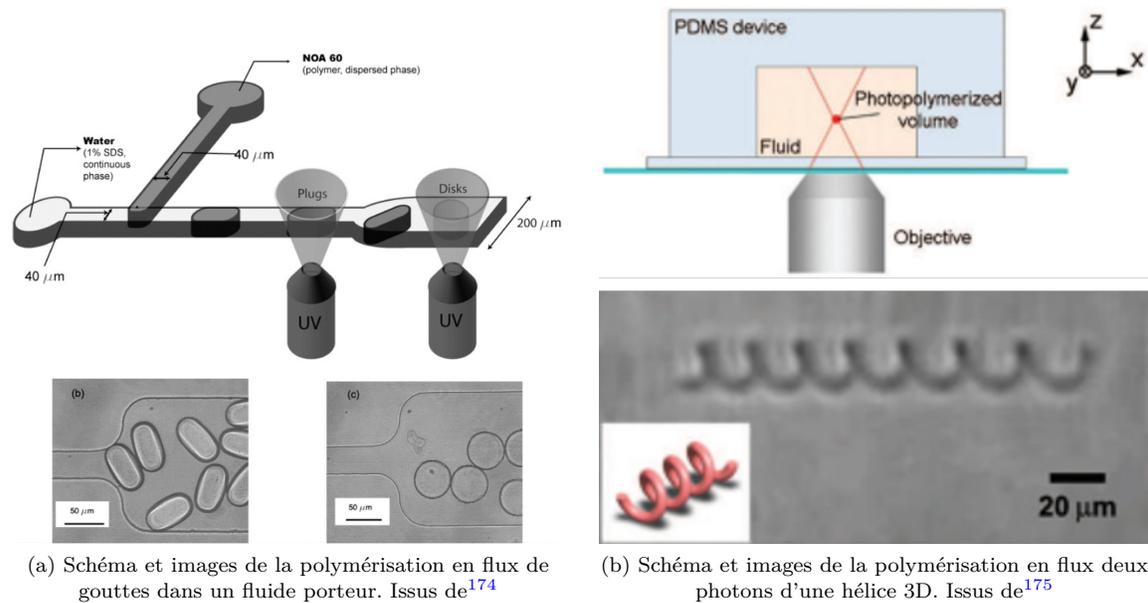


FIGURE 1.6 – La polymérisation en flux par illumination d’une section de canal ou par point en polymérisation 2 photons

3D dans l’épaisseur de canaux microfluidiques. Le motif 3D est obtenu par le déplacement de l’objectif par rapport au canal fluide. Cette équipe a par exemple imprimé des hélices en 3D.

En dehors de l’impression 2PP, certaines équipes ont aussi proposé des objets 2.5D en polymérisant à des jonctions de plusieurs canaux, et donc en donnant une forme spécifique aux objets. Si ces différents canaux comportent différents matériaux, la polymérisation conduit à un objet hétérogène. Ces objets ne sont pas totalement 3D et l’aspect multimatériaux est limité, car l’utilisateur est fortement contraint par la puce microfluidique pour la polymérisation des objets. Ces applications sont réunies dans la revue de Sahin *et al.*¹⁷⁹

La polymérisation en flux est donc une technologie qui permet de figer des pièces dans un flux. Il est possible de leur donner plusieurs formes, généralement 2D. Cette méthode profite des avantages de la microfluidique pour collecter les pièces, les assembler, et varier le matériau. Elle prouve que la photopolymérisation n’est pas contrainte à un environnement statique. Cependant, il est impossible de créer des pièces réellement 3D.

Dans cette partie, nous avons développé les différentes approches en stéréolithographie. Nous avons pu mettre en avant la haute résolution accessible par cette technologie. Cependant, toutes ces techniques se limitaient à un seul matériau. Dans la partie suivante, nous étudions les capacités d’impression multimatériaux en SLA.

1.2.6.2 Stéréolithographie multimatériaux

Même si la stéréolithographie permet un contrôle et une précision sur les objets 3D qu’elle crée, il est difficile de réaliser des objets hétérogènes à cause de l’utilisation d’un bac de résine. Dans cette partie, nous détaillons certaines approches permettant des impressions multimatériaux en changeant ou en renouvelant le bac. Nous décrivons aussi des procédés physico-chimiques qui créent des objets hétérogènes avec un seul bac de résine.

La stéréolithographie multimatériaux par procédé manuel Les premières équipes à avoir développé l’impression multimatériaux en stéréolithographie changeaient la résine manuellement. En 2009 Arcaute *et al.* remplissaient un cylindre de résine puis réalisaient l’impression du premier matériau.¹⁸⁰ Ce cylindre était ensuite vidé puis retiré pour pouvoir rincer la pièce. Il était repositionné et

rempli de la seconde résine pour imprimer le second matériau. Plusieurs autres équipes ont reproduit cette technique. En 2015 Chen *et al.* ont créé un objet 2.5D avec trois solutions contenant trois types cellulaires¹⁸¹ et ont amélioré leur méthode en 2017.¹⁸² Kim *et al.* ont créé un objet en trois matériaux afin d'obtenir la porosité et la transparence souhaitée en PEGDA depuis 2018.^{183,184} En 2020, Ma *et al.* ont recréé un pseudo-système musculo-squelettique avec deux matériaux (BSA, SU-8) en changeant manuellement la solution.¹⁸⁵

Afin de faciliter le processus, certaines équipes changent le bac de solution (voir Fig. 1.7.A)^{157,186} pour qu'il n'y ait pas besoin de pipeter manuellement la nouvelle solution. Il faut tout de même rincer l'objet pour le développer entre les deux matériaux.

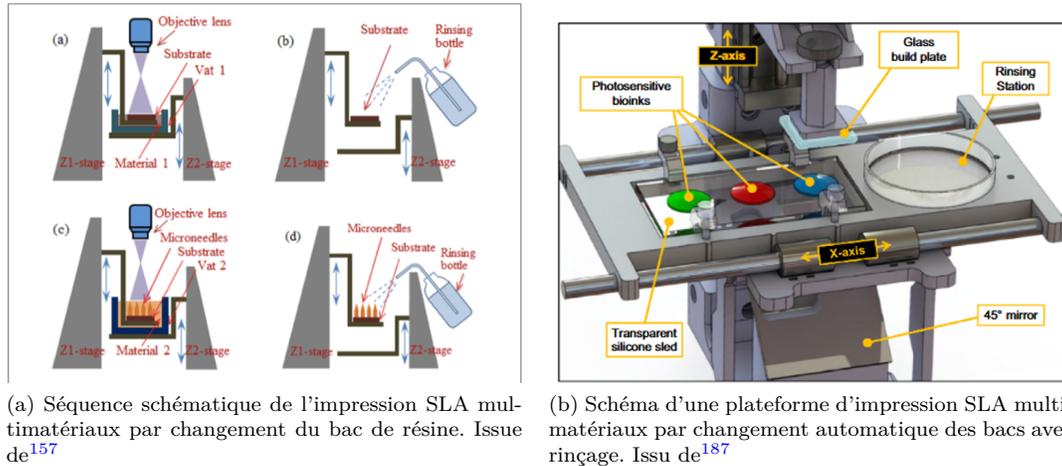


FIGURE 1.7 – Techniques d'impression multimatériaux en stéréolithographie par changement manuel ou automatique du bac

En impression deux photons, Klein *et al.* imprimaient en 2011 des structures en PEGDA avec une imprimante *Nanoscribe*.¹⁸⁸ Ils retiraient alors la plateforme supportant l'objet et rinçaient la structure avec de l'isopropanol. Ensuite, ils replaceraient l'objet et l'alignaient grâce à une structure d'alignement. Ils imprimaient ensuite une résine *Ormocomp*. Cette stratégie leur permettait d'obtenir un matériau avec affinité et un matériau sans affinité pour les protéines. En plongeant la structure dans un bain contenant de la fibronectine, la protéine se fixait sur l'*Ormocomp*. Ensuite, une culture de fibroblastes était mise en place. Les fibroblastes se fixaient de manière préférentielle sur les parties *Ormocomp* et l'équipe a donc obtenu une structuration 3D agissant sur les cellules. Malgré les résultats marquants, cette méthode est difficile à reproduire et demande une intervention manuelle. Il est aussi difficile d'imaginer un objet avec plusieurs couches hétérogènes puisque chaque couche demanderait une intervention manuelle.

Malgré la manipulation manuelle de cette méthode, plusieurs équipes continuent de la pratiquer jusqu'à aujourd'hui. Il est compréhensible d'imaginer que toutes les équipes n'ont pas les appareils disponibles qui permettent une automatisation du processus, décrite dans les parties suivantes, et que pour des pièces simples, cette méthode est suffisante et ne nécessite pas l'investissement ou le développement de nouvelles technologies.

La stéréolithographie multimatériaux par changement automatique de bac D'autres équipes ont automatisé le processus. L'imprimante dépose plusieurs couches d'un matériau, ou simplement la fraction d'une couche correspondant au premier matériau. Puis la plateforme se relève, un nouveau bac de résine contenant un matériau différent est positionné sous la plateforme. Celle-ci replonge, et l'impression continue avec le second matériau.

En 2006, Wicker *et al.* réalisaient une impression multimatériaux avec un carrousel rotatif.¹⁸⁹ Ils pouvaient ainsi alterner automatiquement entre les différents matériaux. Les auteurs ont amélioré leur méthode jusqu'à proposer la plateforme de *Multimaterial, Multitechnology stereolithography* en 2012.¹⁹⁰⁻¹⁹² En 2016, Ge *et al.* ont aussi automatisé leur processus pour imprimer des objets 4D, c'est-à-dire qui évoluent dans le temps sous l'impulsion de stimuli.¹⁹³ Wang *et al.* impriment aussi sur une plateforme rotative, en déposant la solution visqueuse sur la surface, sans bac.¹⁹⁴ Enfin, Khatri *et al.*

ont proposé une méthode simple pour construire soi-même une imprimante SLA multimatériaux en détaillant les points spécifiques (construction, matériaux, logiciel, méthode).¹⁹⁵ Cette équipe estimait que de telles technologies existaient déjà de façon répandue en extrusion multimatériaux mais pas en SLA multimatériaux.

Le simple changement de bac peut créer de la contamination entre les matériaux. Si la dose de polymérisation n'est pas la même, cela peut conduire à des défauts sur l'objet final. Zhou *et al.* ont imaginé une plateforme rotative qui comprend des brosses et un séchoir pour enlever la résine $n-1$ avant de continuer l'impression avec la résine n .^{196,197} Matte *et al.* ont créé un dispositif original où les bacs de réservoirs sont disposés verticalement.¹⁹⁸ À la sortie de chaque bac, un peigne permet de retirer la plus grosse partie de la résine non polymérisée. Puis cette équipe a choisi de placer des gicleurs pour éliminer avec du solvant le reste de la résine. Ils ont estimé que cette solution était préférable à celle consistant à plonger les pièces dans un bac de solvant. Plusieurs autres équipes ont ajouté des bacs avec des solutions de rinçage.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Entre chaque matériau, la pièce est plongée dans ce bac afin d'évacuer la résine non polymérisée. Le bac de rinçage permet de développer la pièce avant de continuer l'impression en plongeant l'objet dans le bac de résine suivant. La figure 1.7.B montre la plateforme SLA multimatériaux de Grigoryan *et al.*¹⁸⁷ Kowasri *et al.* ont proposé d'extraire la résine polymérisée avec un flux d'air plutôt que de plonger l'objet dans un bac de solvant.²⁰² Cette méthode a permis de construire à hauts rapports de forme et sans contamination croisée. Cependant, il faut un objet dans lequel les flux d'air permettent d'extraire le matériau, donc sans recoin ou crypte. Chen *et al.* ont finalement proposé en 2022 une méthode novatrice où la résine est extraite par force centrifuge.²⁰³ Après l'impression d'un premier matériau, la plateforme est relevée puis et mise en rotation entre 10 et 30 secondes à 1000 - 10000 tours par minute. La résine non polymérisée est éjectée, puis l'objet est plongé dans le bac suivant. Cette méthode nécessite des objets résistants.

Les méthodes décrites ci-dessous permettent l'impression de pièces multimatériaux en SLA, avec la possibilité d'imprimer en haute-résolution. Ces équipes considèrent néanmoins que ces procédures sont complexes et chronophages. Dans le cas d'un objet multicouches avec plusieurs matériaux par couche, le temps total d'impression est très augmenté par rapport à une impression monomatériau. Dans la partie suivante, nous développons une combinaison de la stéréolithographie et de la microfluidique pour améliorer ces méthodes.

Couplage de la microfluidique et de la stéréolithographie pour l'impression multimatériaux Plutôt que changer l'objet de bac pour le mettre en contact avec un nouveau matériau, il est possible de renouveler le bac automatiquement. In 2018, Chen *et al.* ont proposé un concept dans lequel plusieurs seringues peuvent injecter un mélange de plusieurs résines dans un bac.²⁰⁴ Ils ont pu imprimer des structures avec des propriétés méta-mécaniques et des macro-coefficients de Poisson négatifs. Bien qu'il ne s'agisse pas de bioimpression, ce type de systèmes laisse ouvert la possibilité d'un important nombre de solutions en entrée.

En miniaturisant, Miri *et al.* ont imprimé des objets multimatériaux dans une puce microfluidique.²⁰⁵ Cette puce comprend quatre entrées qui alimentent de manière homogène un réservoir central et qui sont évacuées via une sortie au bas de la puce. Dans la zone centrale, une matrice de micro-miroirs (DMD, Digital Micromirrors Device en anglais) peut illuminer et polymériser. La troisième dimension en Z est fournie par une plateforme qui déplace la membrane inférieure de la puce microfluidique et définit une épaisseur de matériau polymérisable avec la membrane supérieure. L'utilisation de telles puces conduit à une faible consommation de résine de l'ordre de quelques centaines de microlitres.

De façon assez similaire, Lamont *et al.*,²⁰⁷ Mayer *et al.*²⁰⁸ et Han *et al.*²⁰⁶ ont aussi imprimé des objets 3D dans des puces microfluidiques. Le système de Lamont semble le moins efficace pour produire des pièces, car ils doivent recréer la puce à chaque fois. Mayer a préféré une approche avec des pièces usinées dans une enceinte limitant à 100 μm la hauteur des pièces imprimées. Han *et al.* ont finalement proposé une plateforme plus robuste permettant d'atteindre des hauteurs de pièces plus importantes, de l'ordre de 2 mm, montrée sur la figure 1.8.A.²⁰⁶ Un équilibre entre la taille des pièces et la quantité de solution à utiliser est à trouver. Les équipes de Kunwar et Wang ont utilisé un concept similaire en gardant les puces ouvertes en Z.^{167,209} Cette approche lève des contraintes sur les dimensions maximales des pièces, mais impose de nombreuses limites quant au renouvellement de la solution dans des parties enclavées de la pièce.

Il est aussi possible de créer des objets multimatériaux par une technique inspirée de la *continuous-flow lithography* décrit dans la partie 1.2.6.1.^{176,179} En polymérisant dans une puce après une jonction

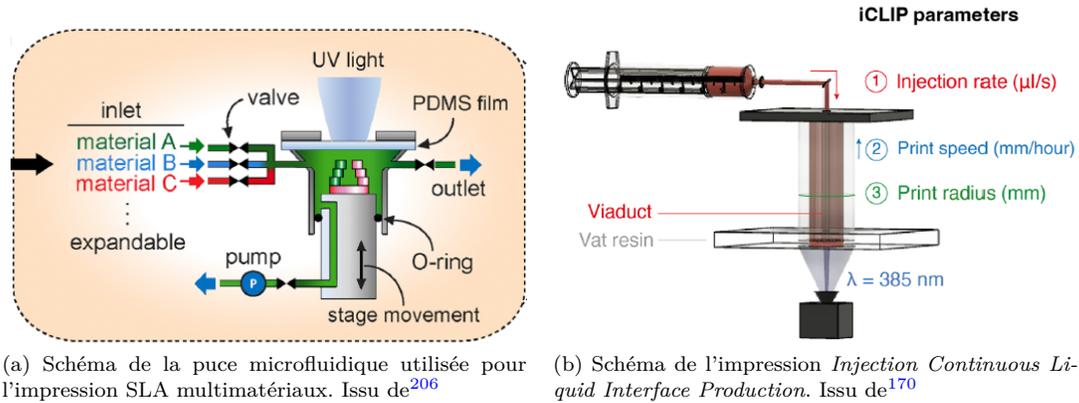


FIGURE 1.8 – Techniques pour impressions multimatériaux en stéréolithographie assistée par microfluidique

microfluidique de deux matériaux photopolymérisables, l'objet est formé de deux parties hétérogènes. Il est aussi possible de polymériser ces objets au niveau des jonctions microfluidiques afin de donner une géométrie spécifique aux objets. Cette application reste limitée en capacité 3D et multimatériaux mais fournit un exemple de polymérisation en flux, que nous utiliserons dans notre recherche.

Enfin, la technologie iCLIP (*Injection continuous liquid interface production*) utilise la microfluidique pour créer des pièces multimatériaux à l'aide de canaux créés dans les pièces elles-mêmes.¹⁷⁰ Ces canaux microfluidiques traversent la pièce de bas en haut. Ils sont imprimés en même temps que le reste de la pièce autour d'eux. Les canaux pourvoient la totalité ou une partie de la résine nécessaire à l'impression. Ce principe est décrit sur la figure 1.8.B. Cette technologie a été développée pour diminuer le besoin de relever la plateforme entre chaque couche en stéréolithographie afin de réapprovisionner en matériaux sous la plateforme. Grâce à l'apport de la résine au cœur de la pièce, et par l'extérieur grâce au bac de matériaux, la zone sous la plateforme est plus facilement renouvelée en résine. L'impression peut se faire beaucoup plus vite (gain de vitesse d'un rapport de 5 à 10), et même de manière continue (sans l'action relever-rabaïsser de la plateforme ralentissant généralement la SLA), d'où le nom de *Injection continuous liquid interface production*. Cette équipe a finalement utilisé ces canaux pour injecter des matériaux différents via l'intérieur de la pièce jusqu'à la zone de polymérisation. Outre les limites imposées par l'intégration des canaux au sein des structures imprimées, cette technique, bien que prometteuse, ne permet pas d'imprimer plusieurs matériaux juxtaposés sur la même couche. En effet, seule la position des matériaux liquides détermine leur placement dans la pièce finale. Les matériaux sont délivrés par les canaux puis inondent la zone de polymérisation, donc leur positionnement n'est pas assez précis pour pouvoir les polymériser précisément de manière juxtaposée.

En polymérisation deux photons, la société *Hétéromerge* a aussi proposé un concept où la solution est remplacée *via* un canal d'injection et un canal d'aspiration.²¹⁰ Ils ont ainsi pu créer des objets à haute résolution multimatériaux, mais non appliqués à la biologie.

Impression multimatériaux par principes photo-chimiques

Contrôle par photochimie orthogonale Tous les procédés précédents fonctionnent avec des réactions chimiques similaires pour leurs différents matériaux. Par exemple, pour la co-impression de polymères acrylates, le photo-initiateur est identique dans toutes les solutions et la source optique agit de manière équivalente pour la polymérisation des différents polymères. Les capacités d'impression multimatériaux proviennent de la nature du matériau disponible dans la zone de photopolymérisation. D'autres équipes ont proposé de mélanger plusieurs polymères et de les activer de façon sélective. C'est la photochimie qui détermine l'aspect multimatériaux et non le positionnement spatial des solutions disponibles. Nous parlons alors de chimie orthogonale ou sélective. En mélangeant plusieurs polymères réagissant à des longueurs d'ondes différentes, la projection d'une image multicolore crée un objet multimatériaux.

Schwartz *et al.* ont utilisé des acrylates et des époxydes.²¹¹ Les acrylates polymérisent de façon

radicalaire avec l'Irgacure 819 (activable jusqu'à 450 nm) et les époxydes par des réactions cationiques avec des sels de triarylsulfonium (activables jusqu'à 390 nm). Ils utilisent ensuite des images binaires (voir Fig. 1.9.A). Une des deux parties est envoyée à un projecteur de lumière visible, et la seconde à un projecteur UV. La lumière visible ne polymérise que les acrylates. Les UVs activent les réactions cationiques et polymérisent aussi les époxydes. Cette équipe a ainsi pu créer un objet hétérogène en une seule étape, sans changement de solution par photochimie orthogonale.

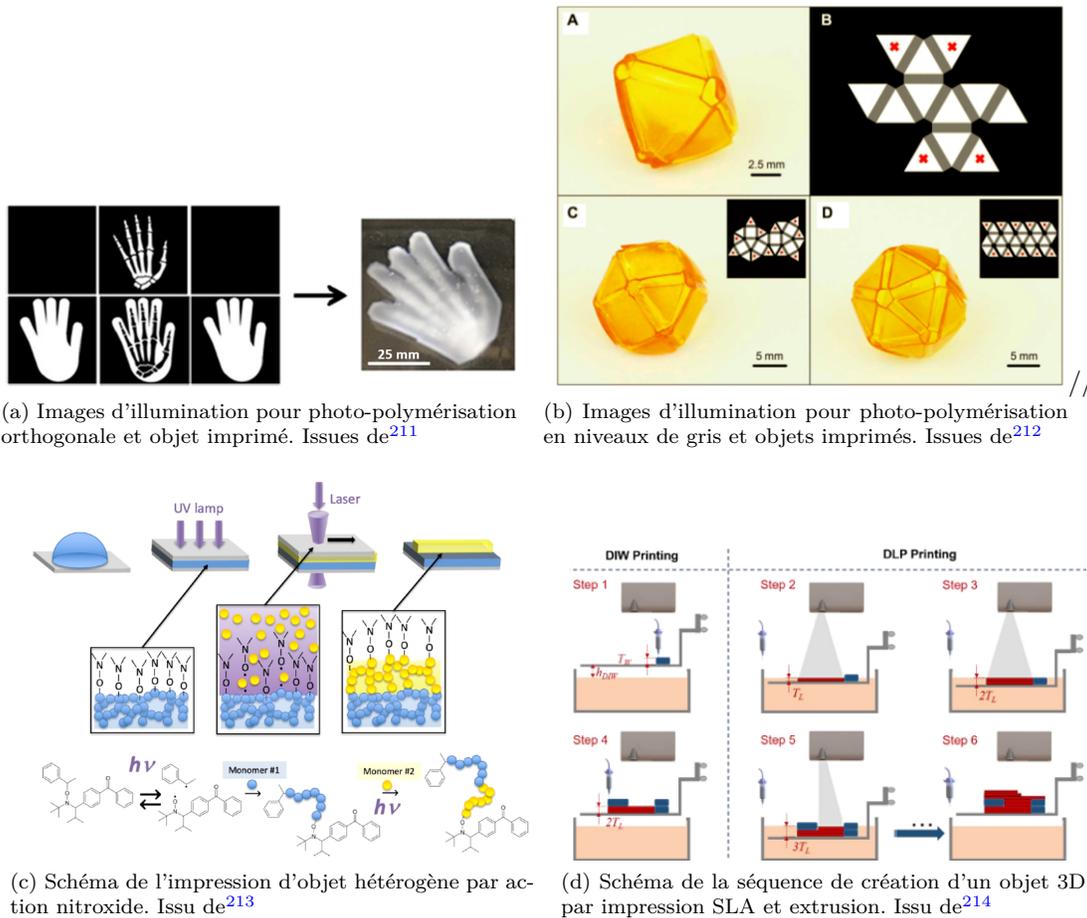


FIGURE 1.9 – Techniques pour impressions hétérogènes en stéréolithographie par procédés photochimiques

L'équipe de Chen *et al.* a aussi proposé une méthode acrylate - époxy,²¹⁵ mais les époxydes sont ici réticulés en température. Les auteurs déposent par extrusion une couche du mélange. Ils insolent de manière ciblée l'objet afin de réticuler le réseau acrylate. Puis, couche par couche, ils construisent l'objet en 3D. Certaines parties ne sont donc pas polymérisées à ce stade. Pour maintenir la forme de l'objet dans la durée, l'objet est chauffé (100-150 °C) afin de réticuler thermiquement le réseau époxy. Ils obtiennent ainsi un objet formé d'un seul matériau, mais hétérogène dans sa réticulation. Il est intéressant de noter que l'étape de recuit en température n'est pas adapté à la bioimpression. Cette méthode est tout de même restreinte à quelques combinaisons de matériaux. Il n'est pas possible par exemple de combiner plusieurs acrylates ou plusieurs époxydes. La méthode est aussi limitée en termes de nombre de matériaux différents dans le même objet par le nombre de chimies orthogonales disponibles. En l'occurrence, ici, seules deux chimies sélectives sont combinées. Enfin, pour de la bioimpression, l'utilisation d'UV ou de réaction cationique peut engendrer des effets cytotoxiques.^{72, 216} Cette méthode est particulièrement pertinente pour réaliser des objets avec des propriétés mécaniques variables comprenant des parties rigides et des parties souples.

Contrôle par niveau de gris Il est aussi possible de créer un objet hétérogène avec un seul matériau en contrôlant son taux de réticulation. Nous pouvons illuminer un objet entre son seuil de polymérisation et sa dose maximale à laquelle toutes les réactions de polymérisation ont eu lieu. Par exemple, l'équipe de Boydston a multiplié la dose par quatre entre les deux extrémités de la polymérisation de la résine *G+ Yellow* de *MakerJuice*.²¹⁷ Ils ont mesuré un module élastique allant de 0.4 GPa pour l'objet le moins polymérisé à 1.5 GPa pour le plus polymérisé.

Zhao *et al.* ont utilisé ce concept pour créer des contraintes hétérogènes dans un objet plat.²¹² À la suite du développement, l'objet subit ces contraintes et se déforme. Les zones les moins insolées se déforment et déplacent en 3D les zones les plus insolées peu déformables. Cette approche repose sur un phénomène de polymérisation frontale dans une couche fine du matériau. À haute dose, l'ensemble de la couche est réticulée de manière uniforme dans l'épaisseur. À basse dose, la partie de la couche la plus proche de la source optique est plus réticulée que la partie opposée. La contrainte de déformation vient de cette différence entre les deux faces d'une couche. Le phénomène de la polymérisation frontale est détaillé dans la partie 5.5. Par un jeu d'optimisation du fichier d'insolation, l'équipe a pu former des objets 3D sur la technique des origamis (voir Fig. 1.9.B). Ils ont par exemple formé des icosaèdres, des solides à vingt faces. Chaque face est une zone très insolée. Chaque arête est une zone peu insolée.

Ces objets ne sont pas multimatériaux au sens décrit précédemment. Cependant, ils détiennent une hétérogénéité interne en terme mécanique. En biologie, cela peut aussi être pertinent lorsque les cellules ont des comportements différents suivant la rigidité du substrat.

Chimie et impression 3D avec la chimie *click* et le *photo-clicking* La chimie *click* (*click-chemistry*) est une classe de la synthèse chimique qui permet de lier de façon covalente deux molécules comportant chacune une fonction réactive. Elle est applicable aux molécules biologiques. Les réactions les plus utilisées sont les cycloadditions, la réaction thiol-ène, la réaction de Diels-Alder ou encore les substitutions nucléophiles. La photoclick chemistry²¹⁸ qui induit la création de la liaison covalente après application d'un stimulus lumineux, peut être utilisée pour la création d'un objet 3D et/ou multimatériaux.²¹³ Il faut tout d'abord positionner des molécules réceptives sur une surface. Ensuite, des molécules complémentaires sont mises en solution sur cette surface. Par insolation d'une zone donnée, un processus photochimique est activé permettant de lier les deux molécules.

Une équipe a adapté cette technique aux polymères acrylates (Triméthylolpropane triacrylate, TMPTA et 2-hydroxyethyl acrylate, HEA).²¹³ Ils ont utilisé une alkoxyamine photosensible qui peut initier la réaction de photopolymérisation d'un premier polymère *A* par action nitroxyde (voir 1.9.C). Après photoréaction, une partie de l'alkoxyamine reste fixée et stable sur le polymère. La seconde partie est partiellement fixée sur le polymère, avec une contribution dynamique. Elle permet de rajouter successivement des monomères sur le macro-polymère en cours de formation, tout en restant toujours au bout de la chaîne. Cette équipe positionne ensuite un second groupe de monomères *B* en solution sur l'objet formé de polymères *A*. Par insolation laser, ces nouveaux monomères sont intégrés à l'extrémité de la chaîne précédente de polymère *A* de façon covalente. À la fin de l'impression, la partie inférieure des polymères est donc formée par les monomères *A*, la partie supérieure par les monomères *B* et le bout de la chaîne par la partie active de l'alkoxyamine. Cette dernière partie étant encore active, il est possible d'y fixer une troisième molécule.

Cette approche permet donc de créer des objets multimatériaux et 3D par un processus photochimique. La *click-chemistry* donne ainsi accès à des réactions chimiques spécifiques. Cependant, cette technologie est difficilement applicable à une variété de matériaux et à l'encapsulation de cellules pour de la bio-impression.

Technologies de stéréolithographie hybrides La stéréolithographie peut être complétée par d'autres technologies pour la création d'objet 3D multimatériaux, chaque technologie permettant l'impression d'un matériau spécifique.

Il est possible de combiner la SLA avec l'extrusion comme l'ont fait Wicker *et al.* en 2012.¹⁹² Ils commencent par polymériser une résine acrylate par SLA, puis une buse d'extrusion dépose une résine conductrice d'électricité pour réaliser des pistes électroniques. De plus, en stoppant l'impression après la création de cavités, ils ont placé des composants électroniques en contact avec ces pistes électriques. Ils ont ainsi construit un objet contenant des composants électroniques, des pistes électriques et de la résine de stéréolithographie. Peng *et al.* ont aussi créé des objets multimatériaux combinant SLA et extrusion, comme décrit sur la figure 1.9.D.²¹⁴ Ils ont aussi montré leur capacité à imprimer des

objets avec des propriétés mécaniques différentes suivant les matériaux. Ils ont créé des capteurs de déformation, ou des objets 4D.

Muruguzza *et al.* ont aussi cherché à créer des pièces 3D pour des capacités électroniques, comme l'équipe de Wicker, en combinant la SLA avec un procédé jet d'encre (Inkjet).²¹⁹ La SLA sert à construire l'objet en 3D avec un rapport de forme non accessible par jet d'encre. Le jet d'encre permet de déposer la solution électriquement conductrice sur la résine de SLA.

Hohnholz *et al.* ont combiné la SLA avec un procédé d'impression par jet d'aérosol.²²⁰ Cette technique permet de déposer précisément le matériau polymérisable. Cela permet aussi de mixer plusieurs matériaux. Puis un module de SLA permet de polymériser les matériaux. La méthode d'approvisionnement du matériau est découplée de la méthode de polymérisation ce qui permet de créer des objets multimatériaux avec une précision élevée.

Roach *et al.* ont créé la machine 4M pour *Multimaterial multimethod*, qui combine l'extrusion, le jet d'encre, la photoréticulation, et deux bras articulés quatre et six axes.²²¹ Au-delà de l'aspect *vendeur* de la multiple combinaison de techniques, il semble que les utilisateurs n'auront que rarement besoin d'autant de méthodes différentes.

La technique développée par Kunwar *et al.* en 2019 combine à la fois l'impression SLA, l'impression deux photons additive, mais aussi l'ablation deux photons.¹⁶⁷ Par un réseau de micro-miroirs, les auteurs peuvent insoler une résine acrylate et la polymériser à des échelles multi-millimétriques. Par un procédé deux photons, ils peuvent polymériser la même résine à plus haute résolution. Ils ont aussi caractérisé leur capacité d'ablation d'une résine déjà polymérisée par la focalisation à deux photons. Ils ont ainsi réussi à créer des canaux internes ou des cavités non ouvertes. Ce procédé est astucieux, car il n'utilise que des procédés de photopolymérisation, mais arrive à combiner l'impression à un et deux photons, et à implémenter à la fois des procédés additifs et soustractifs avec la même technologie à deux photons.

Chacune de ces différentes approches est pertinente pour des applications précises, mais aucune d'entre elle ne permet de répondre aux critères multimatériaux et haute résolution qui sont attendus en bioimpression 3D.

Conclusion sur la bioimpression 3D d'objets multimatériaux à haute résolution

Dans ce chapitre, les besoins en modèles tissulaires ont été détaillés en mettant en avant les principaux critères pour la formation de modèles optimisés : la capacité multimatériaux et la haute résolution. Les technologies de bio-impression 3D ont été passées en revue à travers ce prisme. La micro-extrusion sort du lot par sa capacité à créer des pièces 3D et multimatériaux, mais il reste difficile d'atteindre de hauts rapports de forme et des pièces haute résolution.

D'un autre côté, la stéréolithographie est une technique qui permet la mise en forme 3D à haute résolution. Elle peut créer des objets multimatériaux en changeant le bac de résine manuellement ou automatiquement ou en changeant la résine *via* une méthode microfluidique. Ces techniques sont toutefois limitées soit par la consommation importante de réactif, soit par un environnement géométrique contraint. D'autres techniques existent, avec des chimies spécifiques ou des plateformes hybrides, mais elles n'atteignent pas les deux critères de multimatériaux et de haute résolution.

Nous estimons qu'une nouvelle technique d'impression 3D, basée sur un nouveau concept entre la stéréolithographie et la micro-extrusion, permettraient la création d'objets 3D multimatériaux de manière plus efficace, grâce à l'implémentation du principe des sondes microfluidiques. Nous décrivons ce concept dans le prochain chapitre.

Chapitre 2

Description de la technologie 3D-FlowPrint

2.1	Principe de la photopolymérisation en flux	35
2.1.1	Technologie 3D-FlowPrint	36
2.1.2	Environnement microfluidique	39
2.1.3	Environnement optique	43
2.2	Développement de la plateforme expérimentale	44
2.2.1	Contrôle des trajectoires d'impression	44
2.2.2	Contrôle thermique	46
2.3	Environnement logiciel	47
2.3.1	Conception 3D numériques des pièces avec Fusion 360	47
2.3.2	Développement d'un vectoriseur	48
2.3.3	Interface logicielle	50
2.4	Méthodologie et préparation d'une impression	51

Ce chapitre présente la plateforme opto-fluidique 3D-FlowPrint positionnée à partir de l'analyse des technologies d'impression 3D existantes. Nous y décrivons les concepts optiques et fluidiques qui représentent les deux parties majeures du travail réalisé. Nous y décrivons aussi l'ensemble de la plateforme expérimentale et des logiciels. Finalement, nous détaillons la méthodologie d'une impression. Ce chapitre permet d'introduire les points clés de la technologie 3D-FlowPrint, afin de pouvoir ensuite approfondir dans les chapitres suivants en ayant déjà une compréhension globale. Ce chapitre présente aussi les protocoles de la plateforme.

2.1 Principe de la photopolymérisation en flux

La polymérisation en flux par l'intermédiaire d'une tête opto-fluidique est un nouveau concept. Dans cette partie, nous décrivons le concept de la technologie 3D-FlowPrint de manière générale avant d'approfondir les aspects microfluidiques et optiques. Le concept a été breveté²²² et publié.²²³

2.1.1 Technologie 3D-FlowPrint

2.1.1.1 Contexte

Comme nous le verrons, la technologie 3D-FlowPrint reprend certains avantages des technologies d'impression 3D présentées dans le premier chapitre notamment la micro-extrusion et la stéréolithographie. Notre technologie reprend également certains concepts issus des sondes microfluidiques qui, sans être du domaine de l'impression 3D, permettent de fonctionnaliser des objets biologiques ou artificiels. Dans cette première section nous ferons donc quelques rappels des technologies qui ont inspiré nos développements puis nous introduisons le concept de photo-polymérisation en flux 3D-FlowPrint. Cette sous-partie ne se veut pas un état de l'art, mais a uniquement pour ambition de mettre en lumière des points clés de ces technologies.

Micro-extrusion, une méthode adaptée à l'impression multimatériaux Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la micro-extrusion permet la fabrication d'objets 3D par le dépôt de matériaux *via* une buse d'extrusion (voir Fig. 2.1.A) qui se déplacent dans les trois axes dimensionnels au-dessus d'un support. La micro-extrusion est particulièrement bien adaptée à la création d'objets multimatériaux. Les imprimantes disposent généralement de plusieurs buses juxtaposées qui contiennent chacune un matériau différent. En revanche, le matériau doit posséder certaines propriétés afin de pouvoir être extrudé et solidifié. Il peut s'agir d'un prépolymère qui solidifie après extrusion par un procédé chimique ou optique.⁹¹ Il peut également avoir des propriétés rhéologiques spécifiques sous température (transition fluide au-dessus de la température de transition vitreuse pour les thermoplastiques) ou cisaillement (*shear-thinning* en anglais) lors de l'extrusion en pression qui permet au matériau de se resolidifier une fois déposé.²²⁴ Ainsi, nous voyons qu'il est généralement impossible de décorrélérer le procédé d'extrusion des propriétés rhéologiques du matériau qui déterminent tous deux la résolution et les capacités de mise en forme. Le diamètre de la buse influe directement sur la taille du filament et est un facteur limitant pour obtenir une meilleure résolution. La résolution en extrusion est donc limitée à environ 50 - 200 μm .⁹⁰ À cette limite de résolution s'ajoute les contraintes liées à la stabilité des structures durant l'impression, qui limite fortement la complexité des structures et leur rapport d'aspect.

La stéréolithographie, une méthode adaptée à la haute résolution La stéréolithographie est une technique de mise en forme 3D de matériaux par photopolymérisation. Elle est généralement réalisée dans un réservoir contenant un matériau à polymériser (voir Fig. 2.1.B). Le matériau est introduit sous forme liquide dans le réservoir dans lequel le support d'impression est plongé. Un dispositif optique projette précisément un faisceau laser ou projette l'image d'une matrice de pixels (DLP) sur ce matériau photosensible pour polymériser une couche 2D, généralement au bas du bac transparent. La première couche adhère au support qui est déplacé par sur un axe motorisé verticalement, puis les couches ultérieures s'accrochent à chaque couche précédente afin de former des objets 3D. Le matériau doit posséder des propriétés de photo-réticulation (ou photopolymérisation). Le plus souvent, un photo-initiateur est ajouté afin d'initier la réaction de réticulation. Un des avantages majeurs de la stéréolithographie est sa résolution qui peut atteindre la dizaine de micromètres.⁶⁰ L'impression deux-photons peut dépasser la limite du micromètre en proposant des tailles de voxel de l'ordre de quelques centaines de micromètres.¹⁴⁶

En revanche, un des inconvénients de la stéréolithographie classique réside dans la difficulté d'imprimer des pièces hétérogènes, constituées de plusieurs matériaux. En effet, dans la plupart des approches, le bac de résine demeure identique pendant l'expérience et donc un seul matériau est accessible à la polymérisation. Pour contourner cette limitation, certaines équipes ont proposé des procédés ingénieux qui ont été décrits dans la partie 1.2.6.2. Dans la majorité des cas, ces procédures sont lentes, laborieuses à cause d'une contamination croisée entre les matériaux, complexes ou encore incluent des molécules non adaptées à la biologie.

Les sondes microfluidiques Les sondes microfluidiques (*Microfluidic probe* MFP) ne permettent pas de construire des objets 3D, mais de fonctionnaliser des surfaces, objets, cellules, tissus et sphéroïdes. Cette technologie nous est apparue comme particulièrement intéressante pour manipuler des fluides d'intérêt biologique directement en immersion dans un milieu de culture. La technologie bé-

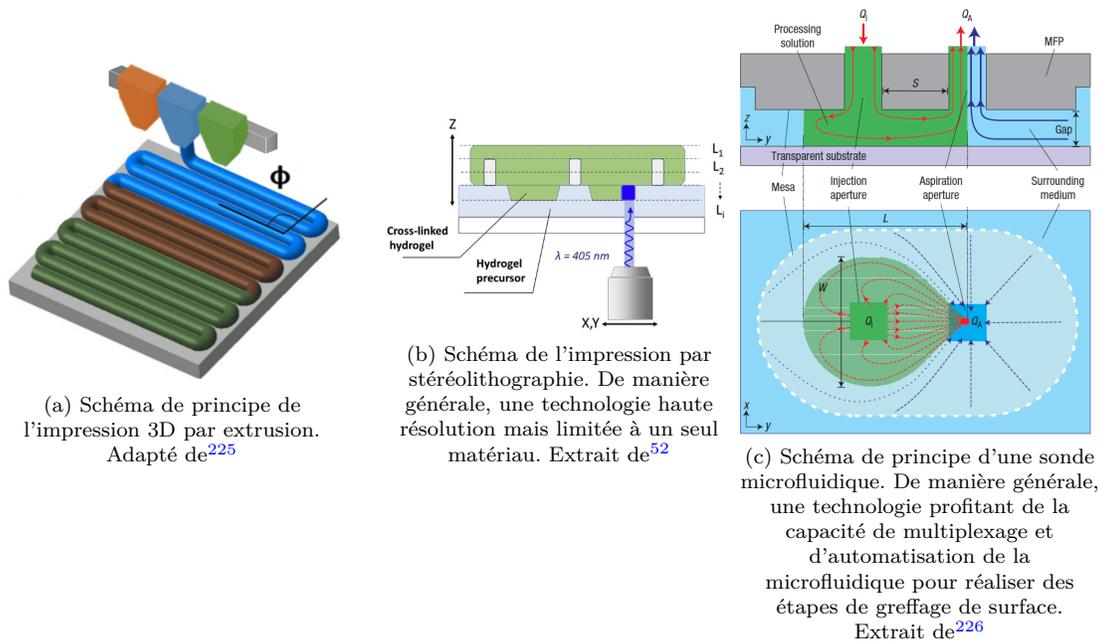


FIGURE 2.1 – Concept ayant inspiré la plateforme 3D-FlowPrint

néficie des avantages de la microfluidique pour introduire de façon très reproductible, automatisée et multiplexée de faibles volumes de matériaux à partir d'une librairie. Juncker *et al.* ont proposé ce concept en 2005 en proposant une technologie basée sur des dispositifs ouverts²²⁶ (voir Fig. 2.1.C). Les sondes microfluidiques sont majoritairement utilisées en immersion, typiquement dans du milieu de culture à proximité d'un tissu.

Ces sondes comprennent généralement deux canaux, pour l'injection d'un fluide particulier et son aspiration. L'injection achemine un fluide d'intérêt (en vert sur la figure 2.1.C) depuis l'extérieur du système jusqu'à l'extrémité de la sonde proche de la cible (surface, structure 3D, tissu, cellule). Après que le fluide a interagi avec le point d'intérêt, le canal d'aspiration collecte le fluide afin qu'il ne contamine pas le fluide environnant (en bleu sur la figure). Sur la vue de dessous de la figure 2.1.C, nous pouvons voir la solution verte être confinée sous la sonde puis aspirée. Les sondes microfluidiques permettent d'introduire et de mettre en contact une solution avec une cible (surface, structure 3D, tissu, cellule) de manière localisée par le biais d'un confinement au sein d'un fluide environnant.

Ces sondes mobiles ne sont pas contraintes dans leur déplacement dans l'espace et peuvent opérer sur de grands modèles comme des coupes de tissu.²²⁶ Elles sont généralement couplées à des systèmes de déplacements sur trois axes et utilisées entre 0 et 100 μm de distance depuis le substrat. Il est aussi possible de modifier les rapports entre l'injection et l'aspiration afin de moduler l'empreinte de la solution sur l'objet cible.

Dès 2005, Juncker *et al.* ont démontré plusieurs possibilités.²²⁶ Ils ont prouvé leur capacité à modifier localement une surface par une molécule contenue dans la solution injectée. Ils ont laissé une empreinte sur le substrat de l'ordre de $50 \cdot 50 \mu\text{m}$. Ils peuvent aussi créer des réseaux de protéines, déposer un gradient d'une molécule en modulant le rapport entre l'injection et l'aspiration, réaliser des opérations de protection et de marquage de coupes de tissus et collecter des protéines ou des cellules d'une surface de façon localisée. Le même groupe a développé des sondes microfluidiques quadripôles²²⁷ comprenant deux canaux d'injection et deux d'aspiration. Il est alors possible d'injecter deux solutions différentes et d'obtenir un profil de concentration sur l'axe entre les deux canaux d'injection. Il est intéressant de noter que certaines sondes microfluidiques peuvent être utilisées dans de l'air, en maintenant le fluide d'intérêt par capillarité entre la sonde et la surface.²²⁸

Afin d'atteindre les résolutions nécessaires pour les canaux fluidiques, les sondes microfluidiques sont principalement fabriquées par des procédés silicium en salle blanche. D'autres sondes ont été fabriquées par laminage de membranes de PDMS.^{229, 230} En 2017, des sondes microfluidiques imprimées en 3D par stéréolithographie ont été proposées.²³¹ La résolution est plus faible qu'avec un procédé

silicium, mais il a été prouvé que l'influence sur les phénomènes fluidiques des sondes était négligeable. Ces sondes sont plus robustes, plus rapides à réaliser et moins coûteuses que les modèles précédents. L'impression 3D permet aussi la création de sondes plus complexes, avec des agencements de canaux particuliers et des capteurs électroniques intégrés.^{232,233}

L'appropriation du concept des sondes microfluidiques pour notre propre plateforme est pertinente par leur capacité de manipulation et de multiplexage de fluide, par leur aspect ouvert non limité en rayon d'action, par leur possibilité de travailler en immersion dans un milieu de culture et par leur potentielle création par impression 3D. Par le couplage de telles technologies avec un procédé de polymérisation du fluide manipulé, un nouveau concept d'impression 3D microfluidique peut voir le jour.

2.1.1.2 Présentation du concept 3D-FlowPrint

Les avantages du couplage de la microfluidique et de la photopolymérisation L'imprimante 3D-FlowPrint emprunte certains aspects de la micro-extrusion, à la stéréolithographie et aux sondes microfluidiques (voir Fig. 2.2). Aux sondes microfluidiques est empruntée l'idée de circulation d'un fluide dans une zone confinée et de se servir de la microfluidique. À l'extrusion est empruntée l'idée d'acheminer le matériau d'intérêt *via* une tête d'impression et la capacité d'imprimer plusieurs matériaux. À la stéréolithographie, finalement, est empruntée l'idée de la photopolymérisation haute-résolution. La nouveauté réside dans la combinaison de ces technologies. Le concept que nous décrivons ci-dessous permet de découpler l'acheminement du matériau du procédé d'écriture ce qui permet de garder le multiplexage microfluidique en profitant de la haute résolution d'écriture de la stéréolithographie.

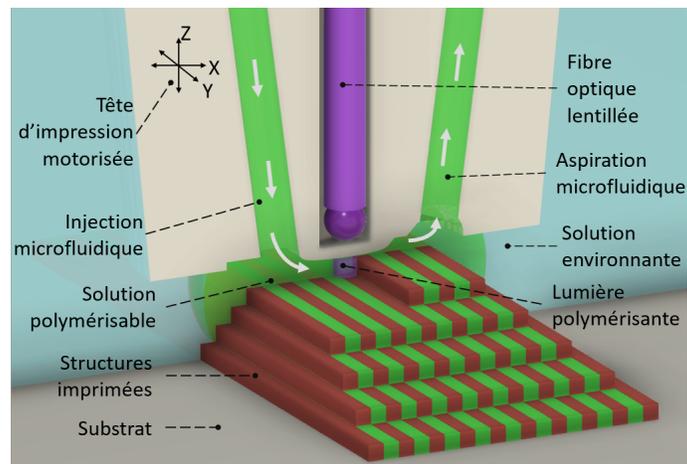


FIGURE 2.2 – Schéma de principe de l'impression par le concept 3D-FlowPrint. Une technologie combinant l'extrusion microfluidique, les sondes microfluidiques et la stéréolithographie, visant une résolution micrométrique, la construction d'objets multimatériaux par une approche s'inspirant des sondes microfluidiques.

Ici, nous utilisons un objet similaire à une sonde microfluidique, que nous avons appelé dans le manuscrit *tête d'impression*. Elle travaille aussi en immersion et comporte deux canaux fluidiques. Elle permet d'acheminer un liquide d'intérêt au point de polymérisation. En ré-aspirant ce liquide, la tête d'impression permet de limiter la contamination de l'environnement. Comme nous le verrons dans les chapitres suivants, notre technologie permet de confiner le matériau injecté même à une distance de 500 μm de la surface grâce à la structuration de la tête d'impression et aux contrôles des paramètres instrumentaux. Par la capacité de confinement de cette solution, cette technologie permet de délivrer le matériau en continu à l'extrémité de la tête sans interférence avec son déplacement en 3D. À la place de remplir un réservoir comme en SLA (20 cm \cdot 30 cm pour le système DWS J29+ par exemple), la technologie permet de travailler à partir de volumes typiques de quelques centaines de microlitres sachant que le volume de matériau dans la zone de polymérisation située à l'extrémité de la tête d'impression est de l'ordre du microlitre.

L'ajout d'une fibre optique lentillée, dans un canal optique dans la tête d'impression, permet de photopolymériser la solution injectée avec un reprenant les concepts classiques d'écriture laser en stéréolithographie. Cependant, la plateforme 3D-FlowPrint polymérise par le biais de la tête d'impression et non pas par le balayage d'un laser à travers un bac. Le matériau polymérisé se situe dans l'espace entre l'extrémité de la tête d'impression et le substrat. La résolution est due au phénomène de réticulation prenant place dans la zone illuminée.

Cette plateforme profite donc des avantages de l'injection localisée de matériau tout en conservant une résolution à l'échelle micrométrique telle que proposée en stéréolithographie. En résumé, la tête d'impression 3D-FlowPrint peut être décrite comme une sonde microfluidique mettant en circulation séquentiellement des fluides photosensibles et les polymérisant *via* une fibre optique insérée dans la sonde pour former des objets multimatériaux 3D.

Contrairement à l'extrusion ou l'impression par jet d'encre, le découplage de la méthode d'approvisionnement du matériau et du procédé d'écriture permet de conserver les capacités de multiplexage pour l'acheminement des matériaux tout en conservant des capacités d'écriture à haute résolution bien supérieure à l'extrusion. La résolution est donc principalement induite par la largeur du spot optique, qui peut mesurer entre 1 et 100 μm suivant les fournisseurs de fibres lentillées. En découplant l'acheminement du matériau et le phénomène de polymérisation, nous parvenons donc à construire des objets multimatériaux et haute-résolution, un objectif difficilement atteignable en SLA. Par ailleurs, le concept permet de produire des objets 3D au contraire des sondes microfluidiques.

En mettant des cellules en suspension dans les solutions imprimées, elles peuvent être encapsulées dans l'hydrogel lors de la photopolymérisation. Ensuite, les échantillons sont mis en culture, les cellules peuvent se diviser et proliférer. Elles peuvent dégrader et régénérer l'hydrogel imprimé. Ceci est possible, car l'objet imprimé fournit déjà une ébauche du tissu aux cellules. Nous avons réalisé des tests d'encapsulation de cellules dans de l'hydrogel présentés dans la partie 6.3. La plateforme peut aussi servir à l'impression de scaffolds pour réaliser une culture surfacique en ensemençant après l'impression.

Description du procédé d'impression La figure 2.3 schématise l'impression de cinq lignes interdigitées de deux matériaux différents. Nous commençons par injecter le premier fluide polymérisable. Une fois que le régime stable est atteint, la séquence d'impression est lancée. Le laser est allumé et la tête est mise en déplacement. La photopolymérisation du matériau permet de former une première ligne. Le canal d'aspiration continue de maintenir le confinement grâce à un espace entre la ligne imprimée et son ouverture. A la fin programmée de la ligne, le laser est éteint et la tête se déplace vers le début de la seconde ligne. Afin de gagner en homogénéité l'impression est toujours réalisée dans la même direction par rapport au flux. Le laser est rallumé et la tête se déplace de nouveau pour former la seconde puis la troisième ligne. Ensuite, le second matériau est injecté. La programmation attend le temps requis pour que le deuxième matériau ait totalement remplacé le premier. Puis la séquence reprend pour imprimer deux lignes supplémentaires dans le second matériau. Pour finir, la solution du milieu est injectée pour rincer l'échantillon, puis la tête est retirée.

2.1.2 Environnement microfluidique

2.1.2.1 Avantages et contraintes résultants de l'impression en immersion

Une des particularités majeures de la plateforme 3D-FlowPrint réside dans sa faculté à imprimer en milieu immergé. Dans la majeure partie des expériences réalisées, la tête d'impression était environ immergée dans cinq millimètres dans de l'eau ou un médium biologique. Plusieurs avantages, et contraintes associées, apparaissent de ce concept.

- La méthode que nous proposons s'apparente aux sondes microfluidiques, décrites par D. Juncker en 2005²²⁶ et améliorées depuis.^{227,231} Les sondes microfluidiques permettent de délivrer localement un fluide d'intérêt afin de modifier une surface, un matériau, un tissu ou une cellule unique.
- L'environnement liquide permet l'impression de solutions très peu visqueuses. En revanche, il est plus difficile d'imprimer des solutions trop visqueuses (voir partie 4.3) car l'approvisionnement et le contrôle fluidique sont impactés.

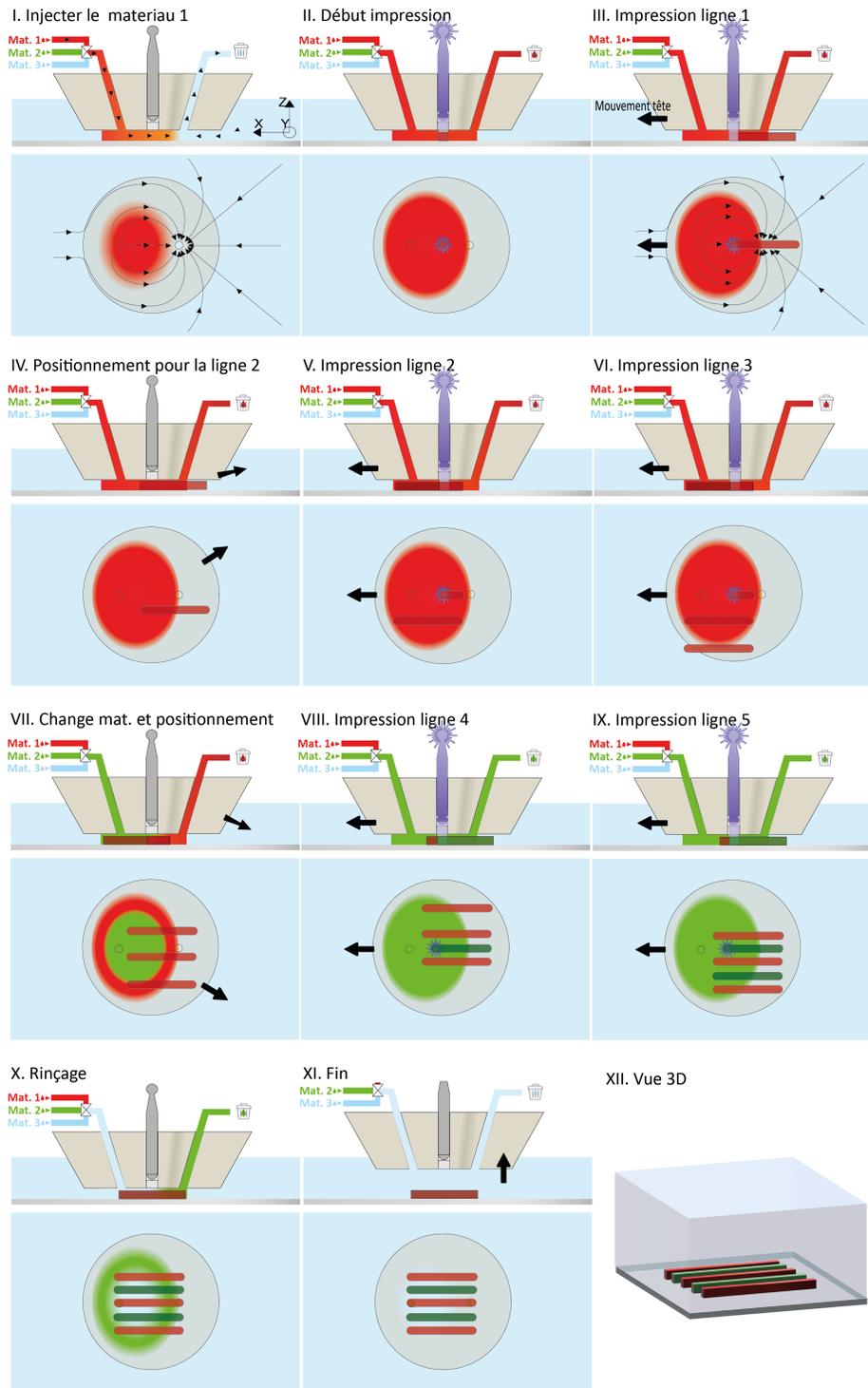


FIGURE 2.3 – Schéma d'une séquence typique d'impression multimatériaux de 5 lignes interdigitées. I) Injection du matériau 1 (rouge) et confinement de la solution. II) Allumage du laser et début de polymérisation. III) Déplacement de la tête pour impression de la première ligne. IV) Déplacement de la tête sans laser pour se positionner au début de la seconde ligne. V) Impression de la seconde ligne. VI) Impression de la troisième ligne. VII) Changement vers le matériau vert et aspiration du matériau rouge restant. VIII) Impression de la première ligne verte. IX) Impression de la seconde ligne verte. X) Injection de la solution du milieu pour rinçage. XI) Sortie de la tête et récupération de l'échantillon. XII) Représentation 3D du réseau

- La plateforme profite des capacités d'intégration et de multiplexage de la microfluidique. L'utilisation de solutions peu visqueuses autorise les systèmes classiques de microfluidique. Par exemple l'utilisation de vannes permet de sélectionner la solution à approvisionner au niveau de la tête d'impression à partir d'une librairie de matériaux. D'autres dispositifs tels que des mélangeurs ou des réservoirs locaux sont aussi envisageables pour contrôler en temps réel la composition du matériau (voir 3).
- La polymérisation dans un environnement liquide permet de limiter la quantité requise de solution polymérisable. En effet, celle-ci est approvisionnée en faible quantité au plus proche de la zone de polymérisation et ne remplit pas un bac complet comme dans d'autres technologies de stéréolithographie.⁶⁰
- Un des inconvénients est la nécessité d'aspirer aussi la solution environnante afin d'être certains de ne pas contaminer le milieu (voir partie 4.4.3). Pour des longues impressions, il est nécessaire de maintenir un volume suffisant de matériau (en fonction des débits d'aspiration et d'injection) afin de ne pas assécher la zone d'impression. Si un assèchement apparaît, le confinement microfluidique est perdu.

2.1.2.2 Description du concept de confinement microfluidique

La tête d'impression contient trois canaux (voir Fig. 2.4.A). Le canal central est non débouchant, il sert à acheminer la lumière du laser qui traverse une membrane optiquement transparente avant d'atteindre le fluide photopolymérisable. Les deux autres canaux sont débouchants et permettent la circulation du fluide polymérisable, l'un permettant l'injection de la solution polymérisable et l'autre l'aspiration.

Les têtes d'impression les plus utilisées sur la plateforme 3D-FlowPrint sont imprimées en 3D et assemblées avec une lamelle de verre et du PDMS (voir Fig. 2.4.B). La méthode de fabrication et la caractérisation des têtes sont décrites dans le chapitre suivant (voir chapitre 3). L'utilisation de l'impression 3D nous permet de gagner en temps de prototypage, en coût, en reproductibilité, en possibilité de géométrie et en résolution des structures imprimées.

Pour la polymérisation, la tête d'impression est positionnée à une faible distance du support (typiquement 100 μm). Le canal d'injection approvisionne en fluide et le canal d'aspiration récupère le fluide. Le fluide injecté est confiné dans un disque, ou cylindre aplati, entre la tête et le substrat (voir 2.4.A). Ce cylindre est ouvert sur l'extérieur par les côtés, confiné en dessous par le substrat et au-dessus par la tête d'impression. Ce volume est semi-confiné.

Dans un concept microfluidique ouvert, la solution injectée se propage dans toutes les directions de l'espace, y compris vers l'extérieur de ce cylindre. Pour empêcher la contamination du milieu, la récupération est fixée avec un débit supérieur à celui de l'injection. Du milieu environnant est alors aspiré pour combler l'écart des débits. Cette particularité est évoquée dans la partie 4.4.3.

La structuration de la surface de la tête permet d'accentuer le confinement de la solution. Ces structures présentent des variations de hauteurs qui permettent de modifier localement les résistances à l'écoulement et de contrôler la cartographie des écoulements dans la zone de confinement, notre objectif étant de guider la solution injectée vers le canal d'aspiration. Cette cartographie a aussi pour but de favoriser l'approvisionnement de la zone de polymérisation et diminuer le temps de changement entre deux matériaux. Ces structures sont visibles sur la figure 2.4.B. Nous verrons que l'impression 3D offre des avantages majeurs pour la création des têtes et de leur structuration de surface (voir partie 3.3).

D'autres phénomènes et variables sont à l'œuvre et jouent sur l'équilibre microfluidique, comme la viscosité des fluides (voir partie 4.3), la distance entre la tête et le support (voir 4.4.1) ou la vitesse de déplacement de la tête et sa direction (voir 4.4.2).

Comme nous le verrons dans le chapitre 6 les dimensions et la structuration de la tête ont été conçues et réalisées dans la perspective de l'impression de matériaux hydrogels. En l'occurrence, nous avons principalement travaillé avec des solutions diluées de PEGDA dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), du RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), du PBS (phosphate-buffered saline solution) ou de l'eau. Le PEGDA est un polymère synthétique dont la composition est contrôlée au contraire de polymères biologiques comme le matrigel ou la gélatine par exemple. Il se polymérise grâce aux groupements acrylates. Il a des propriétés anti-adhésives vis-à-vis des cellules qui peuvent

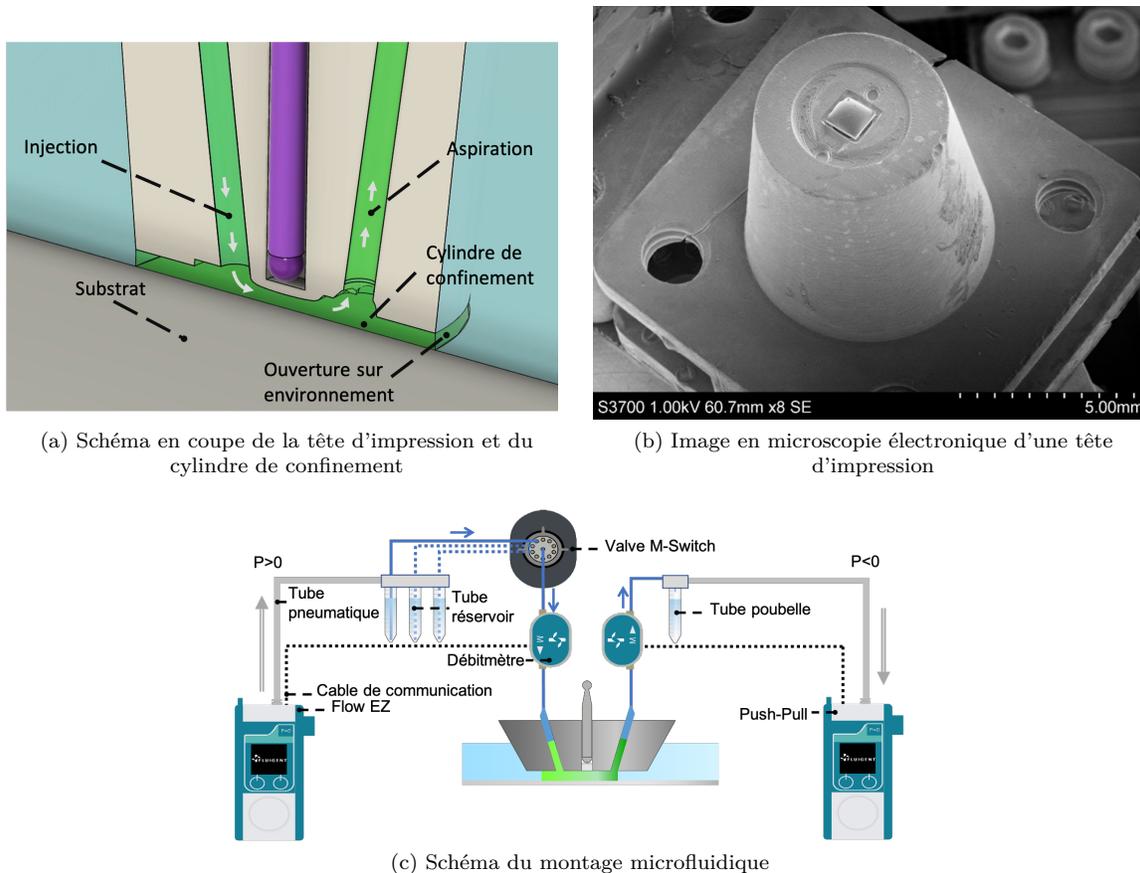


FIGURE 2.4 – Schéma du dispositif fluidique de la plateforme

être valorisées (voir partie 6.1). Dans la perspective de l'encapsulation de cellules, nous avons utilisé des solutions de GelMA, un polymère d'origine naturelle, dilué dans du DMEM (voir partie 6.3). Le PEGDA a des viscosités faibles à l'échelle de la bioimpression de l'ordre de 10 mPa.s, et le GelMA de l'ordre de 100 mPa.s à 37°C.

2.1.2.3 Adressage microfluidique

Les fluides sont mis en mouvement en appliquant un différentiel de pression positive par rapport à la pression atmosphérique pour l'injection et un différentiel de pression négative (par rapport à la pression atmosphérique) pour l'aspiration, de l'ordre de 100 mBar. L'injection est générée par un module Fluigent Flow-EZ et l'aspiration par un module Fluigent Push-Pull (voir Fig. 2.4.C). Ces deux modules sont commandés ensemble avec un montage Fluigent de type Line-up.

Sur la voie d'injection, jusqu'à dix réservoirs de solutions peuvent être convoyés jusqu'à une vanne 10-1 voies Fluigent M-Switch, aussi commandée *via* le montage Line-up. Cette vanne permet de sélectionner laquelle des solutions est acheminée jusqu'à la tête d'impression. Au cours de l'expérience, la vanne peut changer de position afin de choisir une nouvelle solution et produire un objet multimatériaux. Ce système peut aussi être utilisé pour rincer et nettoyer avec des tampons, de l'eau ou des solvants compatibles avec les éléments (tubes, vannes etc) de la plateforme. En sortie, un simple tube de 50 ml fait office de poubelle.

Sur les deux voies, les débits sont mesurés *via* des modules Fluigent flow units medium $\pm 80 \mu\text{L}/\text{min}$ pour l'injection et large $\pm 1 \text{ mL}/\text{min}$ pour l'aspiration. Ces débitmètres sont calibrés pour plusieurs fluides basiques (eau, éthanol) et sont à recalibrer pour d'autres fluides, comme les solutions d'hydrogel. Ces débitmètres étant reliés aux régulateurs de pression, nous pouvons choisir un contrôle directement en pression et lire les débits en indication, ou un contrôle en débit avec une boucle de rétroaction entre les débitmètres et les contrôleurs de pression. Le contrôle par le débit est particulièrement intéressant

pour gagner en reproductibilité. En effet, au cours de l'impression plusieurs paramètres peuvent influencer sur le contexte microfluidique, comme un changement de température faisant varier la viscosité, une solution partiellement polymérisée, des structures en cours d'impression ou un tuyau bouché. La boucle de rétroaction sur le débit mesurera une baisse du débit et imposera au contrôleur de pression d'augmenter la pression de commande afin de maintenir un débit constant.

Il est possible d'effectuer le montage fluidique en évitant les débitmètres, qui sont coûteux et plus complexes à nettoyer, pour des solutions comme le GelMA qui, elles peuvent entraîner un bouchage. Avec ce type d'hydrogel le contrôle sera fait simplement en pression, ce qui diminue la capacité de contrôle. Nous prévoyons d'implémenter un débitmètre en amont du réservoir, qui mesure le flux d'air entre le contrôleur de pression et le réservoir. Fluigent a déployé le produit *Air Flow Metre* qui mesure le débit d'air poussé par le contrôleur de pression et rectifie par rapport à cette pression pour estimer le débit de solution liquide. Une mesure du débit de solution est donc effectuée en amont de la solution elle-même et donc sans contact. Ce système a aussi l'avantage d'être indépendant de la solution. La boucle de rétroaction est cependant plus compliquée et plus longue à stabiliser (20 secondes typiquement).

Le système Line-up/réservoirs est relié *via* des tubes pneumatiques de diamètre interne 4 mm ou 2.5 mm en polyuréthane (Legris). Les systèmes réservoirs/M-Switch (pour l'injection) et réservoir poubelle/débitmètre (pour l'aspiration) sont reliés *via* des tubes fluidiques de diamètre interne 0.5 mm en FEP (Idex). Les systèmes M-Switch/débitmètre et débitmètres/tête d'impression sont reliés *via* des capillaires de diamètre interne 0.25 mm en PEEK (Idex). Ces tubes ont un diamètre externe de 0.775 mm, ce qui permet de les insérer dans les canaux de la tête d'impression. Ces canaux sont formés lors de l'impression 3D de la tête d'impression 3. Ils mesurent 0.5 mm de diamètre au niveau de l'extrémité de la tête et 1.5 mm sur l'arrière afin de faciliter l'insertion des capillaires fluidiques.

2.1.3 Environnement optique

Dans cette partie, nous développons les aspects optiques nécessaires à la photopolymérisation. Nous détaillons ensuite le montage optique et la caractérisation des fibres optiques qui sont au cœur de la technologie.

2.1.3.1 Processus de photopolymérisation

Notre développement s'est concentré sur la photopolymérisation de polymères photosensibles de type hydrogels (PEG et Gélatine notamment) fonctionnalisés par des groupements acrylate (Poly-Ethylene Glycol DiAcrylate PEGDA et Gelatine MethAcrylate GelMA). Par l'illumination de lumière à 405 nm, un photo-initiateur (Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate LAP) est activé et fournit des radicaux libres. Ces derniers permettent d'initier la réaction radicalaire de polymérisation par l'intermédiaire des fonctions acrylates. Ces mécanismes sont détaillés dans la partie 5.2.

La solution circule en continu dans l'espace entre la tête d'impression et le substrat. Lors de l'activation du laser, un bloc de matériau se solidifie. La hauteur de la couche polymérisée est définie géométriquement par la distance entre le substrat et la tête d'impression. Ceci signifie que le matériau polymérisé est au contact de la tête pendant l'impression. Pour limiter les risques d'adhésion, une couche de PDMS est préalablement déposée sur la tête d'impression. Le PDMS est un matériau inerte qui de plus est poreux au gaz dont l'oxygène. L'oxygène étant un inhibiteur de la réaction de photopolymérisation cette configuration nous permet de limiter la réaction à la surface de la tête et d'y éviter l'adhérence de structures polymérisées lors du déplacement (voir partie 5.2.5.2). Le matériau polymérisé est accroché au substrat grâce à un traitement MAPTMS (voir partie 5.2.5.1).

Par l'utilisation de solutions à faibles absorbances (absorptivité $< 0.05 \text{ cm}^{-1}$), sans additif absorbant, la lumière émise par le laser traverse quasiment sans altération toute la hauteur de matériau comprise entre la tête d'impression et la surface du substrat. La photopolymérisation est donc uniforme selon l'axe Z. Il n'y a pas d'effet de polymérisation frontale comme dans d'autres technologies. Ce point est démontré dans la partie 5.5. Au cours de la polymérisation, le biomatériau continue de circuler en contournant la pièce en cours d'impression. Nous avons pu prouver que les structures partiellement imprimées n'empêchaient pas la polymérisation en cours (voir partie 5.4).

Les trajectoires de la tête sont programmées de façon vectorielle permettant de créer des motifs étendus par juxtaposition des trajectoires individuelles. La hauteur de la tête permet de contrôler la

hauteur de couche. Afin de créer des structures épaisses, tout comme pour le processus de fabrication additive conventionnel, la tête se déplace suivant l'axe Z et se repositionne au-dessus de la couche précédemment imprimée. Une nouvelle séquence d'injection et de déplacement de vecteurs permet la création de la couche suivante jusqu'à obtention du motif 3D voulu.

2.1.3.2 Description des paramètres d'insolation

Contrôle de la puissance optique Un émetteur laser *LBX-405-100* est commandé *via* un boîtier *Laserboxx controller* d'Oxxius (voir Fig. 2.5.A). Le système émet un faisceau monochromatique à 405 nm avec une puissance ajustable entre 5 mW et 120 mW. La lumière est ensuite convoyée par une fibre optique lentillée (BL-5, high power single mode 405 nm fiber de WT&T). La fibre est focalisée à 7 μm à une distance de 200 - 3000 μm de la lentille.

La puissance de sortie du laser peut être trop élevée pour certaines solutions et nous avons donc ajouté un Générateur Basses Fréquences (GBF, Keysight 33509B) (voir Fig. 2.5.A). Le GBF émet des signaux périodiques carrés entre 0 et 5 Volts à la fréquence f . Ces signaux sont asymétriques par la valeur du rapport cyclique (Duty cycle DC en anglais) qui se mesure en pourcentage. Pour un signal $f = 1$ kHz, DC = 25 %, le GBF émet à 5 V pendant 0.25 ms puis à 0 V pendant 0.75 ms permettant de moduler la puissance à 25 % de la puissance nominale.

Dans la partie 5.1.1 est détaillée la caractérisation de l'impact du GBF sur la puissance laser. Nous avons déterminé un régime de fonctionnement linéaire du laser à $f = 1$ kHz, DC ≥ 1 % et $10 \text{ mW} \geq P \geq 100 \text{ }\mu\text{W}$. Ainsi, le contrôle par P_{in} et DC permet d'obtenir une puissance de sortie linéaire en extremum de 29 μW à 21 mW, soit trois ordres de grandeur. En dehors du régime linéaire, ce système permet d'obtenir une puissance de sortie minimum de 0.7 μW .

Caractérisation et positionnement de la fibre optique lentillée La fibre optique est insérée dans le canal central de la tête d'impression par l'arrière de la tête. La lumière émise de la fibre traverse une lamelle de verre puis un dôme de PDMS (voir partie sur la description des têtes d'impression 3.4) avant d'atteindre la solution de biomatériau.

À la suite de la caractérisation d'une nouvelle fibre optique, nous notons sa distance focale et sa profondeur d'homogénéité (distance pendant laquelle son diamètre change relativement peu). Ensuite, nous définissons la géométrie des têtes d'impression afin que la fibre optique soit bloquée dans la tête d'impression à une distance spécifique de l'extrémité. Nous avons ainsi obtenu des têtes d'impression avec un spot optique focalisé à différentes distances de l'extrémité de la tête, variant de zéro à plusieurs centaines de micromètres. Ces concepts sont approfondis dans la partie 5.1.2 qui détaille aussi le protocole de caractérisation des cônes optiques.

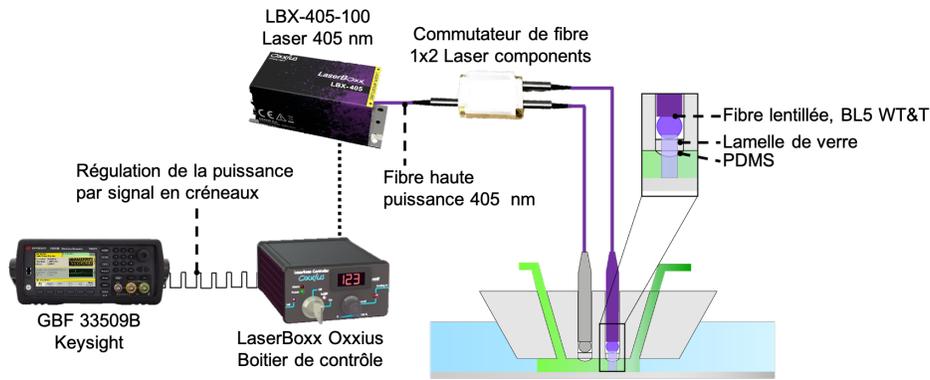
Afin de profiter de deux tailles de spot différentes, nous avons créé des têtes d'impression qui peuvent accueillir deux fibres optiques. L'une d'elle peut fournir un spot fin pour des impressions hautes résolutions, et l'autre un spot plus large pour des impressions rapides. Nous utilisons un commutateur de fibre pour choisir la position où la lumière de la fibre optique qui sort de l'émetteur laser doit être transmise (voir Fig. 2.5.A)

2.2 Développement de la plateforme expérimentale

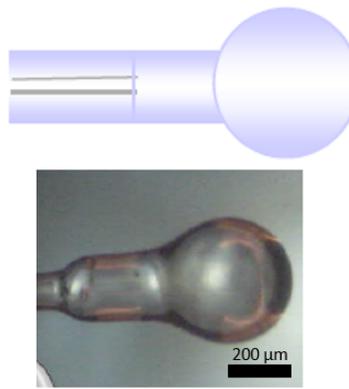
Après avoir expliqué le concept général de l'imprimante, nous décrivons dans cette partie la plateforme expérimentale, hors les parties fluide et optique déjà présentées. Nous y développons la méthode de fabrication des têtes d'impression, les modalités de déplacement XYZ, les appareils de microscopie et les dispositifs de régulation thermique. Ces aspects sont décrits ici afin de comprendre la plateforme dans son ensemble, puis certains seront approfondis dans les chapitres associés.

2.2.1 Contrôle des trajectoires d'impression

Le déplacement sur les trois axes s'effectue grâce à une platine planaire et un actionneur linéaire (voir Fig. 2.6.B). Le déplacement dans l'axe Z s'effectue par un actionneur *LTA-HL*, *Newport* sur lequel est fixée la tête d'impression. Sa résolution de déplacement est de 3 μm sur une plage de déplacement de 25 mm. Une platine *ASI MS-2000* est utilisée pour les axes XY. Son positionnement est précis à



(a) Schéma du montage instrumental optique



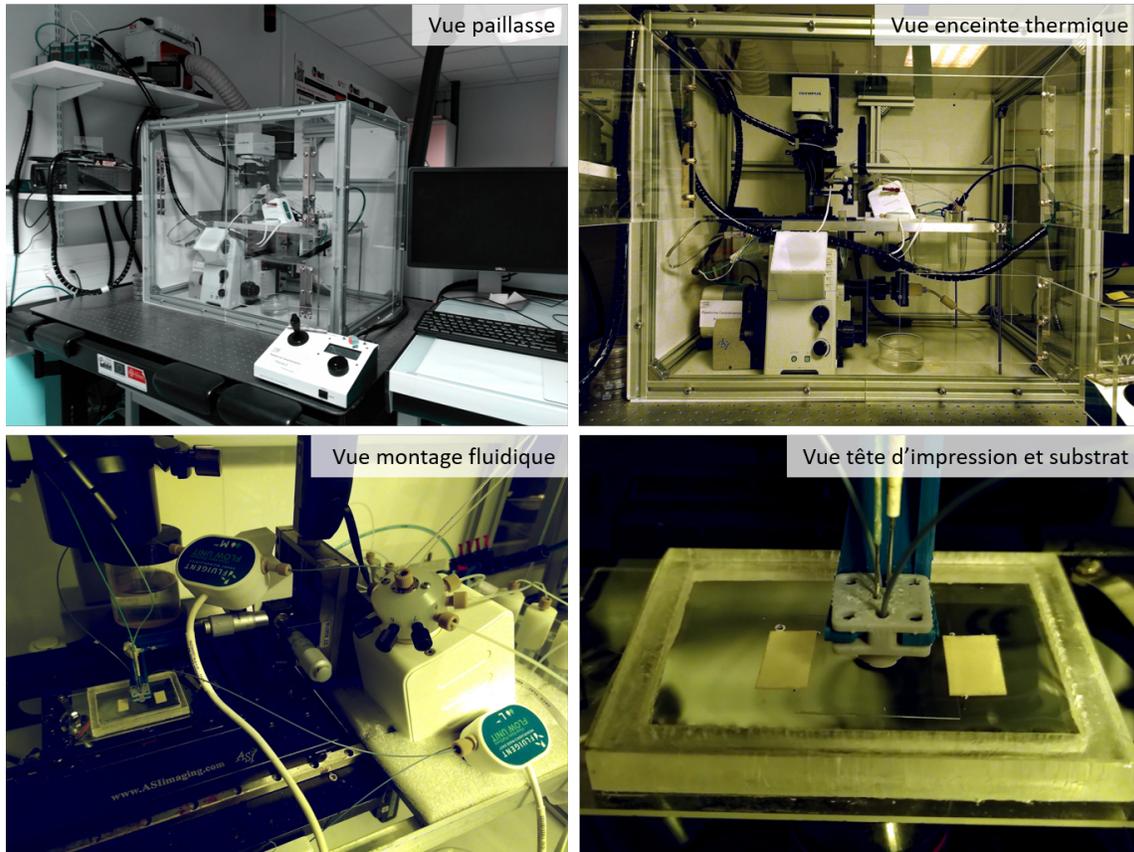
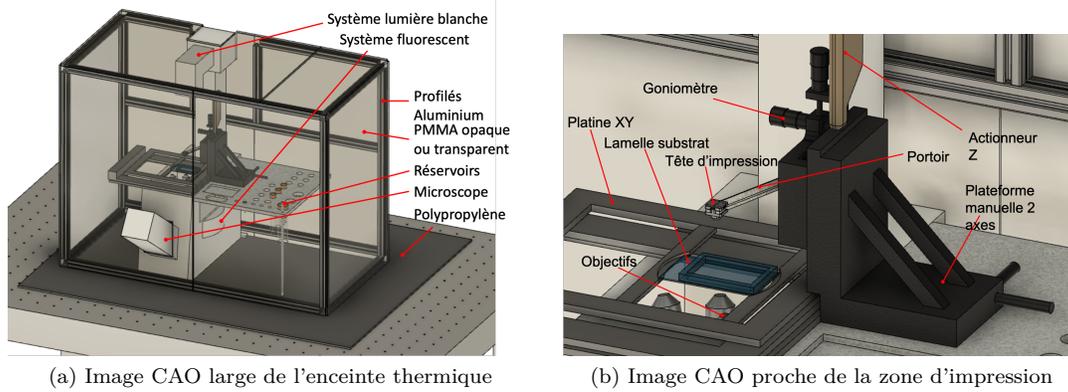
(b) Schéma et image de la fibre optique lentillée

FIGURE 2.5 – Montage optique

1 μm sur une plage de déplacement de 110 mm · - 120 mm. La tête est fixe dans le plan et le substrat se déplace par rapport à celle-ci. Le boîtier de commande de la platine opère aussi le déplacement de la focale du microscope. Sur l'ordinateur, nous avons donc l'information du placement de la tête par rapport au substrat, l'information de la hauteur à laquelle l'utilisateur observe et la hauteur de la tête par rapport à l'origine de l'actionneur Z.

Un goniomètre deux axes est fixé sur l'actionneur Z. Sur ce goniomètre est positionnée une pièce imprimée en 3D qui maintient la tête d'impression. L'enchaînement est le suivant : actionneur Z porte le goniomètre qui porte le portoir qui porte la tête d'impression. Le goniomètre permet de régler l'horizontalité de la tête d'impression et son parallélisme avec le substrat.

Un microscope inversé (*IX71 Olympus*) nous permet d'observer en direct les déplacements, les flux fluidiques et les impressions. L'actionneur Z qui porte la tête d'impression est situé verticalement au-dessus de l'objectif grâce au réglage d'une plateforme manuelle via deux vis de précision. Pour la création d'objets 3D, la tête d'impression reste fixe par rapport au microscope sur le plan XY, car c'est la platine XY qui maintient le substrat qui se déplace. Le microscope profite d'objectifs de grossissement x 2.5, x 4, x 10, x 20 et de filtre DAPI, FITC, mCherry et lumière blanche. La lumière d'illumination provient d'une lampe Olympus meure U-RFL-T pour la fluorescence et d'une lampe Olympus blanche TH4-200. Une caméra *Nikon Nikon DS-Qi1Mc* permet de capturer l'objet. L'image est observée sur l'ordinateur *via* le logiciel *Nikon NIS-D*.



(c) Photographies de la plateforme à différentes distances

FIGURE 2.6 – Photographies et images CAO de la plateforme 3D-Flowprint

2.2.2 Contrôle thermique

Afin d'imprimer du GelMA, nous avons besoin de maintenir la chambre d'impression à 37°C. Cela permet aussi d'encapsuler des cellules dans le gel.

Méthode de régulation La régulation thermique s'effectue *via* une soufflerie d'air chaud. (Okolab G201-T-unit-BL). L'air est dirigé à travers un conduit flexible jusqu'au bas de l'enceinte. La boucle de contrôle peut s'effectuer *via* deux capteurs, le premier fonctionnant en immersion dans le milieu de l'échantillon et le deuxième dans l'air. L'ensemble de l'enceinte est chauffé, comprenant tous les équipements compris dans l'enceinte, le substrat d'impression, les réservoirs fluidiques et les tubes (voir Fig. 2.6.A). Environ quatre-vingt-dix minutes sont nécessaires pour permettre la montée en température jusqu'à 37°C.

L'enceinte est constituée de profilés aluminium de 30 mm pour les arêtes et de plaques des PolyMéthacrylate de Méthyle Acrylique (PMMA) pour les faces. Les faces sont en PMMA transparents pour le devant, le dessus et la droite (faces utilisateur) et en PMMA blanc opaque pour la face gauche et arrière. Le bas est en polypropylène, un matériau plus résistant chimiquement que le PMMA. Sur le devant, trois portes permettent d'accéder à l'intérieur de l'enceinte. Les parois sont percées d'ouverture pour laisser passer les câbles et tubes depuis les appareils extérieurs à l'enceinte. Les parois ont aussi des espaces pour encastrer certains appareils situés à moitié entre l'intérieur et l'extérieur.

Positionnement des modules La quasi-intégralité de la plateforme est contenue dans une enceinte thermique. Cela comprend le bâti de microscopie (comprenant le microscope, la caméra et le moteur de la focale), le module 3D (avec la platine XY, la lame de verre substrat, l'actionneur Z, le goniomètre, les fibres optiques et la tête d'impression) et le module fluïdique (à partir des réservoirs) et les capteurs de mesures thermiques.

À l'extérieur de l'enceinte se situe la majorité des appareils électroniques : la deuxième partie du module fluïdique (avec contrôleurs de pression, le contrôleur de vannes et le manomètre pour diminuer leurs pressions d'entrée), le module thermique (avec le boîtier de commande utilisateur, le boîtier de contrôle et le ventilateur chauffant), le module optique laser (le générateur basse fréquence, le boîtier de commande laser, l'émetteur laser et le commutateur de fibre), la deuxième partie du module de microscopie (avec les appareils d'illumination mercure et lumière blanche et le contrôle de la caméra), la deuxième partie du module 3D (avec le boîtier de contrôle de l'actionneur Z et le boîtier de commande utilisateur de la platine et de la focale) et le PC.

Au niveau des parois de l'enceinte se situent les sources lumineuses d'émission de lumière mercure et de lumière blanche classique. Ces sources sont situées sur le microscope, mais produisent de la chaleur et donc leur évacuation thermique doit se situer à l'extérieur de l'enceinte pour ne pas perturber la régulation thermique.

2.3 Environnement logiciel

Au point présent du manuscrit, nous avons décrit de manière générale les processus microfluidiques, optiques et instrumentaux. Du point de vue expérimental, il nous faut encore décrire les logiciels permettant de piloter la plateforme. Comme décrit dans l'état de l'art (voir partie 1.2.1.1), la création d'une pièce par impression 3D passe par une séquence conception sur un logiciel d'impression 3D. Une fois achevé, le design est exporté sous un format de fichier générique 3D, comme *STL*. Le fichier est ensuite analysé par un vectoriseur afin de déterminer les trajectoires de la tête d'impression. Enfin, le vectoriseur génère un fichier de commande lisible par le logiciel de pilotage de l'imprimante, typiquement sous le format *Gcode*. Une interface utilisateur permet enfin d'interpréter ce fichier Gcode et d'y associer les paramètres d'impression tels que la puissance laser, les pressions fluidiques, etc. L'ensemble de cette chaîne de pilotage a été développée pendant la thèse.

2.3.1 Conception 3D numériques des pièces avec Fusion 360

La conception assistée par ordinateur (CAO ou CAD en anglais) permet la création numérique de modèles 3D (voir Fig. 2.7). Ces logiciels permettent d'ajouter, soustraire, combiner des volumes, des surfaces ainsi que de nombreuses autres fonctions. Nous avons principalement utilisé le logiciel Fusion 360 pendant la thèse qui est pratique et facile. Fusion 360 a une organisation en arborescence de ses tâches et une trame de leurs ordres. Ce logiciel permet aussi la conception simple de plusieurs objets sur le même fichier, ce qui nous permet de créer des objets multimatériaux.

Nous avons utilisé ce logiciel autant pour la création CAO des têtes d'impression (voir partie Fig. 2.7 et 3.3, 3.4, 3.5) que pour les pièces en hydrogel (voir partie 5.6).

Comme la plupart des logiciels de CAO, Fusion 360 peut générer des fichiers STL (STL est tiré de *Standard Triangle Language*). Les STL sont des fichiers textes ou binaires codant les surfaces de l'objet par un pavage de triangles. Le STL stocke les coordonnées 3D des trois angles de chaque triangle de la surface de l'objet.

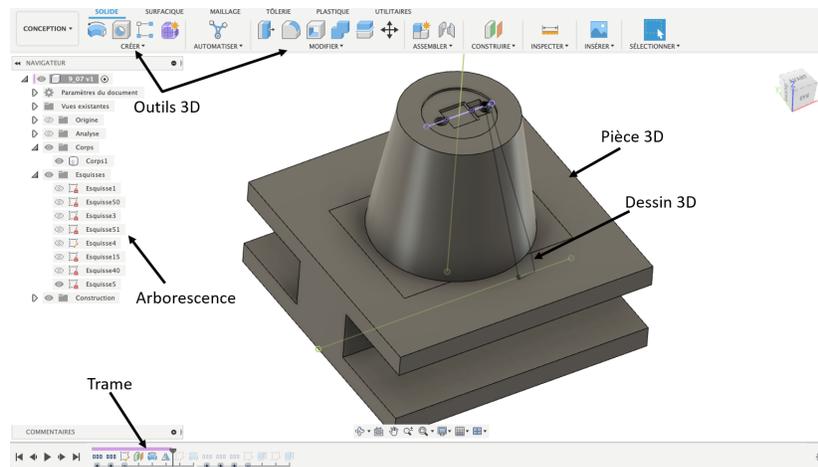


FIGURE 2.7 – Capture d’écran du logiciel de CAO Fusion 360

2.3.2 Développement d’un vectoriseur

Nous avons besoin d’un vectoriseur (*slicer* en anglais), pour générer l’ensemble des vecteurs d’impression composant le structures. Cette tâche est impossible à coder manuellement en raison au nombre de trajectoires dépassant rapidement plusieurs centaines ou milliers d’unités. Nous avons choisi de développer un vectoriseur spécifique à l’imprimante 3D-FlowPrint.

2.3.2.1 Les raisons du développement d’un vectoriseur spécifique

Une fois la pièce créée en 3D par CAO, il faut pouvoir l’imprimer par la technologie choisie, ce qui requiert l’emploi d’un vectoriseur. Ce travail est effectué par le logiciel propriétaire Factor pour l’impression des têtes d’impression avec l’imprimante DWS (voir section 3.3.2). La plupart des méthodes d’impression 3D procède vecteur par vecteur, au contraire de la création d’une couche entière en une seule fois comme en photolithographie par projection. Le vectoriseur doit donc recréer l’objet total par juxtaposition de vecteurs dans l’espace tridimensionnel. Il permet de décomposer l’objet 3D en couches (d’où le nom anglais de *slicer*) pour obtenir la forme discrétisée de l’objet suivant l’axe Z. L’espace entre deux lamelles correspond à l’épaisseur d’une ligne imprimée. Puis chaque lamelle est vectorisée dans le plan XY pour que la juxtaposition de vecteurs remplisse la lamelle. Ceci est le principe générique d’un vectoriseur. Il est ensuite possible de modifier de nombreux paramètres comme la distance entre chaque lamelle (*slicing* en anglais), la distance entre chaque vecteur (*hatching* en anglais) et donc le chevauchement entre les lignes imprimées, la marge en bordure des lamelles, l’agencement des vecteurs, etc.

Dans notre cas, nous avons choisi de développer un nouveau vectoriseur pour les raisons suivantes :

- Grâce aux caractéristiques opto-fluidiques de la plateforme, nous avons besoin de certaines commandes spécifiques (par exemple : contrôle des flux et puissance optique en fonction des trajectoires) qui ne sont pas prises en charge par les logiciels connus.
- La polymérisation en flux par la technologie 3D-FlowPrint requiert un ordonnancement des trajectoires. Par exemple, il est préférable d’imprimer successivement des lignes juxtaposées afin de garantir la stabilité mécanique de la structure globale. De plus, nous souhaitons avoir la capacité d’imprimer dans une seule direction, ce qui est rarement autorisé par les logiciels courant .
- Nous voulons utiliser plusieurs matériaux pour imprimer des objets hétérogènes. La plupart des vectoriseurs ne le permettent pas, ou parfois seulement pour deux ou trois matériaux. Nous ne voulons pas être limités.
- Nous voulons profiter de la multirésolutions qui nous est accessible en variant la puissance du laser, la vitesse d’impression ou plutôt la fibre optique utilisée (voir partie 5.1.3). Nous voulions un vectoriseur capable d’extraire les couches inférieures ou les parties centrales des objets qui ne nécessitaient pas de précision afin de les imprimer en basse résolution, pour gagner en vitesse

d'impression. Dans ce cas, aucun des vectoriseurs accessibles ne le permettait. Il était possible de concevoir l'objet en deux parties et de choisir une résolution d'impression plus importante pour la partie centrale; une méthode considérée comme longue et compliquée. Cet argument est la principale raison qui nous a poussé à développer un nouveau vectoriseur.

- o Finalement, le développement d'un vectoriseur dont nous maîtrisons la méthode permet de l'adapter à d'autres plateformes d'impression. Nous avons travaillé à transférer certaines parties pour un vectoriseur par impression d'unités cubiques en 2-photons. Nous avons aussi pensé à le combiner à la manipulation de sphéroïdes. Ces développements sont détaillés dans cette section.

Ce travail, qui a nécessité le développement de plus de 1400 lignes de code, a représenté une part conséquente du travail de thèse réalisé notamment pendant la période de confinement sanitaire. Une description synthétique de ce travail est donnée ci-dessous, le code est disponible sur demande.

2.3.2.2 Mode opératoire de la vectorisation d'une pièce pour la plateforme 3D-FlowPrint

Le vectoriseur a été écrit dans le langage *Python*. L'image 2.8 montre les étapes clés du vectoriseur. Son fonctionnement complet est décrit dans l'annexe page 169. Cette annexe contient beaucoup d'informations pour résumer les 1400 lignes du programme informatique. Elle pourra servir aux utilisateurs qui souhaiteraient améliorer le programme. Nous avons essayé de prévoir les erreurs potentielles et d'afficher des messages expliquant à l'utilisateur leurs causes.¹

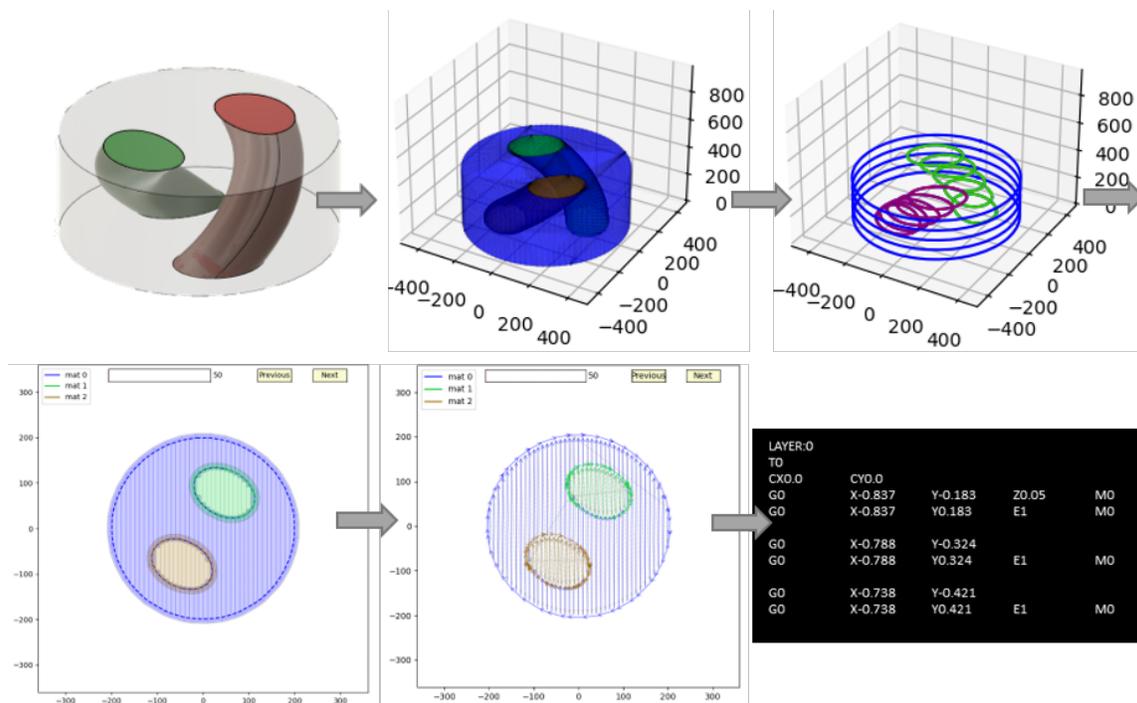


FIGURE 2.8 – Images des étapes successives du vectoriseur développées en Python. Le vectoriseur reçoit en entrée la pièce STL, dont il extrait les coordonnées de la triangulation. Il lamellise ensuite la pièce. Puis, il vectorise chaque lamelle et les arrange. Enfin, il extrait un fichier Gcode contenant l'ensemble des vecteurs permettant d'imprimer la pièce.

Le protocole (n°1, p.172) détaillé aussi en annexe permet de vectoriser une pièce pour l'imprimante 3D-FlowPrint. Les variables à l'œuvre sont expliquées. Les protocoles détaillés dans le manuscrit sont en gris, fortement inspirés de publications externes, ou en rouge, développés pendant la thèse.

1. En cas d'une nouvelle erreur, nous conseillons alors à l'utilisateur de se tenir bien droit, de dire tout haut avec aplomb "Tis but a scratch",²³⁴ d'observer le schéma en annexe et de se plonger dans le code.

2.3.3 Interface logicielle

Le fichier Gcode du vectoriseur doit être interprété par un logiciel de commande instrumental. Ce logiciel doit aussi permettre la communication de toutes demandes utilisateur en dehors d’une impression et afficher l’état de la plateforme. Le programme de commande instrumental a été codé sous LabVIEW, en grande partie durant la thèse. Il fait la jonction entre l’utilisateur, les fichiers STL 3D et les appareils instrumentaux électroniques.

Présentation du programme La face avant affiche toutes les variables des appareils, les éléments de calibration, les vecteurs d’impression et les boutons de commande (voir Fig. 2.9). Il fonctionne avec une machine à états avec les états suivants : *Initialisation*, *Calibration*, *Événements*, *Fermeture*. Ces quatre états s’enchaînent entre le lancement du programme et sa fermeture. L’*initialisation* entame la communication avec les différents appareils, mets les valeurs par défaut aux variables et télécharge la dernière calibration de la hauteur. Il est possible de revenir à l’étape de l’initialisation par le biais d’un événement. La *calibration* ordonne aux appareils leurs méthodes de fonctionnement. La *fermeture* stoppe toutes les actions en cours des appareils et clôture les protocoles de communication.

L’étape *Événements* réagit aux commandes de l’utilisateur avec une structure *Events*. Si aucun événement n’a été déclenché, le programme lit les variables de mesures des instruments (par exemple, le débit effectif en entrée et sortie). Souvent, un événement est l’actionnement par l’utilisateur d’un bouton, comme *Commande par le débit de l’injection* : le programme va ordonner au module Fluigent associé d’activer la commande en débit à la valeur décidée par l’utilisateur. Plusieurs événements sont plus complexes pour calibrer l’expérience, effectuer le nettoyage des appareils fluidiques, charger ou modifier les vecteurs, afficher le schéma du placement respectif de la tête par rapport au substrat, etc.

Présentation de la séquence logiciel d’une impression Pour imprimer, le programme lit un tableau de vecteur. Chaque vecteur contient les informations nécessaires à son impression : coordonnées XY de son déplacement, hauteur d’impression Z, vitesse de déplacement, fibre optique à utiliser, état et puissance du laser. De manière générale, seulement un vecteur sur deux commande l’allumage du laser. Le premier vecteur imprime une ligne, puis le second vecteur sert simplement à se repositionner pour que le troisième vecteur puisse imprimer une nouvelle ligne. Ces vecteurs sont stockés dans des fichiers textes, ligne par ligne, variable par variable.

Ces vecteurs peuvent être écrits sur LabVIEW et enregistrés. On peut aussi écrire un fichier texte ouvrable par LabVIEW, ce qui est fastidieux. Nous avons développé un vectoriseur qui permet de créer automatiquement un fichier *gcode* à partir de fichiers de pièces 3D *STL* (voir partie 2.3.2. *Gcode* est le format classique de commande de machines industrielles à plusieurs axes. Ce programme, écrit sous Python, peut ouvrir des fichiers de pièces 3D *STL*, les segmenter, les vectoriser et écrire le *gcode* avec un certain nombre de variables utilisateurs. Il peut facilement générer plusieurs milliers de vecteurs, ce qui est impossible à la main. Le logiciel LabVIEW a ensuite été codé pour pouvoir lire ces fichiers *gcode*, qu’ils proviennent de notre propre vectoriseur ou d’un autre. C’est avec ce logiciel que nous avons imprimé les pièces les plus complexes. Le détail de son fonctionnement est détaillé dans la partie 2.3.2, car pour ce chapitre la programmation des vecteurs à la main est suffisante.

D’autres variables plus annexes sont aussi présentes comme la capacité d’attendre un temps déterminé entre deux vecteurs avant de continuer, de modifier les flux ou de stocker le centroïde de l’impression en cours. Enfin, d’autres variables sont générales à l’ensemble de l’impression comme le temps d’attente avant ou après l’allumage du laser, le fait de garder le laser allumé si deux vecteurs successifs impriment ou le fait de relever la tête pour le renouvellement des flux lors d’une attente. Lors d’une impression, le programme lit le premier vecteur et commande successivement aux appareils pour allumer le laser, puis se déplacer, puis attendre la fin du déplacement, puis couper le laser (actions principales).

Une structure avec deux boucles productrice — consommatrice (plutôt qu’une structure événement) serait plus efficace et plus robuste, afin de pouvoir accumuler les demandes de l’utilisateur sur la face avant. La structure actuelle est en effet bloquée tant que l’action en cours n’a pas été traitée. Pour certaines longues actions en boucle (impression, nettoyage fluidique), des boutons d’arrêt ont été mis en place qui permettent de rentrer dans ces boucles pour les arrêter. Un bouton d’arrêt général est aussi présent. Ces commandes sont passées en référence dans les sous-programmes afin de pouvoir être lues en dehors du *Main*. Une structure productrice — consommatrice simplifierait ces fonctions.

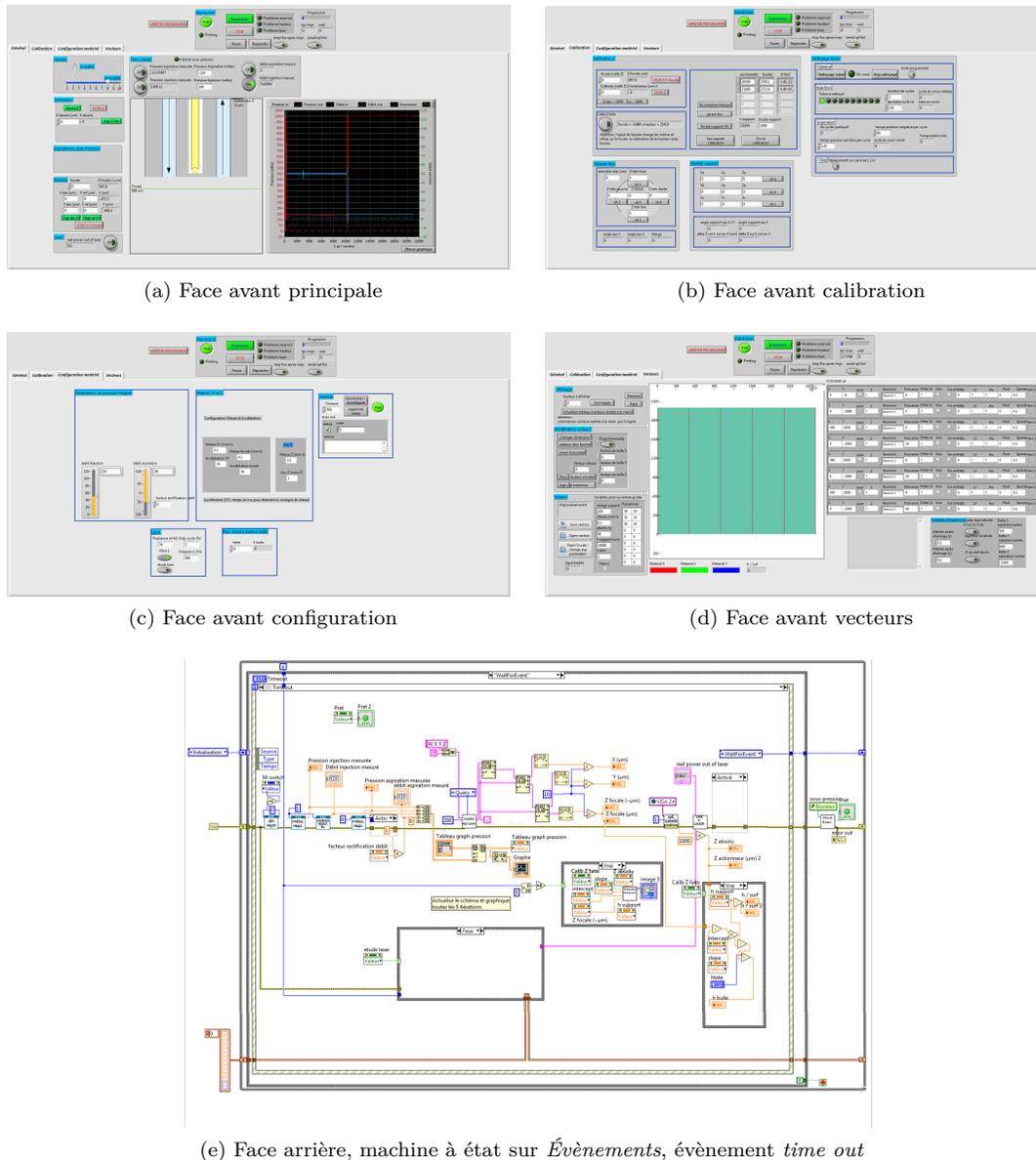


FIGURE 2.9 – Images du logiciel de contrôle expérimental LabVIEW

2.4 Méthodologie et préparation d'une impression

Les méthodes et protocoles pour réaliser des impressions sont l'objet de ce paragraphe. Les étapes d'une impression sont décrites pas à pas, à commencer par la préparation des solutions photopolymérisables, du substrat, de la plateforme d'impression pour finir par l'explication de la séquence expérimentale.

Préparation des solutions Le polymère principalement utilisé pendant la thèse a été le PEGDA photo-polymérisé grâce à l'ajout d'un photoinitiateur (LAP). Pour réaliser des structures support (scaffolds en anglais), nous avons rajouté à la solution d'hydrogel de l'acide acrylique et de la fibronectine afin de promouvoir significativement l'adhésion des cellules.⁵² Pour réaliser des structures chargées en cellules (cell-laden en anglais), nous avons utilisé une solution à base de GelMA. Le protocole de préparation (n°2, p.174) est présenté en annexe.

Traitement de surface des substrats en verre Le but de cette fonctionnalisation est d'apporter sur la surface d'une lamelle de verre support à l'impression 3D une couche d'accroche pour immobiliser de façon covalente l'hydrogel photoactivable. Ceci est réalisé par silanisation de la lamelle avec un silane-méthacrylate. Le substrat est constitué d'une lamelle de microscopie de 24 mm · 32 mm · 150µm en verre. La lamelle est fixée sur une lame plus grande (75 mm · 50 mm). Cette lame peut se positionner sur la platine XY. Un cadre en PMMA de 8 mm de haut a aussi été fixé, afin de pouvoir remplir l'espace central de solution. Le substrat complet est montré sur la figure 2.10.

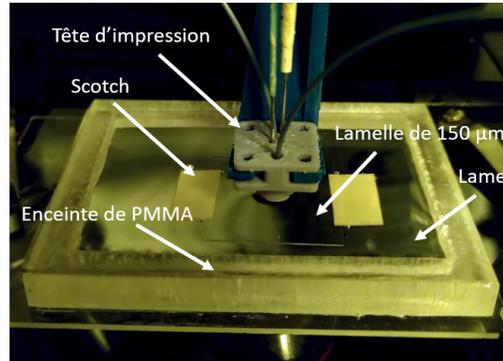


FIGURE 2.10 – Image du montage de la lamelle recevant l'impression, sur une grande lame de 75 mm · 50 mm dimensions

Afin de favoriser l'adhésion du matériau polymérisé sur le substrat, nous effectuons préalablement un traitement de surface. Nous utilisons du 3-(Triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (MAPTMS). Le mécanisme est détaillé dans la partie 5.2.5.1. Le protocole (n°3, p.175) est extrait de l'équipe de Koskele *et al.*²³⁵ et détaillé en annexe.

Initialisation de la plateforme La plateforme 3D-FlowPrint combine des instruments permettant un contrôle des paramètres optiques, fluidiques, thermiques, mécaniques et d'imagerie. La procédure d'initialisation de l'ensemble de ces instruments (n°4, p.175) est décrite en annexe.

Calibration et alignement de la tête En cas de changement de tête d'impression ou pour une autre raison, la calibration de la position de la tête par rapport au substrat est à refaire. Il faut calibrer le parallélisme entre le plan de déplacement de la tête et le substrat (voir protocoles n°5, p.176 et n°6, p.176), et la distance qui les sépare (voir protocole n°7, p.177). Nous effectuons ces calibrations de manière préférentielle dans l'air, avant d'avoir ajouté le milieu. Nous utilisons pour cela la focale commandée numériquement dont on peut mesurer l'altitude relative.

La calibration de l'horizontalité de la tête et du substrat est importante afin d'éviter d'abîmer des structures préalablement imprimées lors d'un déplacement, comme décrit dans la partie 4.2.2. La calibration de l'altitude relative de la tête d'impression par rapport au substrat est aussi importante, car elle impactera l'épaisseur des structures créées lors de la première couche. Nous utilisons à la fois la focale et l'actionneur en Z.

Calibration de la dose et lancement de l'impression Avant de commencer l'impression voulue, il est nécessaire de vérifier le spot optique (voir protocole n°8, p.177), la dose de polymérisation et la largeur de ligne associée (voir protocole n°10, p.179). Il faut aussi vérifier le chevauchement des lignes juxtaposées nécessaire à la création d'une surface uniforme. Une modification de l'état de la tête d'impression, de la solution ou des flux peut faire varier ces paramètres. Une fois ces caractérisations effectuées, il est possible de commencer l'impression de la pièce voulue (voir protocole n°11, p.180). Nous décrivons également les protocoles de commencement et de fin d'une impression avec le rinçage des tubes et de nettoyage (voir protocoles n°9, p.178 et n°12, p.180).

Calibration de la bulle d'air pour impression de GelMA L'impression de GelMA a nécessité le développement de nouvelles têtes d'impression (voir partie 3.5). Dans cette génération, les têtes ne sont pas séparées du fluide polymérisable, au niveau de la zone optique, par une surface de PDMS

mais par une bulle d'air. La bulle d'air empêche l'adhérence du matériau sur la tête. Il est nécessaire de calibrer cette bulle d'air en début d'expérience et de mesurer sa hauteur par rapport au substrat (voir protocole n°13, p.181).

Conclusion et perspectives du concept et de la plateforme

Dans ce chapitre, le concept de la polymérisation en flux a été décrit. En résumé, ce concept est une sonde microfluidique mettant en circulation séquentiellement des fluides photopolymérisables et les polymérisant *via* une fibre optique insérée dans la sonde pour former des objets multimatériaux 3D. Les aspects fluidiques et optiques ont été développés. Leurs instrumentations ainsi que celles de l'ensemble de la plateforme ont été présentées. Les logiciels de vectorisation et d'instrumentation, codés pendant la thèse, sont également décrits. Finalement, les méthodes et protocoles pour la réalisation d'une impression sont présentés en annexe, depuis la préparation des pièces 3D sur ordinateur jusqu'au nettoyage d'une pièce, en passant par les calibrations instrumentales.

Maintenant que les concepts nécessaires ont été exposés, les parties suivantes pourront analyser plus en détail les phénomènes fluidiques et optiques. Dans ces chapitres, les différentes variables à l'œuvre sont analysées et caractérisées afin de pouvoir permettre une impression 3D d'hydrogel photopolymérisable efficace.

Chapitre 3

Développement de têtes d'impression opto-fluidiques

3.1	Architecture et objectifs fonctionnels	56
3.2	Génération 1 : Têtes d'impression usinées en matériau silicone	59
3.3	Génération 2 : Têtes monolithiques obtenues en impression 3D	61
3.3.1	Fabrication des têtes par stéréolithographie	62
3.3.2	Protocole de fabrication	62
3.3.3	Caractérisation des têtes monolithiques	64
3.4	Génération 3 : Têtes d'impression hybrides	69
3.4.1	Protocole d'assemblage des têtes d'impression hybrides	70
3.4.2	Caractérisation des têtes par microscopie électronique	71
3.5	Génération 4 : Têtes hybrides avec bulle d'air	72
3.5.1	Contexte : adhésion de biomatériaux	72
3.5.2	Description du concept de photopolymérisation au contact d'une bulle d'air : Air-Assisted Printing	73
3.5.3	Optimisation de la géométrie des têtes d'impression par bulle d'air	75
3.5.4	Caractérisation des têtes d'impression assistées par bulle d'air	76
3.5.5	Caractérisation du spot optique	80

Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser sur la conception, le principe de fonctionnement et les méthodes de fabrication des têtes d'impression. L'architecture actuelle est le résultat d'un processus de développement et d'optimisation qui a été mené tout au long de la thèse, que nous présenterons dans la première partie de ce chapitre. Nous commençons par la description d'une première génération de têtes d'impression usinées en matériau silicone qui a permis d'atteindre les premières preuves de concept du dépôt et de la polymérisation opto-fluidique d'un hydrogel, le PEGDA. Les performances et les capacités de structuration 3D offertes par l'impression 3D nous ont ensuite amenés à faire évoluer le procédé de fabrication afin d'améliorer les performances optiques et fluidiques des têtes. Nous décrirons ensuite une deuxième génération de têtes 3D monolithiques qui a démontré l'intérêt des technologies de fabrication additive pour notre projet, mais qui n'a pas permis d'atteindre les objectifs fixés, entre autres du fait des limitations imposées par les propriétés optiques des matériaux. Une évolution vers une troisième génération de têtes hybrides nous a permis d'atteindre nos objectifs en combinant une tête imprimée en 3D et un assemblage de matériaux transparents. Finalement, le développement d'une

quatrième et dernière génération de têtes intégrant un concept de bulle d'air a été initié pour répondre à des problématiques d'adhésion d'hydrogel, en particulier pour le GelMA.

3.1 Architecture et objectifs fonctionnels

Les têtes d'impression doivent valider plusieurs objectifs fonctionnels. Les aspects principaux sont fluidiques, optiques, dimensionnels et la capacité d'imprimer et de polymériser des matériaux photosensibles. Ils sont illustrés sur la figure et décrits ci dessous 3.1.

Objectifs fluidiques

- Les têtes s'apparentent à des sondes microfluidiques.
- Les têtes d'impression doivent comporter deux canaux microfluidiques débouchants. L'un pour l'injection, l'autre pour l'aspiration.
- Les têtes d'impression doivent permettre le confinement fluide de la solution injectée afin d'empêcher la contamination du milieu dans lequel elles sont immergées pendant l'impression (voir partie 2.1.2 pour le détail du confinement fluide). Pour cela, la géométrie de la surface face au substrat doit être mise en forme. La création de structures de surface ou de canaux microfluidiques ouverts peut aider la collecte de l'hydrogel injecté au profit de la contamination.
- Facultatif : Le diamètre des canaux à l'extrémité de la tête doit être le plus faible possible (100 - 500 μm) afin de diminuer la taille de la tête à son extrémité.
- Facultatif : Dans la partie arrière de la tête, les canaux présente un diamètre qui décroît progressivement afin de bloquer automatiquement les tubes fluidiques insérés et la fibre optique.
- Facultatif : Dans les canaux, au niveau du blocage des tubes, une diminution brutale du diamètre vers le diamètre interne des tubes permet de ne pas modifier l'environnement fluide pour les solutions. Dans le cas où ces solutions contiennent des cellules, il est préférable de maintenir une section constante à travers l'ensemble de la tête en limitant les changements de diamètre (voir partie 6.3.0.8). Après le blocage des tubes, le diamètre des canaux doit donc être le diamètre interne des tubes. Les canaux devraient avoir un diamètre plus large à l'arrière (1.5 mm), puis une diminution progressive afin de bloquer les tubes (environ 600 μm), puis une diminution brutale au niveau du blocage des tubes (250 μm), puis un diamètre constant jusqu'à l'extrémité de la tête.

Objectifs optiques

- Les têtes d'impression doivent inclure une fibre optique afin de permettre la photo-polymérisation des hydrogels à imprimer. Cela implique d'implémenter un "canal" pour permettre le passage d'une fibre optique lentillée. Pour plus de clarté, nous appellerons ce canal le canal optique.
- La tête d'impression opère en immersion. Le canal optique doit donc être clos afin que la solution ne soit pas en contact avec la fibre optique et ne polymérise pas à son contact.
- La lumière doit pouvoir traverser la cloison du canal optique, afin d'illuminer dans la zone de photo-polymérisation, sans modification de son cône optique. Le système permettant de séparer la fibre optique de la solution doit donc être transparent.
- La lumière de la fibre optique passe à travers un matériau bouchant le canal optique avant d'atteindre la solution polymérisable. La solution polymérisable ne doit pas adhérer à ce matériau afin que l'objet polymérisé soit accroché au substrat et non à la tête.

Aspects dimensionnels

- Au niveau de la surface au substrat, les têtes doivent avoir le diamètre le plus petit possible afin de diminuer l'empreinte sur le substrat ($D \leq 6 \text{ mm}$). Elles doivent permettre d'imprimer dans des espaces confinés comme des puits de plaque de culture.
- De même, nous souhaitons que les têtes soient assez hautes pour imprimer au fond de ces puits ($h \geq 1.5 \text{ cm}$).

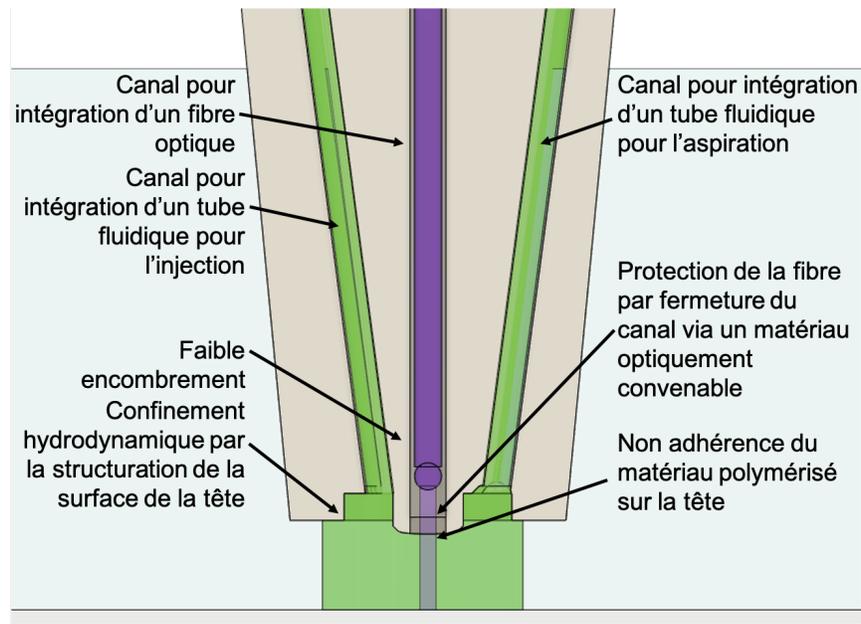


FIGURE 3.1 – Schéma des objectifs fonctionnels des têtes d'impression

- La structuration 3D des têtes d'impression doit permettre le confinement de la solution injectée. Des structures sur la surface de la tête avec une résolution d'environ $20\ \mu\text{m}$ sont nécessaires pour guider les écoulements.

Aspects matériaux de la tête et mises en forme

- Le matériau composant la partie doit pouvoir être mis en forme par manufacture soustractive (exemple : polyuréthane) ou additive (exemple : DL260)
- Au niveau de la zone de photo-polymérisation, le matériau imprimé ne doit pas adhérer à la tête d'impression. Lors de la photo-réticulation de l'hydrogel, il doit adhérer au substrat, ou à la couche imprimée précédente, et non à la tête d'impression. Pour cela, l'ajout d'une couche de PDMS est la méthode la plus simple pour empêcher l'accroche des hydrogels acrylates polymérisés. Elle doit être déposée à l'interface à l'extrémité de la tête, dans la partie qui sera en contact avec la zone de polymérisation. Nous détaillons le principe d'action du PDMS sur la réticulation dans la partie sur les mécanismes chimiques de photo-polymérisation (voir partie 5.2.5.2).
- La méthode de fabrication doit être reproductible.
- Facultatif : La méthode de création doit être simple (réalisable par un nouvel expérimentateur avec un protocole), rapide (moins d'un jour) et à bas prix (moins de 100 € / tête).
- Facultatif : La méthode de création doit être modulable, afin de pouvoir améliorer ou adapter la tête au besoin.

Pour atteindre ces critères, une évolution a eu lieu depuis des têtes usinées et moulées en silicone, puis des têtes entièrement imprimées en 3D. Aujourd'hui, les têtes sont imprimées en 3D puis assemblées pour remplir l'ensemble du cahier des charges. Nous verrons dans la dernière partie de ce chapitre que nous avons développé un nouveau concept d'Air-Assisted Printing qui remplit ce cahier des charges pour imprimer du GelMA avec une bulle d'air plutôt qu'une couche de PDMS, pour empêcher l'adhésion de l'hydrogel polymérisé sur la tête. L'image 3.2 affiche les quatre générations de tête. Le tableau 3.1 compare les différentes générations en mettant en évidence les limitations des premières générations. Chaque génération sera détaillée dans les parties suivantes.

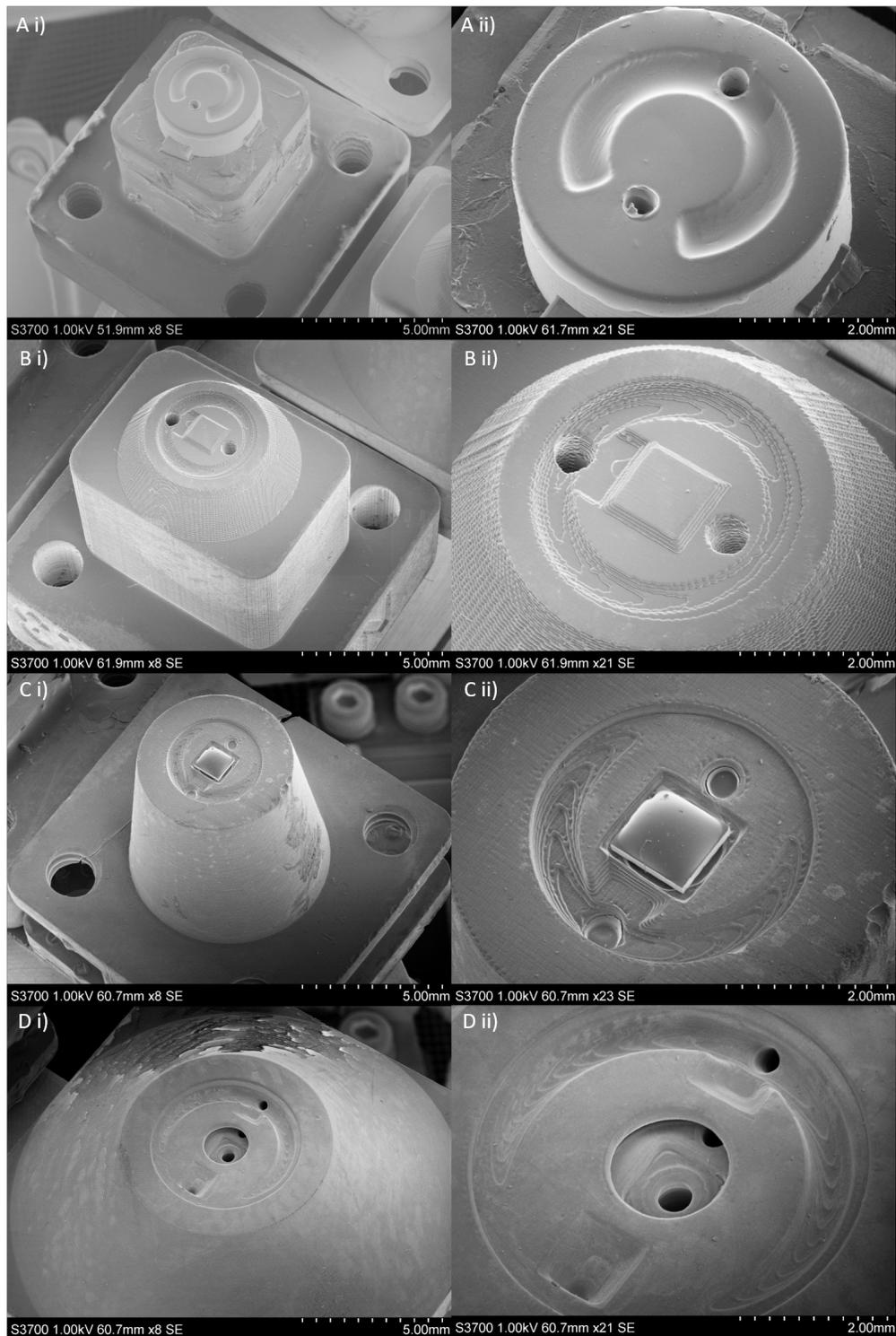


FIGURE 3.2 – Images MEB des quatre générations de tête d'impression. i) Vue large. ii) Vue proche. A) Tête usinée et PDMS moulée. B) Tête monolithique imprimée en 3D. C) Tête hybride imprimée en 3D et post assemblée. D) Tête pour impression avec bulle d'air.

Génération	Mise en forme	Transmission optique	Méthode de prototypage	Intégration de fonctions fluidiques	Non-adhérence du PEGDA sur les têtes	Non-adhérence du GelMA sur les têtes
1. Têtes usinées avec silicone moulé	-	≈	-	-	+	-
2. Têtes monolithiques imprimées en 3D	+	-	+	+	+	-
3. Têtes hybrides imprimées en 3D et assemblées	+	+	+	+	+	-
4. Têtes hybrides avec bulle d'air	+	≈	+	+	-	+

TABLE 3.1 – Tableau comparant les générations des têtes d'impression en mettant en évidence les avantages et limitations.

3.2 Génération 1 : Têtes d'impression usinées en matériau silicone

Description Cette première génération s'appuie sur les développements réalisés en microfluidique autour du PDMS (PolyDiméthyl Siloxane), un matériau très largement éprouvé en microfluidique. Ce design s'appuie sur les capacités de reproduction d'un contre-moule par du PDMS. Sur le contre-moule sont présentes des structures nécessaires au confinement du matériau injecté.

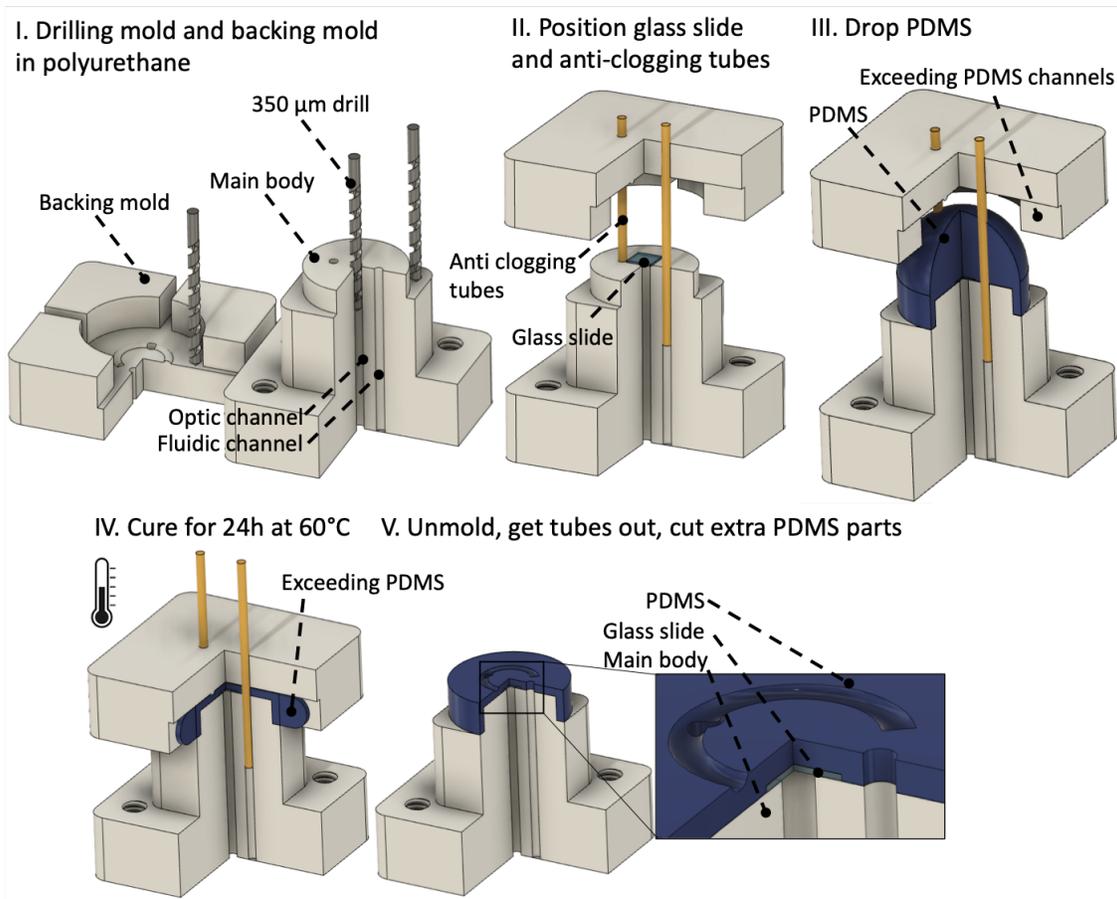
Cette approche est basée sur une technologie hybride d'intégration d'un dispositif PDMS sur une base micro-usinée en polyuréthane, comme décrit sur la séquence de schéma de la figure 3.3.A. La base est réalisée par usinage à grande vitesse (UGV, Réalméca RV2 SP, X. Dollat, LAAS). Pour les canaux, nous utilisons un foret de taille 350 μm , depuis un côté de la tête puis l'autre. Un foret aussi fin était trop court pour traverser entièrement la tête. La difficulté revient alors à aligner la tête pour que les deux perçages de chaque canal soient colinéaires.

Le design de ces dispositifs est principalement limité par les capacités d'usinage en trois axes qui imposent des orientations de canaux dans des plans perpendiculaires ou parallèles aux plans des surfaces. De plus les dimensions et rapport d'aspects des outils d'usinage imposent des limites quant au diamètre et à la profondeur des canaux.

Pour le moulage du PDMS à venir, un contre-moule est usiné avec la même méthode. Il comprend la géométrie de surface en négatif, deux canaux en face des canaux fluidiques de la tête d'impression et des goulottes d'échappement pour extraire le surplus de PDMS lors du collage.

La tête est déposée avec l'extrémité côté polymérisation vers le haut. Pour le moulage, une lamelle de verre de $2 \cdot 2 \text{ mm}^2$ est déposée au niveau du canal optique, afin d'isoler la fibre optique du PDMS à venir. Un capillaire fluide est inséré dans chacun des canaux fluidiques afin de les garder ouverts lors du moulage du PDMS. Une goutte de PDMS (Sylgard 184 1 :10) est déposée sur le haut de la tête. Ensuite, les deux capillaires, déjà inséré dans la tête, sont passés à travers les deux trous dans du contre-moule ce qui aide à l'alignement du moule avec le contre-moule. Le contre-moule est finalement abaissé afin de s'encastrent sur la tête. Le PDMS est confiné entre les deux pièces et l'excès est chassé sur les côtés. L'ensemble est recuit pendant 24h à 60°C. Le contre-moule est retiré avec les capillaires.

Nous obtenons alors une tête usinée comprenant les trois canaux comme sur la figure 3.3.B. Le canal optique est fermé par une lamelle de verre. La lumière traverse la lamelle puis le PDMS.



(a) Séquence d'assemblage d'une tête usinée avec moulage de silicone



(b) Photo d'une tête avec le moulage en PDMS à côté du contre-moule.

FIGURE 3.3 – Schéma d'assemblage et photo de têtes usinées avec silicone moulé

Objectifs atteints et capacité d'utilisation Sur la figure 3.4, il est possible de comparer le faisceau témoin de la fibre seule avec le faisceau produit lorsque que la fibre est incluse dans le canal optique de la tête d'impression. Des contrôles systématiques sont réalisés pour chaque génération de tête d'impression. Ils ont été réalisés en observant une coupe du faisceau laser à différentes distances de l'extrémité de l'objet (la lentille de la fibre pour le témoin ou l'extrémité des têtes), comme décrit dans la partie 5.2. Les valeurs sont normalisées et les couleurs claires se rapprochent de la puissance nominale.

Ces têtes bénéficient d'un spot optique convenable ($30 \mu\text{m}$ à FWHM à $z = 50 \mu\text{m}$), bien que légèrement supérieur (environ 2 fois la taille du spot naturel), ce qui valide les objectifs optiques. La

distance focale de la fibre témoin est de $750\ \mu\text{m}$. Le point focal (diamètre de spot le plus petit) du faisceau à travers la tête de première génération se situe directement à la sortie de la tête. Le point focal réel est sûrement situé dans l'épaisseur de PDMS, ce qui conduit donc à un élargissement du faisceau après ce point focal. Après le focus, le centre du faisceau perd en puissance (disparition du blanc et bleu des seuils à 90% et 50%), mais le faisceau reste environ constant sur $500\ \mu\text{m}$ pour le seuil à 25% (vert) et sur $1000\ \mu\text{m}$ pour les seuils à 2% et 10% (orange et rouge).

Lors des impressions, la non-adhérence du matériau imprimé (PEGDA) sur les têtes d'impression est effective grâce à la couche de PDMS à l'extrémité de la tête. Cette génération nous a permis de réaliser les premières validations du concept de photopolymérisation en microfluidique et d'apporter la preuve de concept de la plateforme 3D-FlowPrint. Dans le chapitre sur la photopolymérisation en flux, les objets des images 5.12.A et 5.13.A ont été imprimés ainsi.

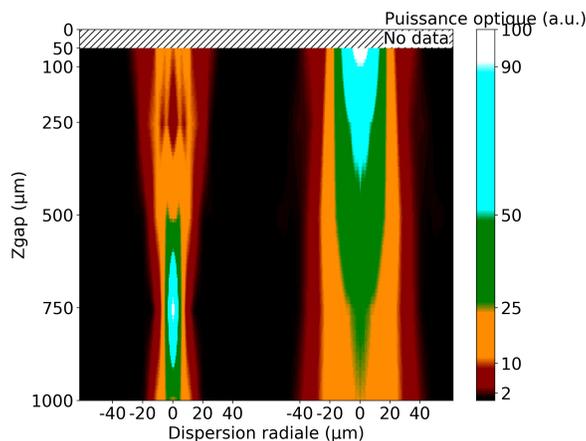


FIGURE 3.4 – Comparaison du faisceau optique entre la fibre nue et la fibre à travers une tête de première génération. Puissance optique normalisée mesurée dans l'axe vertical depuis l'extrémité de la fibre nue (faisceau gauche) ou de la tête (faisceau droit). Méthode de caractérisation détaillée dans la partie optique (voir 5.2)

Difficultés associées à la méthode de fabrication Cette première génération de tête d'impression comporte de nombreuses limitations, principalement d'ordre technologique. Elle n'admettait que des canaux droits et des têtes courtes ($\leq 1\ \text{cm}$) à cause du perçage avec des micro-forets. La méthode requiert aussi une maîtrise fine de l'usinage, du perçage et du moulage. Ces étapes sont techniquement exigeantes et peu reproductibles.

Enfin, l'usinage puis le moulage ne permettent pas d'atteindre une résolution suffisantes pour les motifs de surface permettant le confinement de la solution injectée. Nous pouvons voir des défauts du PDMS sur la figure 3.3.A. Sur la figure 3.2.A, le PDMS moulé sur la tête est visible avec peu de motifs de surface. À ces points se rajoutent l'incapacité d'adaptation du modèle. Pour ces raisons, nous avons préféré nous diriger vers la fabrication en impression 3D des têtes d'impression.

3.3 Génération 2 : Têtes monolithiques obtenues en impression 3D

Dans cette partie, nous passons de méthodes de fabrication soustractive à positive. Nous y décrivons comment l'impression 3D permet la création de têtes monolithiques en résines transparentes. Nous caractérisons ces têtes sous les aspects dimensionnels et optiques.

3.3.1 Fabrication des têtes par stéréolithographie

L'impression 3D a ouvert de nouvelles opportunités pour la création des têtes d'impression monolithiques transparentes. Nous y détaillons aussi le design des têtes monolithiques de la seconde génération.

3.3.1.1 Les avantages offerts par l'impression 3D

La fabrication par impression 3D permet d'augmenter la reproductibilité de la production. Il s'agit de méthodes bas coût pour la production de petits lots, de l'ordre de quelques unités par semaine (voir partie 1.2.1.1). Cela permet aussi de produire des pièces de prototypage sur-mesure, plus rapidement et facilement qu'en manufacture soustractive.

En utilisant la machine DWS décrite ci-après, une résolution supérieure à celle accessible par usinage et moulage est envisageable. Les dimensions des canaux peuvent aussi être réduites pour atteindre des diamètres de 200 μm permettant de réduire le diamètre des têtes. La juxtaposition proche de plusieurs canaux, fluidiques et optiques devient également possible. Il est également possible de bloquer les fibres optiques à l'intérieur du ou des canaux optiques à différentes hauteurs pour créer des spots optiques de différentes tailles (voir partie 5.1.3).

L'image 3.5 montre les développements successifs des têtes d'impression. L'impression 3D nous a permis d'améliorer par itération la géométrie des canaux, la géométrie des structures de surface (voir partie 4.2), les dimensions des têtes, la méthode de fixation et d'insérer une seconde fibre. Finalement, cette méthode a rendu possible la création des dernières générations de têtes d'impression dans lesquelles une bulle d'air doit être générée et maintenue (voir partie 3.5).

3.3.1.2 Description de l'architecture des têtes monolithiques

L'impression 3D permet de créer des canaux non-débouchants. Le canal optique peut rester clos grâce à une fine membrane transparente de quelques centaines de micromètres. Cette membrane transparente pourrait remplacer la lamelle de verre afin d'isoler le canal optique. Ces têtes sont donc entièrement imprimées en 3D, d'où le nom de *monolithiques*. Les figures 3.6 montrent deux vues CAO de ces têtes.

Nous avons développé cette idée qui correspond à la seconde génération de têtes d'impression. L'impression 3D nous a permis de rapidement étudier plusieurs géométries. Nous avons choisi de créer une membrane de 180 μm d'épaisseur. Nous avons utilisé des résines transparentes, comme la DS3000 développée par *MicroResist* ou la HF12 développée par *MicroResist* (pour des raisons de confidentialité, aucune citation n'est incluse). En effet, la lumière de la fibre optique doit traverser la membrane de la résine avant d'atteindre la zone de polymérisation. Les propriétés optiques de ces deux résines sont analysées dans la partie 3.3.3.3.¹

3.3.2 Protocole de fabrication

3.3.2.1 Description de la méthode d'impression

La méthode de dessin par ordinateur est détaillée dans la partie 2.3.1. Les développements autour de l'impression 3D ont été réalisés au sein de la plateforme MultiFAB du LAAS-CNRS²³⁶) qui concentre plusieurs systèmes de lithographie laser haute résolution.

Nous avons utilisé l'imprimante de stéréolithographie 29J+ de la société DWS, qui utilise un laser à 405 nm. Nous profitons d'une résolution d'impression de 40 μm en XY et de 30-50 μm en Z. Le laser se déplace à la vitesse de 5800 mm/s, ce qui nous permet d'imprimer un lot de huit têtes d'impression en trois heures environ.

1. Lors de la présentation du protocole d'impression, nous abordons aussi la résine DL260 qui est chargée en nanoparticules de céramique. Cette résine n'est pas transparente et n'a donc pas été utilisée pour cette génération de têtes. Nous présentons tout de même ses conditions d'impression, car cette résine est utilisée pour les générations trois et quatre des têtes d'impression.

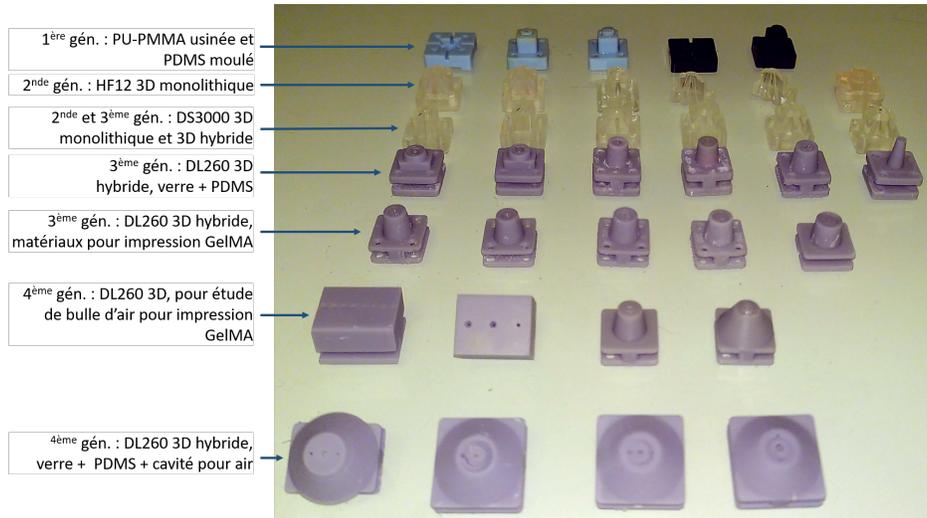


FIGURE 3.5 – Image de plusieurs générations de têtes mettant en avant les développements successifs. De haut en bas : 1^{ère} ligne, moulées : usinées et moulées, puis imprimées en 3D et moulées. 2^{ème} ligne, imprimées en HF12 (Microresist GmbH) : avec membrane classique, puis avec membrane fine, puis imprimées avec membrane perpendiculaire au substrat, puis deux moitiés de tête avec membrane, puis assemblées avec lamelle de verre 2 mm · 2 mm. 3^{ème} ligne, imprimées en DS3000 : Reproduction du design antérieur en impression 3D, puis avec membrane, puis avec membrane et PDMS, puis PDMS collé pour boucher le canal optique, puis verre collé pour boucher le canal optique + PDMS, puis tête avec deux canaux d'injection. 4^{ème} ligne, DL260 assemblées : Évolution des structures de surface, puis nouvelle évolution, puis évolution du design général et lamelle collée, puis avec blocage de la fibre à une hauteur spécifique, puis avec deux emplacements de fibre, puis pour impression dans puits exigus. 5^{ème} ligne, DL260 avec surface pour impression de GelMA : Surface de PDMS + F27, puis surface de PDMS + PolyHEMA, puis PDMS + FDTS, PEGDA + MAPTMS, puis film FEP. 6^{ème} ligne, pour étude de la bulle d'air : dispositif de piégeage passif, puis dispositif actif, puis cavité passive pour bulle d'air extérieure, puis cavité active pour bulle d'air extérieure. 7^{ème} ligne, méthode d'assemblage de la lamelle pour bulle d'air : lamelle intégrée dans la tête en *print & stop*, assemblage de la lamelle puis d'une rondelle, petite lamelle hélicoportée, lamelle moyenne hélicoportée. Se référer aux générations associées pour les détails.

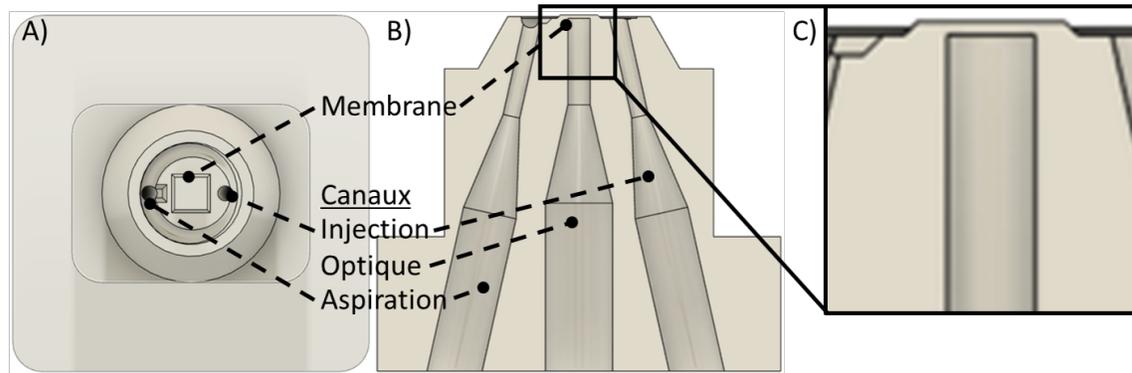


FIGURE 3.6 – Images CAO des têtes d'impression avec membrane optique en résine. A) Schéma CAO d'une tête d'impression avec membrane en vue de dessous. B) Schéma CAO d'une tête d'impression avec membrane en vue de coupe. C) Schéma CAO d'une tête d'impression avec membrane en vue de coupe proche.

3.3.2.2 Description des paramètres d'impression

Pour une impression avec de la résine DL260, nous imprimons avec une distance entre lignes (hatching en anglais) de $30\ \mu\text{m}$ et une distance entre couches (slicing en anglais) de $30\ \mu\text{m}$. Ces valeurs peuvent varier en fonction de l'absorbance de la résine et de son pouvoir de photo-polymérisation. Pour les résines DS3000 et HF12, le hatching vaut typiquement $50\ \mu\text{m}$. Pour une meilleure résolution et un meilleur état de surface, nous pouvons changer le slicing et le hatching sur les dernières couches. Le slicing sur la figure 3.8 passe de $50\ \mu\text{m}$ à $30\ \mu\text{m}$.

L'agencement des différentes pièces à imprimer pendant la même opération est effectué sous le logiciel *NAUTA*. Nous devons rajouter des piliers supports lors de l'impression des têtes qui servent soutenir la pièce sur la plateforme et à soutenir les parties suspendues. Les piliers sont coupés lors du développement. L'image 3.7 montre quatre têtes avec des piliers.

Nous importons ensuite un fichier qui est lu par le logiciel de commande de l'imprimante *FICTOR*. *FICTOR* réalise la vectorisation de la pièce puis commande l'imprimante elle-même.

Une fois les pièces imprimées, elles sont développées avec un solvant qui permet de solubiliser la résine non réticulée. Nous utilisons de l'isopropanol pour la DS3000 et l'HF12 et de l'acétone pour la DL260. Après avoir brisé les piliers, nous alternons les rinçages avec le solvant et le séchage sous azote. Il est possible finaliser la polymérisation des pièces dans une enceinte UV ($5\ \text{min}$, $5\ \text{mW}/\text{cm}^2$).

Le protocole n°14, p.181 détaille le processus de création des têtes d'impression. Il est centré sur la résine DL260, qui est celle utilisée par les dernières générations (générations 3 et 4).

3.3.3 Caractérisation des têtes monolithiques

Une fois les têtes d'impression créées, nous les avons caractérisées afin de vérifier si elles validaient les objectifs. Nous les avons caractérisées sur le plan dimensionnel, sur la rugosité de surface et sur la transmission optique de la lumière de la fibre.

3.3.3.1 Caractérisation dimensionnelle

Les structures de surface à la surface de la tête, qui servent à confiner le fluide injecté, ont été optimisées par simulation en parallèle du développement instrumental des tête. La géométrie finale de la surface des tête est décrite dans la partie 4.2.2 dans le chapitre suivant. La surface des têtes comprend une gorge (sillon circulaire entourant les trois canaux), une couronne (disque sur la périphérie), une rampe (structure creuse proche du canal d'aspiration) et un dôme (au niveau du canal optique). Pour la génération présente, le dôme est remplacé par une pyramide.

La figure 3.8 présente des images MEB de têtes d'impression avec membrane. La plupart des têtes ont été imprimée à moitié afin de pouvoir visualiser les couches d'impression et la membrane. Nous pouvons noter le changement de hauteur de couche à la fin du canal optique. Les couches passent de

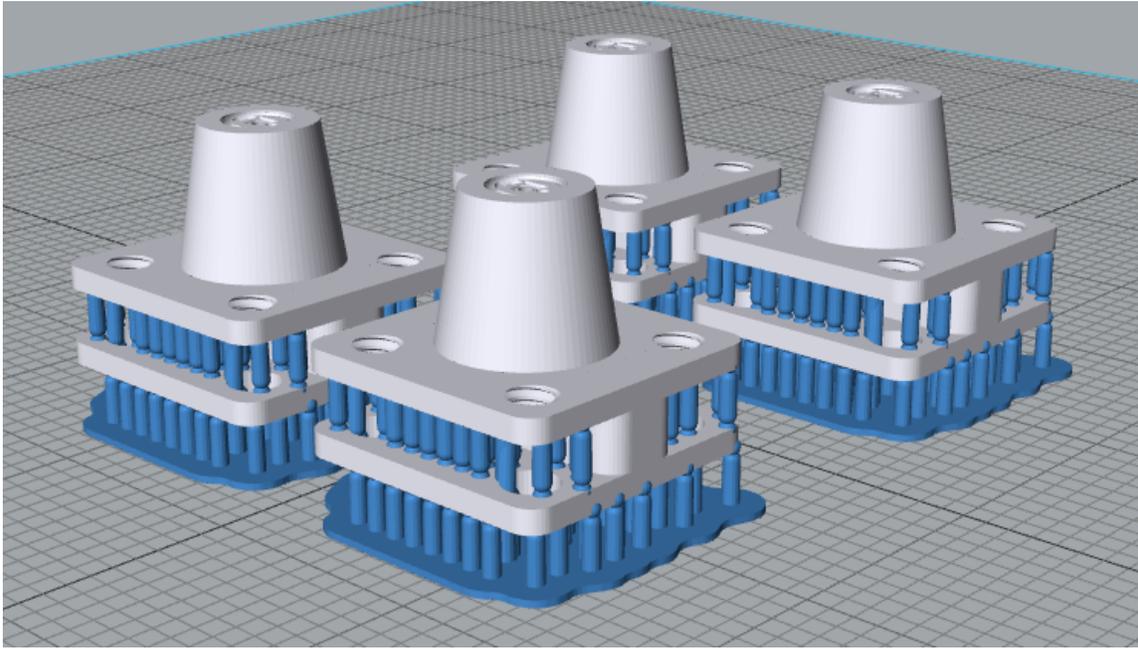


FIGURE 3.7 – Image du logiciel Nauta de quatre têtes avec piliers de soutien

50 μm à 30 μm afin d'obtenir de meilleurs motifs sur la surface de la tête, comme par exemple la gorge circulaire sur la figure 3.8.B-iii.

Les canaux fluidiques mesurent respectivement 510 μm et 530 μm . Pour les têtes de troisième et quatrième générations, le diamètre a été réduit à 400 μm . Les canaux optiques mesurent 680 μm et 615 μm respectivement. Nous avons réalisé des itérations sur le diamètre du canal optique pour obtenir le diamètre le plus favorable permettant de stabiliser la fibre optique sans devoir forcer pour l'insérer.

Les pyramides au-dessus des canaux optiques, à la place de simples membranes planaires, servent à éloigner légèrement le point de polymérisation du reste de la tête (voir partie 4.10). Les têtes A ont des pyramides plus larges que le canal optique pour réduire l'épaisseur de la membrane. Les têtes B ont des pyramides moins larges que le canal optique pour réduire la largeur de la pyramide. Pour la transmission du faisceau optique à travers la membrane, les têtes A sont plus adaptées, ceci bien que la pyramide soit moins favorable sur l'aspect microfluidique.

Cette analyse dimensionnelle a confirmé notre volonté de travailler avec l'impression 3D pour la création des têtes d'impression. Les géométries sont bien définies et il est possible d'imprimer des motifs aussi petits que des membranes de 170 μm . Cette nouvelle approche permet à la fois d'obtenir des canaux fins et précis, et des structures de surface complexes et résolues. Les têtes de seconde génération imprimées en 3D atteignent bien les exigences dimensionnelles. Dans les parties suivantes, nous étudions si les têtes de seconde génération peuvent aussi valider les exigences de rugosité de surface et les exigences optiques.

3.3.3.2 Caractérisation de la rugosité de surface

Nous avons caractérisé l'état de surface de cette génération de tête d'impression. La rugosité est un paramètre important, car dans le cas de têtes créées entièrement en 3D, la surface de la tête est directement en contact avec le biomatériau à polymériser (au contraire de têtes avec une couche de PDMS). Durant le processus d'impression la surface externe des têtes est polymérisée au contact de la couche de PDMS située au fond du réservoir. Bien que cette couche soit plane, nous observons une rugosité de surface liée à la distribution spatiale des trajectoires laser.

Nous modifions le hatching (distance entre deux passages parallèles du laser) sur les dernières couches afin d'améliorer l'état de surface des têtes d'impression. Si le hatching est trop grand, la distribution spatiale des trajectoires laser et de l'énergie distribuée dans la résine est inhomogène. Au contraire, avec un faible hatching, le chevauchement des trajectoires insolées permet d'atteindre une distribution spatiale de l'énergie plus uniforme. L'accumulation d'énergie contribue à polymériser la

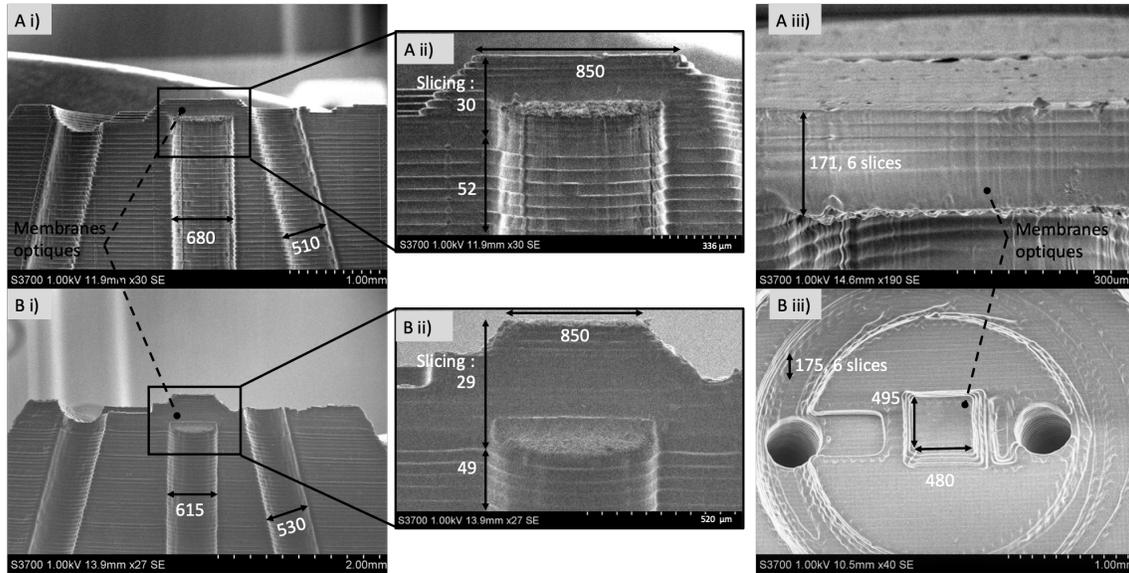


FIGURE 3.8 – Images MEB des têtes d'impression avec membrane optique en résine. Les pyramides au-dessus du canal optique, à la place de simples membranes planaires, servent à éloigner légèrement le point de polymérisation du reste de la tête (voir partie 4.10). Les têtes ont été imprimées de bas en haut, avec un slicing de 50 μm puis de 30 μm au niveau de la fin du canal optique. Mesures en micromètres. A) Têtes avec pyramide plus large que le canal optique pour réduire l'épaisseur de la membrane. B) Têtes avec pyramide moins large que le canal optique pour réduire la largeur de la pyramide. i) Vue large en coupe. ii) Vue proche en coupe. A iii) vue de la membrane très proche. B iii) Vue d'une tête du dessus.

couche et c'est donc un paramètre à favoriser.

Notre caractérisation s'est concentrée sur la résine DS3000. Nous avons fait varier le hatching de 30 μm , à 45 μm et à 60 μm . Les résultats sont présentés dans la figure 3.9. Nous pouvons voir sur les figures *i* que l'imprimante DWS réalise un hachurage dans les deux axes du plan XY ce qui donne un effet quadrillage. Les figures *ii* et *iii* sont obtenues à partir de mesures confocales et représentent la rugosité de la surface. Au croisement de deux passages du laser, la dose est maximale et correspond à une altitude maximum (en rouge sur la figure A.ii). A

Les différences d'altitude entre les sommets et les creux sont estimées à 30 μm en Z pour un hatching de 60 μm , à 12 μm pour un hatching de 45 μm et à 4.5 μm pour un hatching de 30 μm . Sur les figures *i* et *ii*, il apparaît clairement qu'un faible hatching permet en effet de diminuer la rugosité. Nous avons donc favorisé un hatching de 30 μm pour les dernières couches pour la création de têtes entièrement en 3D.

Pour la résine DS3000, nous avons conclu qu'un hatching de 30 μm permettait d'obtenir une rugosité de surface inférieure à $\pm 3 \mu\text{m}$. Au contraire, le hatching de base de 60 μm mène à une rugosité de $\pm 15 \mu\text{m}$. La rugosité atteignable par cette méthode est validée par rapport à la résolution recherchée par la plateforme (10 μm).

3.3.3.3 Caractérisation optique

Dans cette partie, nous caractérisons les performances optiques des têtes de seconde génération. Les résines ont des impacts différents sur la transmission optique en fonction de la résine utilisée. Nous avons également analysé l'impact du processus d'impression sur la transparence et la qualité optique des interfaces générées.

Observation du spot optique à travers une membrane de résine

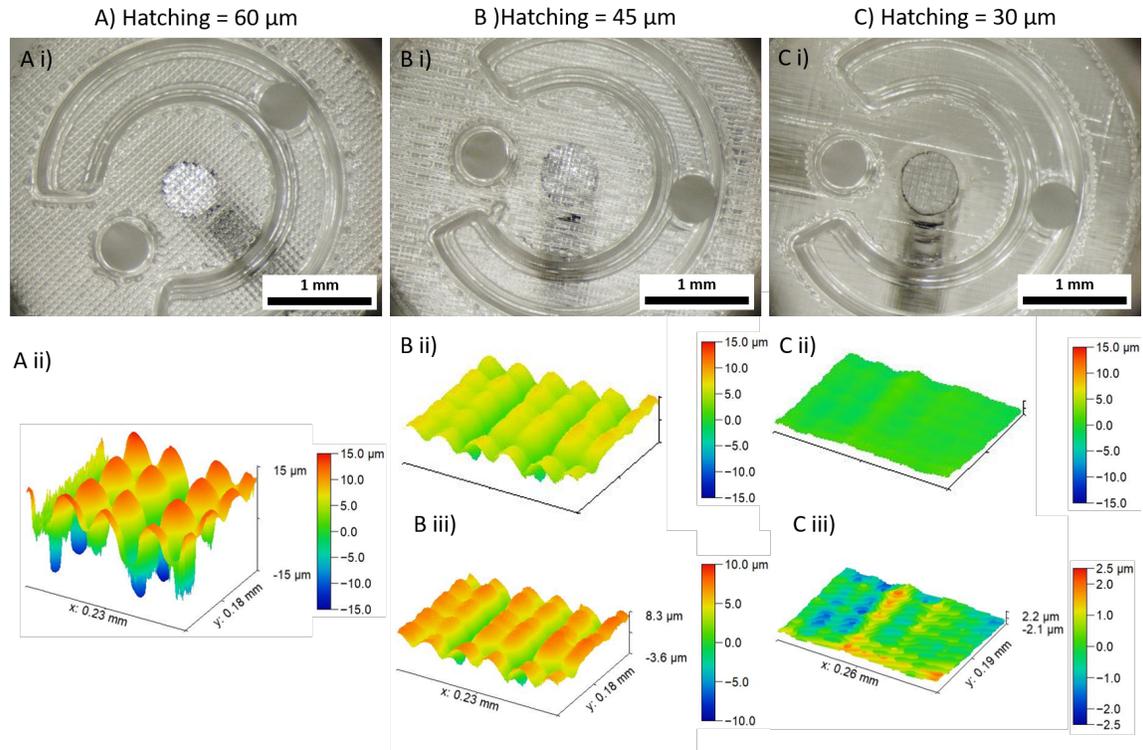


FIGURE 3.9 – Rugosité de surface de têtes d’impression en 3D avec l’imprimante DWS avec variation du hatching. A) Hatching = 60 μm . B) Hatching = 45 μm . C) Hatching = 30 μm . i) Image optique des têtes d’impression laissant apparaître le quadrillage du passage du laser de stéréolithographie. ii) Graphiques issus de mesures confocales affichés avec échelle commune $[-15; 15] \mu\text{m}$ pour comparer les données. iii) Graphiques identiques à ii) avec échelles adaptées pour mieux visualiser les rugosités respectives.

Caractérisation du spot optique à travers une membrane de DS3000 Une fois les premières têtes imprimées en DS3000, nous avons inséré une fibre optique à l’intérieur et observé le spot optique résultant. La lumière du laser traverse donc une membrane de 180 μm qui peut affecter l’optique. Nous avons observé un étalement important du faisceau optique avec un diamètre supérieur à 1 mm (voir 3.10.B). La figure 3.11 compare le faisceau témoin avec le faisceau à travers une tête monolithique et montre une forte distorsion de la distribution spatiale d’intensité en comparaison de celle attendue.

En effet, la DS3000 est polymérisée à 405 nm par le biais de son photo-initiateur et de son photo-absorbant, par conséquent, la résine absorbe à cette longueur d’onde. La résine utilisée est aussi fluorescente pour une longueur d’onde d’excitation de 405 nm avec une bande d’émission assez large. La résine diffuse et diffracte aussi la lumière. En conclusion, le matériau DS3000 n’est pas adapté à la réalisation de structures transparentes à 405 nm.

Caractérisation du spot optique à travers une membrane de HF12 Nous avons ensuite essayé avec une résine plus transparente, la HF12 (Microresist GmbH). Cette résine a été optimisée pour sa transparence à 405 nm bien qu’elle soit elle-même polymérisée à cette longueur d’onde. Après impression et développement de la pièce, des UVs sont appliqués pendant un temps long afin de détruire tous les photo-initiateurs et absorbants présents initialement². Nous pouvons voir sur l’image 3.10.C la présence d’un spot déformé (diamètre FWHM = 200 μm) et beaucoup plus large (200 μm) que le spot témoin (10 μm).

Effet de rugosité et d’impression couche par couche sur la transmission optique

2. pour des raisons de confidentialité la composition de la résine est confidentielle

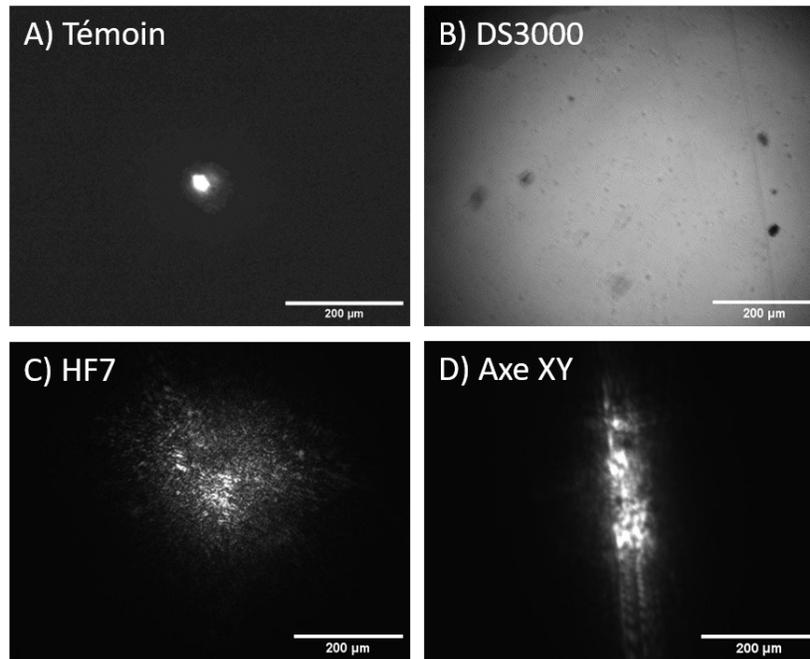


FIGURE 3.10 – Images des spots optiques à travers différentes têtes d'impression de seconde génération. Schéma du montage de la prise des images : image 5.2.B. A) Spot optique de la fibre optique nue pour témoin. La lumière ne traverse aucune membrane. B) Spot optique à travers une membrane en DS3000. C) Spot optique à travers une membrane en HF12. D) Spot optique à travers une membrane d'HF12 pour une tête imprimée dans le plan XY

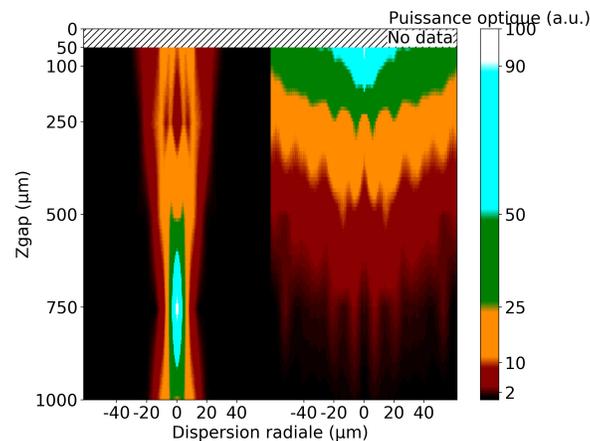


FIGURE 3.11 – Comparaison du faisceau optique entre la fibre nue et la fibre à travers une tête de seconde génération. Puissance optique normalisée mesurée dans l'axe vertical depuis l'extrémité de la fibre nue (faisceau gauche) ou de la tête (faisceau droit). Méthode de caractérisation détaillée dans la partie optique (voir 5.2)

effet de rugosité avec des têtes imprimées verticalement Malgré une amélioration sur le matériau entre la DS3000 et la HF12, nous avons découvert un deuxième effet néfaste. L'effet de rugosité ou *effet de barbe* est un phénomène résultant de l'impression couche par couche en stéréolithographie. Lors de l'impression de la membrane fermant le canal optique, le laser de la DWS est absorbé par la couche en cours et solidifie la résine. Malgré la présence d'absorbant t en solution en plus du photo-initiateur, la lumière traversante polymérise au-delà de la couche en cours et le faisceau laser induit une rugosité importante sur la face arrière des couches suspendues (voir Fig. 3.12.A). Cette polymérisation résiduelle est partielle et non régulière. Elle se traduit par la création de structures rugueuses (voir

Fig. 3.12.C-D-E). Sur la figure E, nous avons caractérisé une rugosité de $15\ \mu\text{m}$.

La présence de cette rugosité induit un effet de diffusion de la lumière important qui est à l'origine de l'étalement du spot observé dans les expériences précédentes (voir 3.10.C).

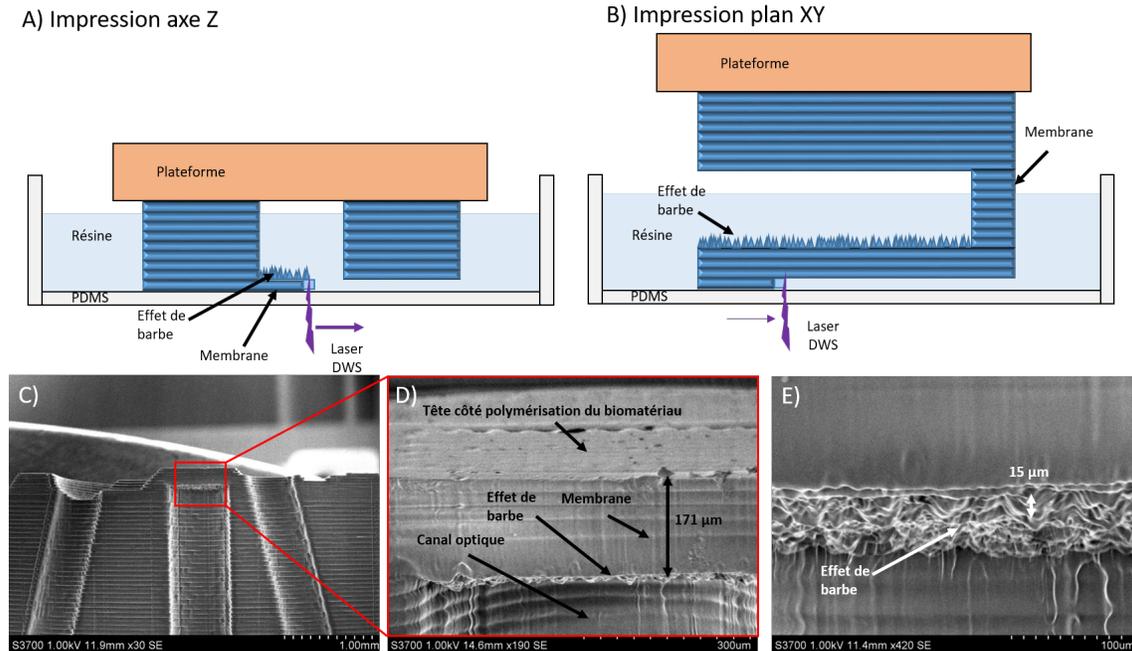


FIGURE 3.12 – Schémas et images MEB de l'effet de rugosité sur la membrane optique. A-B) Schémas de l'effet de rugosité dû à la polymérisation partielle de l'avant-dernière couche lors de l'impression de structures suspendues. A) Membrane imprimée dans l'axe Z. B) Membrane imprimée dans le plan XY. C-E) Images MEB de moitié de tête pour voir l'effet de rugosité en coupe. C) plan large. D-E) Plan proche.

Effet de diffusion avec des têtes imprimées perpendiculairement Nous avons essayé d'imprimer les têtes d'impression sur le côté afin que les irrégularités ne se situent pas sur le trajet optique (voir Fig. 3.12.B). Un premier point négatif apparaît par la rugosité augmentée à l'extérieur de la tête, dans la zone de photo-polymérisation du biomatériau (flèche *membrane* sur la figure 3.12.B). Ensuite, il semble que l'impression 3D, en vecteur par vecteur puis en couche par couche, crée une inhomogénéité dans la polymérisation. La lumière subit donc une déformation entre les couches. Le spot optique de telles têtes est montré sur la figure 3.10.D). Le spot est allongé dans la direction des couches.

En conclusion, nous avons montré que les têtes d'impression imprimées entièrement en 3D ne permettent pas de transmettre le faisceau optique dans de bonnes conditions. Les résines d'impression 3D qui nous étaient accessibles (DS3000 et HF12) diffusent et sont fluorescentes à $405\ \text{nm}$. L'effet de rugosité et la polymérisation 3D en couche par couche rajoutent des difficultés que ne peut surmonter la génération des têtes monolithiques.

Cependant, nous restons satisfaits par les autres performances de cette deuxième génération. L'impression 3D des têtes nous a en effet ouvert de nouvelles possibilités sur la résolution des motifs et sur les géométries accessibles. Il serait donc préférable de rester sur une technologie d'impression 3D, mais sans membrane en résine.

3.4 Génération 3 : Têtes d'impression hybrides

En remplaçant la membrane en résine par une lamelle de verre post-assemblée, la lumière de la fibre optique pourrait atteindre le biomatériau sans altération. Les têtes de troisième génération ne sont

donc pas monolithiques, mais combinent les avantages de l'impression 3D à la transparence optique du verre. Cette partie détaille le protocole de création de têtes hybrides de troisième génération. Ces têtes sont celles qui ont permis la caractérisation de l'environnement microfluidique (troisième chapitre du manuscrit) et de la polymérisation en flux (quatrième chapitre). Nous développons la caractérisation de cette génération à la suite.

3.4.1 Protocole d'assemblage des têtes d'impression hybrides

Afin de valider les exigences optiques, la troisième génération est basée sur des têtes assemblées composées d'une base imprimée en 3D et de fenêtres optiques composées d'un assemblage verre - PDMS. L'impression 3D des têtes d'impression permet d'obtenir la géométrie générale, la géométrie de surface de la tête et les trois canaux. Dans cette troisième génération, le canal optique est débouchant. Après impression, il est obturé par une lamelle de verre. Une couche de PDMS est ensuite rajoutée pour empêcher l'adhésion des hydrogels en cours de polymérisation sur la tête.

La séquence d'assemblage est décrite sur la figure 3.13.A et le protocole est décrit ci-dessous (voir protocole n°15, p.183). Après l'impression des têtes en DL260 avec la DWS (voir protocole n°14, p.181), il faut assembler la lamelle de verre. Pour cela, nous déposons en premier de la colle. Puis, nous positionnons la lamelle. Un recuit est effectué. Du PDMS est ensuite déposé et un second recuit est effectué.

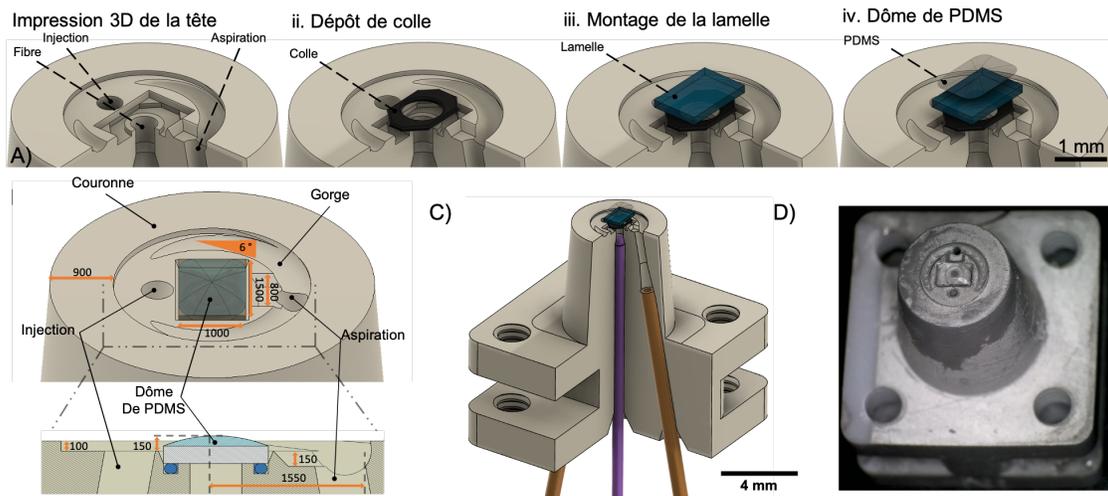


FIGURE 3.13 – Méthode de création et d'assemblage des têtes d'impression. A) Séquence d'assemblage des têtes par des images CAO. B) Image CAO détaillant la géométrie de la tête. C) Image CAO de l'assemblage avec les tubes fluidiques et la fibre optique avec une coupe d'un quart. D) Photographie d'une tête assemblée.

Pour obturer le canal optique, nous réalisons un assemblage avec la machine *Tresky 3000*, qui permet de positionner des outils précisément en XYZ grâce à des oculaires. Nous pouvons aussi utiliser une aspiration par le vide. Dans notre situation, nous l'utilisons pour positionner la lamelle en verre. La machine possède aussi une pressurisation positive qui peut se connecter à une seringue. Nous pouvons ainsi déposer un matériau liquide. Nous utilisons cette machine pour déposer la colle puis le PDMS.

La figure 3.13.C montre les dimensions du design le plus utilisé des têtes de troisième génération. L'image 3.13.D montre la structuration de la tête qui permettra d'obtenir l'effet de confinement du matériau injecté (voir 4.11). Lors de la conception CAO des têtes, nous prévoyons une encoche pour la lamelle avec une tolérance de 100 μm (voir Fig. 3.13.A.i-B). Dans cette encoche, nous réalisons une cavité supplémentaire pour introduire une colle thermosensible (colle époxy E301). Une bordure de 100 μm de haut permet de confiner la colle et de prévenir tout écoulement dans le canal optique. La lamelle de verre est posée sur ce disque et sur ses angles.

Nous avons choisi des lamelles de faibles dimensions afin de limiter les dimensions totales de la tête. Nous avons travaillé successivement avec des lamelles de $2 \cdot 2 \text{ mm}^2$, $1 \cdot 1 \text{ mm}^2$, $0,8 \cdot 0,8 \text{ mm}^2$ et $0,6 \cdot 0,6 \text{ mm}^2$. Par rapport aux contraintes de géométrie du paragraphe ci-dessus, les lamelles les plus

petites ($\leq 0.8 \cdot 0.8 \text{ mm}^2$), sont difficiles à positionner. Nous avons donc majoritairement travaillé avec des lamelles de 1 mm^2 . Le protocole n°15, p.183 est détaillé en annexe.

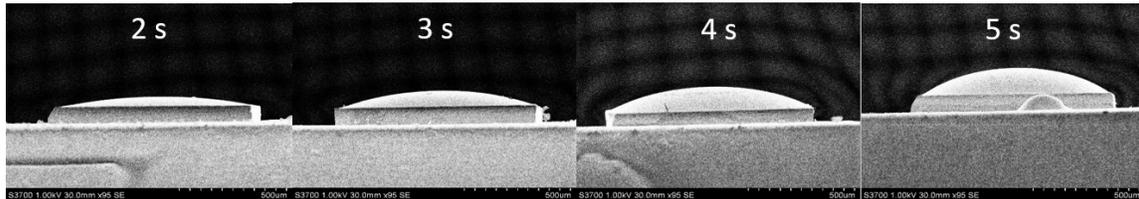
Nous avons choisi de travailler avec de la DL260 plutôt que de la DS3000 ou de la HF12. Face à la transparence de ces deux résines, la DL260, par son opacité, permet d'éviter tout phénomène de réflexion ou de propagation parasite de la lumière. La résolution de cette résine est aussi meilleure que celle de la DS3000.

Les figures 3.2 et 3.13.D montrent une vue générale des têtes de troisième génération, ainsi que les lamelles de verre et les couches de PDMS intégrées. Les canaux d'injection et d'aspiration sont visibles de part et d'autre du centre. Les motifs de surface de la tête sont aussi visibles.

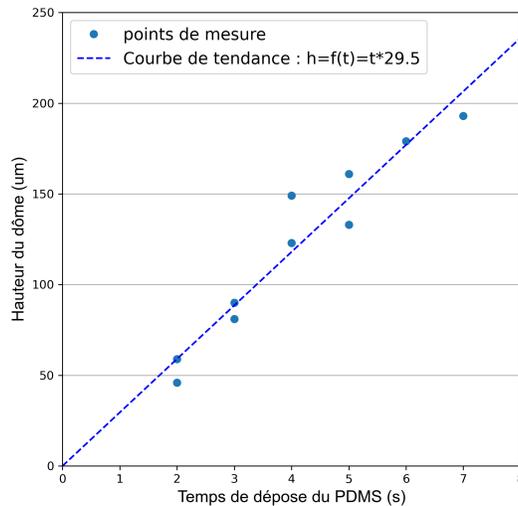
3.4.2 Caractérisation des têtes par microscopie électronique

3.4.2.1 Caractérisation du dôme de PDMS

Nous avons caractérisé la quantité de PDMS déposée. Nous voulons que le dôme dépasse de $50 \mu\text{m}$ du reste de la tête (donc de la couronne) et la couronne est haute de $100 \mu\text{m}$. Il faut donc que le dôme mesure $150 \mu\text{m}$ de haut. Nous avons déposé sur plusieurs échantillons, à 1 Bar de pression avec une pointe de seringue de gauge 27, pendant un laps de temps allant de 2 à 7 secondes. Nous avons mesuré au MEB la hauteur de chaque dôme et obtenu les résultats présentés dans la figure 3.14. Pour obtenir une hauteur de $150 \mu\text{m}$, nous devons donc déposer du PDMS pendant 5.1 s.



(a) Image MEB de dôme de PDMS avec des temps de dépôts différents



(b) Graphique des hauteurs des dômes de PDMS en fonction du temps sur des lamelles de $1 \text{ mm} \cdot 1 \text{ mm}$. PDMS déposé à 1 bar de pression, avec une pointe de seringue de gauge 27, avec l'appareil Tresky

FIGURE 3.14 – Caractérisation du dôme de PDMS déposé sur les têtes d'impression

3.4.2.2 Caractérisation optique des têtes de troisième génération

La figure 3.15 présente la caractérisation optique du faisceau optique à travers une tête de troisième génération. Le faisceau focalise $500 \mu\text{m}$ après l'extrémité de la tête. La forme du faisceau semble

similaire au faisceau témoin malgré un décalage du point de focalisation dans l'axe Z, ce qui prouve la qualité de l'interface optique. En fixant un seuil à 10% de la puissance, le diamètre est égal à 20 μm environ sur l'ensemble des 1000 μm mesurés en Z. Pour de la haute résolution, le faisceau mesure 6 μm au point focal. Il serait nécessaire de reculer la fibre dans la tête d'impression afin que le point ultra-focalisé soit proche de l'extrémité de la tête, à 50 μm et non pas à 500 μm . La construction des têtes par impression 3D permet de bloquer les fibres à la hauteur voulue dans le canal optique. Dans la partie 5.1.3, nous montrons comment nous pouvons obtenir un diamètre optique adapté à l'expérience en positionnant la fibre dans la tête. Cette génération de têtes permet donc d'atteindre nos objectifs en terme de diamètre de faisceau et d'adapter la largeur du faisceau optique à la distance de polymérisation.

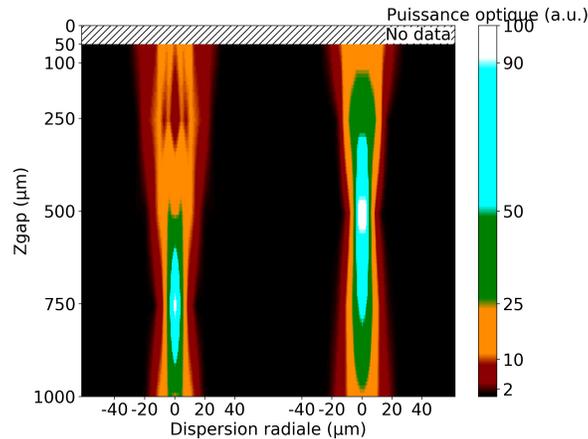


FIGURE 3.15 – Comparaison du faisceau optique entre la fibre nue et la fibre à travers une tête de troisième génération. Puissance optique normalisée mesurée dans l'axe vertical depuis l'extrémité de la fibre nue (faisceau gauche) ou de la tête (faisceau droit). Méthode de caractérisation détaillée dans la partie optique (voir 5.2)

Les têtes d'impression que nous venons de présenter profitent d'un protocole reproductible, simple et peu coûteux. Nous avons démontré les propriétés dimensionnelles à travers la caractérisation du dôme de PDMS et optiques de cette génération. Nous avons pu utiliser ces têtes pour la grande majorité des preuves de concept réalisées dans ces travaux, autour du PEGDA notamment (voir chapitre 5).

Néanmoins, cette génération de têtes n'a pas permis d'imprimer du GelMA du fait de problème d'adhésion du matériau à la couche de PDMS lors de sa polymérisation. Nous avons conçu une quatrième génération qui intègre un concept original de bulle d'air pour empêcher l'adhérence de l'hydrogel à la tête d'impression.

3.5 Génération 4 : Têtes hybrides avec bulle d'air

3.5.1 Contexte : adhésion de biomatériaux

Dans cette partie, nous détaillons les études portées sur l'adhérence du GelMA sur les têtes d'impression de troisième génération. Certains éléments de ce paragraphe sont développés dans la partie sur la description des hydrogels (voir partie 5.2.1).

3.5.1.1 Adhérence du GelMA au contact du PDMS

Le PEGDA est un polymère synthétique reconnu pour ses propriétés de faible adhésion. Dans notre concept, la photo-polymérisation du PEGDA s'effectue au contact du PDMS de la tête, mais du fait de la faible affinité entre le PEGDA et le PDMS nous n'avons pas observé de problématique d'adhérence

de l'hydrogel (voir partie 5.2.5.2).

Le GelMA, lui, est obtenu par fonctionnalisation de la gélatine, constituée d'une séquence de peptides. Ces groupements sont sujets à de nombreuses interactions avec des matériaux hydrophiles et hydrophobes. Notre hypothèse de départ consistait à considérer la solubilité de l'oxygène au sein du PDMS, procurant ainsi un effet d'inhibition au contact de ce dernier. Bien que d'autres équipes ont montré qu'il était possible de mouler ou d'imprimer en 3D du GelMA sur du PDMS,^{237,238} nos expériences ont montré que cet effet n'était pas suffisant pour prévenir l'adhérence du GelMA durant la photopolymérisation.

Les premiers essais de d'impression du GelMA ont été réalisés sur la base des protocoles mis au point pour le PEGDA en adaptant la température de l'enceinte à 37°C. Les essais de doses réalisés ont montré une adhésion du matériau dès que le seuil de polymérisation est atteint. Les mesures d'absorbance du GelMA montrent que l'absorbance est trop faible pour considérer un phénomène de polymérisation frontale qui pourrait limiter l'adhérence du matériaux polymériser au substrat (voir partie 5.5). Ces résultats suggèrent que le processus d'inhibition n'est pas opérationnel dans notre configuration et que les bons résultats obtenus dans le cas du PEGDA sont dus aux faibles interactions de ce matériau vis à vis du PDMS.

3.5.1.2 Remplacement de la couche de PDMS

Pour résoudre ce problème d'adhérence du GelMA sur le PDMS, nous avons intégré différents types de matériaux ou de traitements de surface connus pour leurs capacités anti-adhésives et de passivation. Nous avons fixé ces matériaux avec de la colle à l'emplacement des lamelles de verre de la troisième génération.

- Films de matériaux transparents
 - Film de Fluorinated Ethylene Propylene (FEP) (voir Fig. 3.16)
 - Film de PerFluoroAlkoxy (PFA ou nFep)
- Dôme de PDMS fonctionnalisé
 - Couche de PDMS activé au plasma O₂
 - Couche de PDMS imprégné d'huile minérale
 - Couche de PDMS imprégné d'huile silicone
 - Couche de PDMS + Traitement de surface d'Octadecyltrichlorosilane (OTS)
 - Couche de PDMS + Traitement de surface de Obine serum albumin (BSA)
 - Couche de PDMS + Traitement de surface de Pluronic F127
 - Couche de polyHEMA
- Lamelle de verre fonctionnalisée
 - Verre + Traitement de surface parylène
 - Verre + Traitement de surface Perfluorodecyltrichlorosilane (FDTS) (voir Fig. 3.16)
 - Verre + couche de PEGDA sur-polymérisée (voir Fig. 3.16)

Malheureusement, aucun des matériaux listés n'a permis de réduire significativement l'adhérence du GelMA durant la photo-polymérisation. Dans la littérature, nous avons trouvé peu d'exemples de photo-polymérisation de GelMA avec un laser. Une publication de Kunwar *et al.*¹⁶⁷ réalise l'impression 3D de GelMA sur un film de Teflon AF 2400 connu pour sa porosité à l'oxygène et donc propice à des effets d'inhibition de surface. Nous n'avons pas eu le temps de tester ce matériau dû à des délais d'approvisionnement de plusieurs mois, mais gardons cette possibilité en perspective.

3.5.2 Description du concept de photopolymérisation au contact d'une bulle d'air : Air-Assisted Printing

3.5.2.1 Inspiration de concepts avec interfaces résine-air ou résine-huile évitant tout problème d'adhérence

Suite aux échecs répétés dus à l'adhésion du GelMA sur les têtes d'impression, quel que soit le matériau à la surface, nous avons considéré non plus une interface liquide - solide, mais une interface

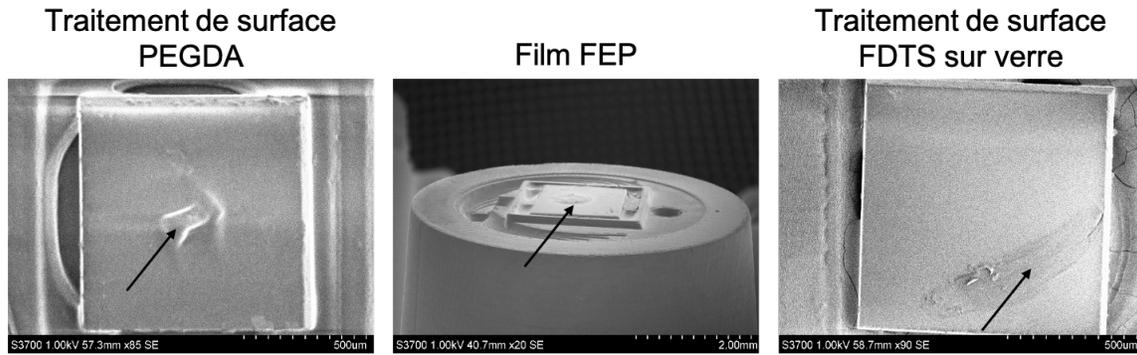


FIGURE 3.16 – Images MEB de têtes d'impression usagées avec GelMA accroché au niveau de la zone de photo-polymérisation. Vue proche de la lamelle de verre fonctionnalisée pour la première et troisième images, vue éloignée tiltée pour la seconde. GelMA désigné par une flèche. Le GelMA est déformé, car séché sous vide pour le MEB.

liquide - gaz.

Historiquement, les premières versions de stéréolithographie fonctionnaient à l'interface air - liquide d'un réservoir contenant le prépolymère d'impression, comme nous pouvons le voir sur la première figure issue du brevet sur la stéréolithographie de C. Hull de 1986¹⁵⁵ (voir Fig. 3.17.A). La plateforme substrat étant immergée, la polymérisation était réalisée dans la fine couche de polymère située au-dessus du porte échantillon. Après la polymérisation de la première couche, la plateforme s'enfonce dans le bain de polymère pour qu'une nouvelle couche recouvre la première.

Dans cette configuration la surface supérieure de l'objet polymérisé est au contact de l'air ne causant aucun problème d'adhésion. L'inconvénient de ce type de technologie est de devoir plonger totalement l'objet dans un grand bac de résine. Cette stratégie a été abandonnée sur la plupart des systèmes de stéréolithographie actuels au profit d'un plateau plongeant dans un réservoir de matériau transparent. Cette approche permet de réduire la quantité de résine à fournir, mais fait également apparaître de nombreux problèmes d'adhérence avec le fond du bac.

En gardant une approche inversée, Walker *et al.* ont proposé une interface liquide plutôt que gazeuse¹⁶⁹ (Fig. 3.17.B). Deux circulations simultanées ont lieu dans l'habitacle de cette imprimante 3D : le matériau photopolymérisable au contact du porte-substrat et une couche d'huile permettant de prévenir les problèmes d'adhérence. La lumière incidente polymérise le matériau depuis la couche d'huile jusqu'au support. Cette équipe a développé cette technique (*Continuous Liquid Interface Production CLIP*) pour pouvoir imprimer en continu et augmenter la vitesse d'impression. En effet, la nécessité de devoir séparer l'objet polymérisé du fond du bac puis de réapprovisionner une nouvelle couche de matériau avant de pouvoir imprimer la couche suivante disparaît. La plateforme peut remonter en continu puisqu'une couche de matériau non polymérisée est toujours présente au niveau de la zone de polymérisation. Cette équipe a également choisi une interface liquide pour évacuer la chaleur résiduelle due à la photopolymérisation afin de pouvoir encore gagner en vitesse d'impression.

3.5.2.2 Adaptation à notre concept

Sur la base de ces concepts, nous avons opté pour le développement d'une tête intégrant une interface air - liquide. Cette stratégie est rendue possible par l'intégration d'un canal d'approvisionnement d'air au niveau de la zone d'impression. À la différence des deux concepts ci-dessus, nous gardons l'utilisation de la tête d'impression initiale qui contient notre source optique.

Nous conservons également l'ensemble des autres concepts : injection - aspiration de la solution photopolymérisable, structuration de la surface de la tête, polymérisation en flux, etc. En allumant le laser, la lumière traverse la bulle d'air, puis la solution photopolymérisable puis atteint le substrat. Le matériau se solidifie sur toute sa hauteur, de la bulle d'air jusqu'au substrat. Nous résolvons alors le problème d'adhérence sur la surface de la tête en retirant la surface elle-même.

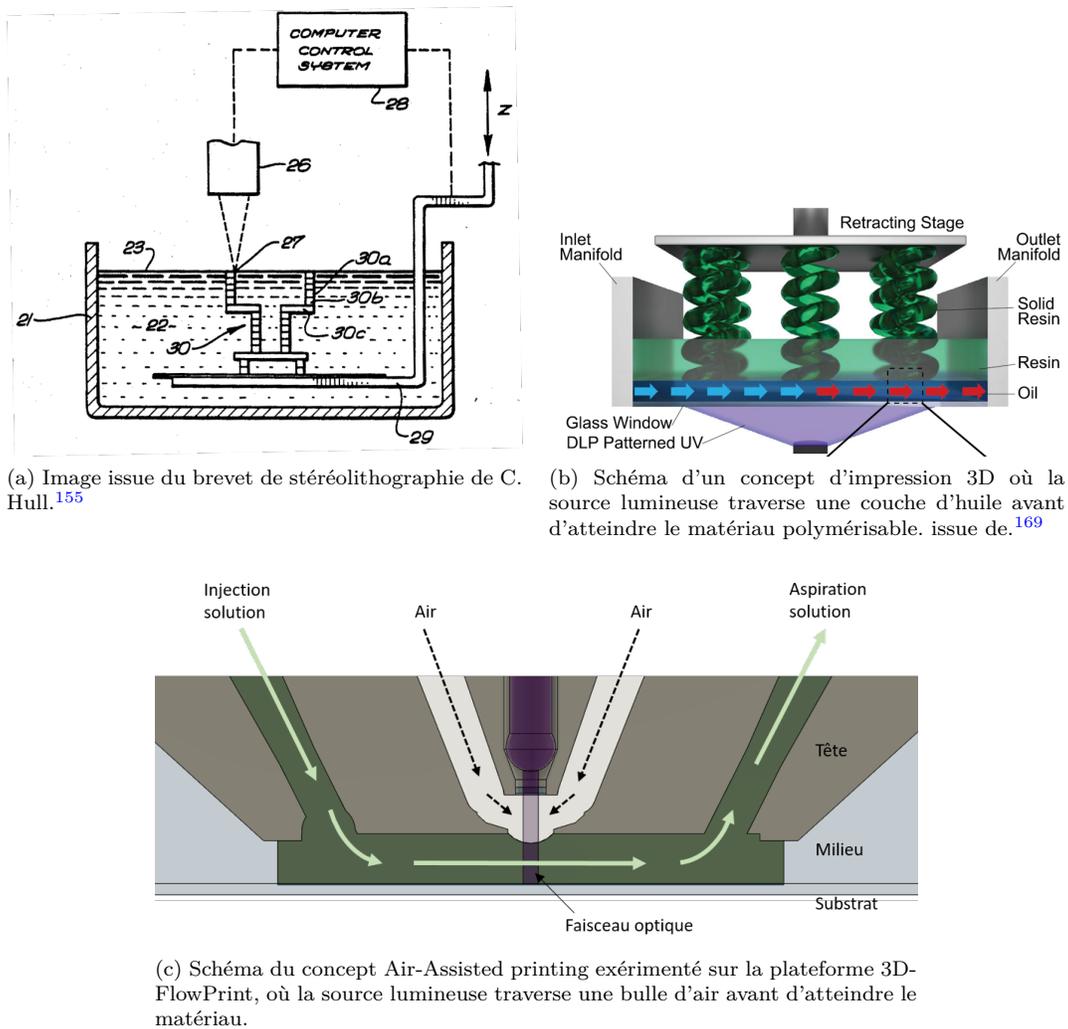


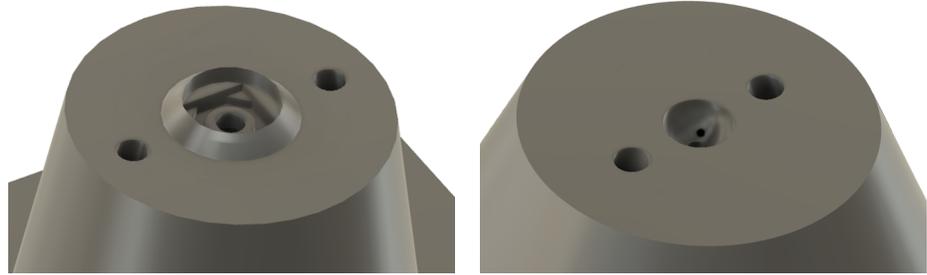
FIGURE 3.17 – Schéma de concepts de stéréolithographie avec interfaces résine-air ou résine-huile évitant tout problème d'adhérence menant au concept d'Air-Assisted Printing.

3.5.3 Optimisation de la géométrie des têtes d'impression par bulle d'air

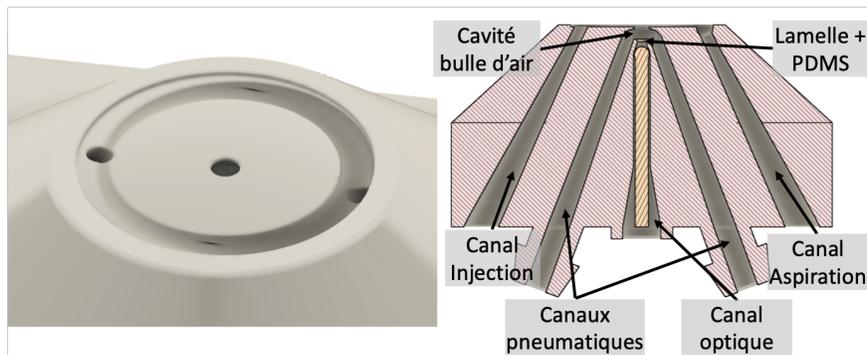
Deux approches ont été étudiées, l'une basée sur un contrôle actif de l'approvisionnement en air des têtes d'impression, l'autre reposant sur une approche passive d'encapsulation d'une bulle d'air à l'extrémité des têtes.

Contrôle passif La figure 3.18.A présente une géométrie avec un contrôle passif dans lequel la fibre optique (canal central) est protégée par une lamelle en verre, dont nous voyons l'encoche. Autour de cette lamelle, une enceinte circulaire permet de stabiliser la bulle d'air. Nous voyons ensuite le canal d'injection et d'aspiration de la solution. Les premières expériences ont rapidement montré un problème de reproductibilité du volume des bulles d'air encapsulées et de stabilité temporelle du volume des bulles. Nous ne détaillons pas la caractérisation des géométries passives ici, car nous avons finalement choisi un contrôle actif de la bulle d'air avec un canal pneumatique depuis l'arrière de la tête.

Contrôle actif avec canal pneumatique Nous avons choisi d'implémenter un canal pneumatique traversant la tête avec un connecteur imprimé en 3D à l'arrière de la tête pour brancher un contrôleur de pression. Nous passons d'abord en revue plusieurs géométries de tête d'impression avant de détailler la caractérisation de la bulle en fonction de la pression. La figure 3.18.B présente une tête d'impression avec une cavité circulaire. Le contrôle pneumatique est transmis *via* le canal optique. Dans ce cas, la



(a) Tête d'impression sans contrôle actif, et avec un emplacement pour une lamelle de verre afin de protéger la fibre
 (b) Tête d'impression avec contrôle actif, avec l'air acheminé *via* le canal optique



(c) Vue 3D et en coupe d'une tête d'impression avec lamelle positionnée à travers l'ouverture supérieure de la cavité pneumatique.

FIGURE 3.18 – Images CAO de différents essais de têtes d'impression pour Air-Assisted Printing.

fibres n'est pas isolée ni de l'air ni du milieu (en cas de perte de la bulle d'air). Nous avons préféré travailler par la suite avec une lamelle de verre pour fermer le canal optique.

La figure 3.18.C présente une tête avec une cavité formée par une enceinte circulaire autour de la zone de polymérisation. Cette enceinte est assez large pour pouvoir placer une lamelle de verre pour fermer le canal optique. Ensuite, nous déposons une goutte de PDMS sur la lamelle, à la manière des têtes permettant d'imprimer le PEGDA. Le PDMS permet de protéger partiellement la lamelle en inhibant la polymérisation du résidu de GelMA qui pourrait se trouver au fond de la cavité.

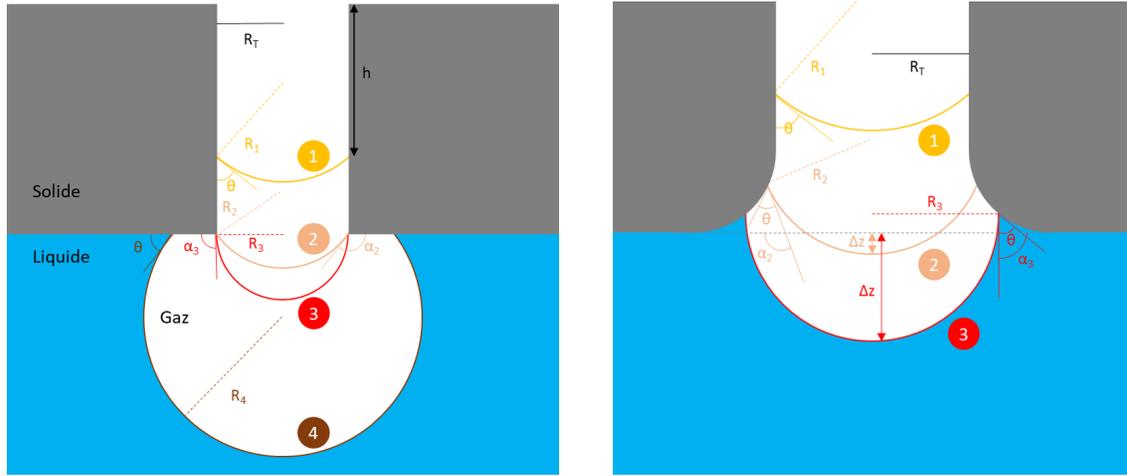
Dans cette enceinte, un canal pneumatique peut réguler la pression de la bulle d'air. L'enceinte doit être assez large pour permettre le placement de la lamelle. Nous avons dessiné une cavité plus large coté arrière de la tête et plus resserrée coté extérieur, afin de stabiliser la bulle d'air par une faible ouverture. Nous avons aussi implémenté deux canaux pneumatiques de part et d'autre du canal optique. Avec un seul canal pneumatique, parfois la bulle d'air se plaçait seulement d'un côté de la cavité et n'était pas symétrique.

3.5.4 Caractérisation des têtes d'impression assistées par bulle d'air

3.5.4.1 Modèle théorique

Dans cette sous-partie, nous allons étudier le cas théorique du maintien d'une bulle d'air sous l'eau. Nous considérons un objet dans lequel un canal cylindrique est creusé de rayon R_T , comme dessiné sur la figure 3.19.A. Un contrôleur de pression régule de l'air *via* le haut du canal (nous considérons zéro perte de pression pneumatique) à la pression P_{bulle} . L'interface air - liquide peut se situer dans le canal (cas 1), à la limite du canal (cas 2 et 3) ou en dehors (cas 4). Dans le canal et en dehors du canal, la forme de l'interface est définie par l'angle de contact θ entre le milieu liquide et la surface de l'objet, par le diamètre du canal R_T et par la pression régulée P_{bulle} . À la limite du tube (cas 2 et 3), l'angle de contact au niveau de la sortie du tube est considéré libre, car le point triple est positionné

sur une surface arrondie au niveau microscopique, comme décrit sur la figure 3.19.B. Dans ce cas, nous définissons un angle macroscopique α .



(a) Schéma en vue macroscopique. L'extrémité du canal est ponctuelle.

(b) Schéma conceptuel en vue microscopique. L'extrémité du canal est arrondie permettant au point triple de prendre un angle libre en gardant θ constant.

FIGURE 3.19 – Schéma d'une bulle d'air dans un tube à l'interface avec une interface solide-liquide-gaz

Dans le canal (cas 1), le rayon de la bulle R_1 est constant et déterminé par l'angle de contact θ entre le milieu liquide et la surface de l'objet (voir eq. 3.1). Il est possible de déterminer la pression de Laplace $P_{Laplace}$ (voir eq. 3.2). Cette pression se rajoute à la pression du liquide P_{eau} et à la pression atmosphérique P_{atm} pour obtenir la pression dans la bulle (voir eq. 3.3).

En fonction de la pression positive appliquée ΔP , la bulle change donc sa profondeur h dans le liquide (voir eq. 3.4 et Fig. 3.20). Il faut augmenter la pression pour que l'interface air - liquide descende. Le calcul ci-dessous prend pour variable : ρ la densité du liquide, g la constante gravitationnelle sur Terre et γ la tension de surface liquide-air.

$$\text{Cas 1 : } R_{bulle} = R_T / \cos(\theta) \quad (3.1)$$

$$P_{Laplace} = \frac{2\gamma}{R_{bulle}} = \frac{2\gamma \cdot \cos(\theta)}{R_T} \quad (3.2)$$

$$P_{bulle} = P_{atm} + P_{eau} + P_{Laplace} \quad (3.3)$$

$$\Delta P = P_{bulle} - P_{atm} = \rho \cdot g \cdot h + \frac{2\gamma \cdot \cos(\theta)}{R_T} \quad (3.4)$$

Lorsque la pression augmente, la bulle atteint la limite inférieure du canal. Au niveau microscopique, la bulle maintient un angle de contact θ constant, mais au niveau macroscopique l'angle α définit sa courbure par rapport au plan inférieur de l'objet (voir Fig. 3.19.B). Les deux situations extrêmes sont à la frontière supérieure de la courbure avec $\alpha = \pi/2 + \theta$ et à la frontière inférieure de la courbure avec $\alpha = \theta$.

Lorsqu' α diminue (cas 2), la bulle voit d'abord son rayon diminuer, ce qui se traduit par une augmentation de sa pression interne. Lors de ce phénomène, la profondeur h de la bulle et ses points d'accroche à l'extrémité du canal sont considérés constants du point de vue macroscopique comme sur la figure 3.19.A. Le rayon de la bulle dépend donc de α (voir eq. 3.5). Nous pouvons de nouveau définir la pression positive appliquée ΔP (voir eq. 3.6).

Au contraire du cas 1, la bulle change donc son angle de contact macroscopique α (et non sa profondeur h qui est ici constante) en fonction de ΔP . Nous pouvons définir le dépassement de la bulle Δz par rapport à la surface inférieure en fonction d' α (voir eq. 3.7) ce qui le relie à ΔP (voir Fig. 3.20). Ce développement est vrai pour $R_{bulle} < R_T$ et $\alpha > 90^\circ$ ce qui correspond au cas 2.

$$\text{Cas 2 : } R_{bulle} = R_T / \sin(\alpha) \quad (3.5)$$

$$\Delta P = \rho \cdot g \cdot h + \frac{2\gamma \cdot \sin(\alpha)}{R_T} \quad (3.6)$$

$$\Delta z = R_T / \tan(\alpha/2) \quad (3.7)$$

Lorsque la pression augmente encore, la bulle atteint le cas particulier 3 où son rayon est minimal avec $R_{bulle} = R_T$ et $\alpha = 90^\circ$. Au-delà de ce cas, le phénomène en cours est identique pour le cas 4 (la bulle est sur la surface inférieure) et pour l'espace transitoire entre le cas 3 et 4 (la bulle est à l'extrémité du canal et $\alpha < 90^\circ$). Dans ces cas, $R_{bulle} > R_T$ et le centre de la bulle a dépassé la surface inférieure de l'objet. La pression due à la pression de Laplace de la bulle $P_{Laplace}$ pousse la bulle à s'étendre. Or, une bulle plus grande implique une $P_{Laplace}$ plus faible (voir eq. 3.2), et donc une pression P_{bulle} plus faible aussi. Lorsque la bulle s'expand, le contrôleur de pression injecte de l'air afin de remonter la pression, ce qui pousse la bulle à s'étendre de nouveau par un phénomène cyclique continu. Cette situation est donc instable. La pression positive appliquée par le contrôleur de pression ne permet pas de maintenir la bulle en résistant à $P_{tension}$ comme dans le cas 1 et 2, mais au contraire déstabilise le système. Cette démonstration prouve que les bulles au-delà du cas 3 sont instables et créent un flux d'air depuis le canal vers le liquide. Afin de pouvoir stabiliser une bulle d'air à l'extrémité du canal, il faut donc rester dans le cas 2.

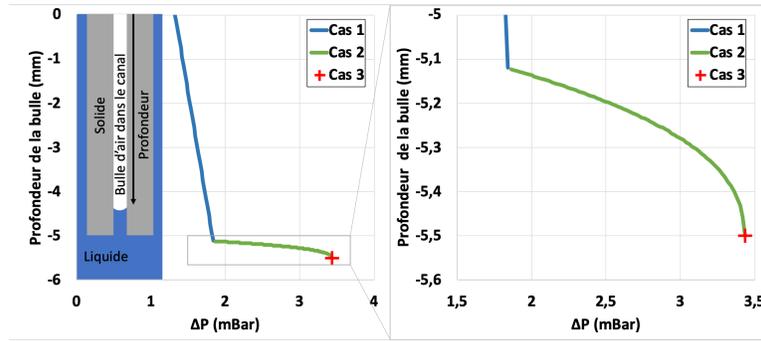


FIGURE 3.20 – Graphique de la hauteur théorique d'une bulle d'air sous pression dans un canal immergé. Bulle présente dans le canal (cas 1) puis à son extrémité (cas 2), comme décrit sur la figure 3.19. L'extrémité de la courbe correspond au cas limite 3. Canal large de 1 mm ($R_T = 0.5mm$) et immergé jusqu'à 5 mm de profondeur dans de l'eau déionisée. $\rho = 1000kg/m^3$, $g = 10m/s^2$, $\gamma_{air-eau} = 0.073N/m$, $\theta = 63^\circ$ (mesure de l'angle de contact d'eau déionisée sur de la DL260)

Le graphique 3.20 propose une représentation graphique de la profondeur de la bulle dans un canal, dans le cas 1, 2 et 3. Nous avons considéré un canal large de 1 mm ($R_T = 0.5mm$) en DL260 et immergé jusqu'à 5 mm de profondeur dans de l'eau déionisée. Nous avons utilisé $\rho = 1000kg/m^3$, $g = 10m/s^2$, $\gamma_{air-eau} = 0.073N/m$, $\theta = 63^\circ$ (mesure de l'angle de contact d'eau déionisée sur de la DL260). La bulle progresse dans le canal à partir de $\Delta P = 1,34$ mBar, puis atteint l'extrémité du canal à $\Delta P = 1,88$ mBar. Ensuite, la pression régulée fait diminuer le diamètre de la bulle d'air jusqu'à $R_{bulle} = R_T$ avec $\Delta P = 3,43$ mBar à une profondeur de $5mm + R_T$, ce qui correspond au cas limite 3. Pour une pression plus élevée, la bulle est instable et un flux d'air est créé par le contrôleur de pression. En perspective, nous souhaitons considérer l'influence d'un traitement de surface hydrophobe ou d'une section conique du canal sur les paramètres de la bulle d'air.

Avec un contrôleur de pression MFCS-EZ de plage 0 - 25 mBar, nous avons un contrôle précis à 0.1 mbar. Le cas d'école se transforme en une bulle reliée d'un côté à un réservoir d'air, et de l'autre en interface avec du milieu ou de la solution photo-polymérisable.

3.5.4.2 Mesures expérimentales

Caractérisation de la bulle d'air au microscope à épifluorescence en fonction de la pression

En utilisant des solutions chargées en nanoparticules et en observant au microscope inversé de la

plateforme en fluorescence, nous pouvons voir la solution dans l'espace entre la tête et le substrat. En focalisant à différentes distances sur les nanoparticules, nous pouvons déterminer la présence de solution ou de la bulle d'air à différentes hauteurs. En fixant une distance focale puis en bougeant la tête en Z, nous avons une cartographie de la bulle d'air. Nous pouvons même prendre des photos en plusieurs points et reconstruire la forme de la bulle à la manière d'une image confocale.

Pour imager le concept d'Air-Assisted Printing, la figure 3.21 montre la forme d'une bulle d'air sous la tête d'impression en fonction de la pression active. Nous pouvons observer qu'en dessous de 0.6 mBar, la bulle d'air ne dépasse pas de la cavité. Au contraire, à 2.2 mBar, la bulle d'air n'est pas stable et un flux d'air est éjecté *via* un train de bulles successives. Entre ces deux valeurs externes, la pression fait progressivement sortir la bulle d'air en diminuant son diamètre. A 2 mBar, le diamètre de la bulle est celui de l'ouverture externe de la cavité.

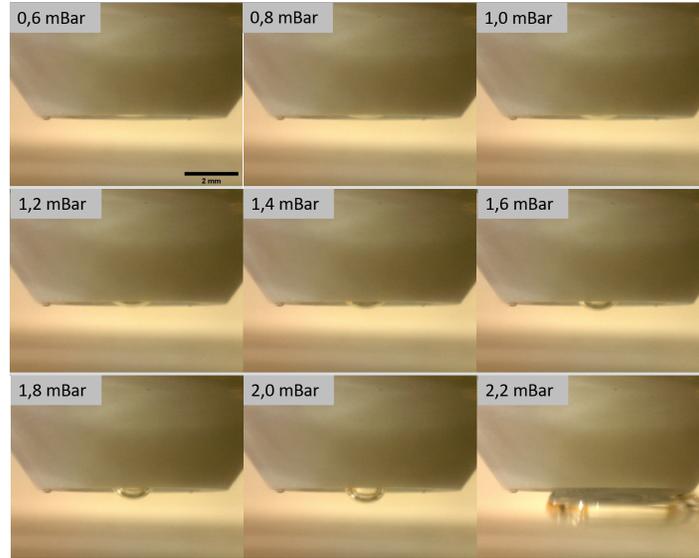


FIGURE 3.21 – Images de la tête d'impression de côté avec la bulle d'air dépassant en fonction de la pression. Prise de vue légèrement par le dessous afin de pouvoir mieux observer la bulle d'air à la sortie de la cavité. Diamètre de l'ouverture de la cavité de 1.5 mm

Caractérisation de la bulle d'air en fonction de la largeur des cavités et du traitement de surface du matériau Dans le but de boucher le canal optique, situer au fond de la cavité, nous fermons le canal avec une lamelle de verre comme pour la génération trois de tête. La lamelle est déposée à travers l'ouverture supérieure de la cavité, qui doit être assez large pour la laisser passer.

Nous avons créé trois versions avec des diamètres d'ouverture des cavités variables pour pouvoir placer trois lamelles de tailles différentes, détaillées dans le tableau A de la figure 3.22.A. Deux versions de chaque tête sont caractérisées : avec et sans FDTS. Le Perfluorodecyltrichlorosilane (FDTS) est une molécule hydrophobe que nous avons déposée par voie gazeuse sur les têtes d'impression. Ces têtes ont des cavités en formes de cône qui permettent une meilleure stabilité de la goutte 3.22.B.

Nous pouvons voir que les ouvertures larges ont besoin de moins de pression pour faire grossir la bulle. En effet, d'après la formule 3.2, plus la taille des bulles augmente et moins elles requièrent de pression. Cela conduit à des instabilités accrues. C'est pour cette raison que nous avons essayé de réduire l'ouverture des cavités, comme détaillé dans la partie sur l'évolution des têtes d'Air-Assisted Printing.

De façon assez intuitive, une faible ouverture bloque la bulle d'air dans la cavité. Cela force la bulle à adopter un faible rayon à l'interface air-eau ce qui demande une haute pression. Ceci est plus facile à réguler que les bulles à large rayon dans lesquelles la pression est plus faible.

D'un autre côté, une faible ouverture de cavité induit seulement de petits dépassements de la bulle, au maximum jusqu'à 200 μm (courbe rouge pointillée de la figure 3.22). Nous pouvons même considérer que les derniers points de chaque courbe ne sont pas assez stables et donc la hauteur disponible de dépassement diminue encore. Dans la partie 4.11, nous avons vu qu'il fallait que le dôme de PDMS,

ou la bulle d'air ici, devait dépasser de 150 μm . Dans le cas d'une petite tête traitée au FDTS, cela correspondrait à 2.6 mBar de commande.

Le FDTS a tendance à chasser l'eau et donc à favoriser le contact avec l'air. Ici, il fait augmenter la taille de la bulle d'air par rapport à une tête sans ce traitement. Le phénomène est très visible pour les têtes avec le diamètre externe de cavité le plus faible (810 μm), mais devient moins marqué avec de plus grandes ouvertures (1510 et 2220 μm). Le traitement FDTS ne fait pas varier la pente, ou de façon faible.

En conclusion, nous préférons une tête avec une faible ouverture pour pouvoir faire varier la pression avec plus de marge. le FDTS ne semble pas utile à rajouter donc nous ne faisons plus ce traitement de surface à partir d'ici.

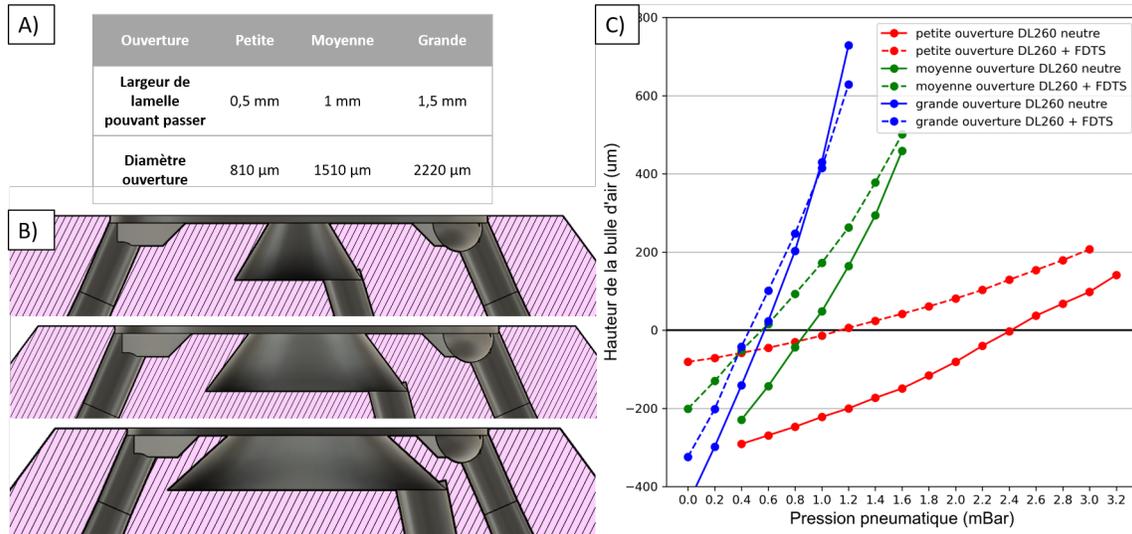


FIGURE 3.22 – Caractérisation de la bulle d'air en fonction de la taille de l'ouverture et du traitement de surface de la tête. A) Tableau décrivant la taille de l'ouverture de la cavité pour les trois têtes de test et la taille de lamelle que l'on peut passer à travers. B) Image CAO en coupe des trois têtes. Il n'est pas prévu de monter de lamelle ou de fibre optique, donc il n'y a pas de canal optique. C) Graphique de la hauteur des bulles d'air par rapport à la surface de la cavité, en fonction de la pression de commande, de la tête concernée et du traitement de surface. Une valeur négative de hauteur veut dire que nous pouvons observer la bulle en microscope inversé, mais qu'elle ne dépasse pas de la cavité.

3.5.5 Caractérisation du spot optique

La figure 3.23 présente le faisceau à travers une tête de quatrième génération. Ce faisceau a été mesuré dès l'extrémité de la tête, et non pas au travers d'une interface air - liquide. Avec un seuil à 25%, le diamètre apparent du faisceau varie peu sur les 1000 μm de la mesure en Z. Nous pouvons mesurer un diamètre apparent de faisceau de l'ordre de 20 μm (FWHM à 50 μm de distance), qui nous semble compatible avec l'impression de GelMA. Le GelMA est un gel plus poreux que le PEGDA et plus mou, nous anticipons une résolution intrinsèque plus faible que le PEGDA.

Conclusion et perspectives sur les têtes d'impression

Dans cette partie, nous avons décrit le problème d'adhérence du GelMA sur la membrane en PDMS de nos têtes classiques. Malgré les essais de nombreuses autres surfaces, le problème persistait. Nous avons décidé de contrer le problème à la source en supprimant totalement la surface en la remplaçant par de l'air. Ce choix nous a demandé de développer une nouvelle gamme de têtes avec des stratégies différentes d'assemblage. Nous avons finalement pu caractériser la bulle d'air. La version définitive profite d'une méthode d'assemblage plutôt simple et d'une marge de manœuvre pour stabiliser la bulle d'air (autour de 2 - 3 mBar). Nous avons testé de garder la bulle d'air pendant plusieurs jours sans

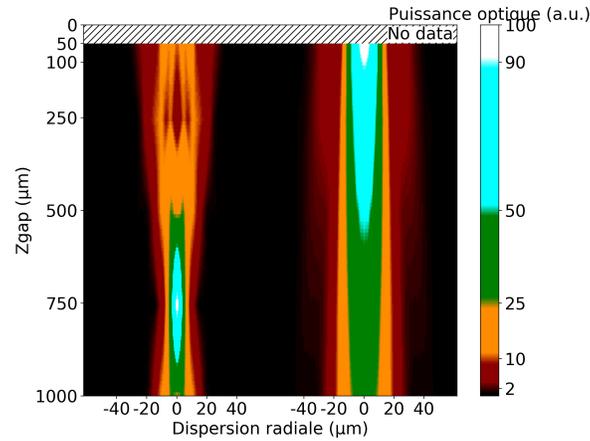


FIGURE 3.23 – Comparaison du faisceau optique entre la fibre nue et la fibre à travers une tête de quatrième génération. Puissance optique normalisée mesurée dans l’axe vertical depuis l’extrémité de la fibre nue (faisceau gauche) ou de la tête (faisceau droit). Méthode de caractérisation détaillée dans la partie optique (voir 5.2)

altération visible. Finalement, nous avons réussi à imprimer du GelMA comme présenté dans la partie sur la polymérisation en flux 5.6.1.

Ce chapitre nous a permis de nous plonger dans la technologie à travers la pièce la plus sensible de la plateforme : la tête d’impression. Nous nous sommes d’abord focalisés sur l’historique du développement de ces têtes pour comprendre l’optimisation qui a été nécessaire pour arriver à la quatrième génération des têtes actuelles. Les têtes ont d’abord été usinées et moulées en PDMS. Cette première génération a pu fournir les preuves de concept de la plateforme et des têtes d’impression opto-fluidiques. La seconde génération a apporté des éléments clés sur les capacités de l’impression 3D pour la création des têtes d’impression. Cette seconde génération n’a pas permis de répondre favorablement aux exigences optiques. La troisième génération est donc hybride entre un corps imprimé en 3D et une partie assemblée. Ces têtes ont pu être utilisées en routine pour imprimer du PEGDA. Cependant, pour imprimer du GelMA, nous avons développé une nouvelle génération qui arbore une bulle d’air. Cette quatrième génération a été caractérisée et a permis d’imprimer du GelMA. Le protocole de création des têtes des troisièmes et quatrièmes générations est décrit en détail.

Les générations trois et quatre nous permettent d’imprimer des hydrogels photoréticulables. Cependant, nous pouvons imaginer des têtes entièrement en verre, sans besoin d’assemblage. Cette option n’a pas été testée, car la machine était encore en calibration au moment de la rédaction du manuscrit. Nous utiliserions la machine *laser nanofactory* de *Femtika*.²³⁹ La technologie *Selective Laser Etching* est basée sur une altération de la forme cristalline du SiO_2 par un laser femtoseconde. Par un développement par gravure chimique, les parties altérées sont soustraites à la pièce de départ afin d’obtenir la géométrie 3D souhaitée. Une rugosité de surface inférieure à 200 nm est attendue, ce qui validerait les exigences sur l’état de surface. Jonusauskas *et al.* ont utilisé ce processus pour créer des pièces 3D en verre.¹⁶⁶ L’intégration d’une couche de PDMS sur la tête en verre ou un traitement de surface type FDTD seraient envisageables afin d’empêcher l’adhérence de l’hydrogel à photopolymériser. Nous pourrions donc profiter d’un protocole de fabrication de tête robuste, dont la géométrie est totalement sculptée dans du verre, avec une interface optique fonctionnelle. Tout cela en une seule étape de fabrication. Les inconvénients étant le coût, la complexité du processus et la difficulté pour d’autres équipes de reproduire notre travail sans accès à de telles machines.

En perspective des têtes d’impression actuelles, nous voudrions implémenter des fonctions micro-fluidiques supplémentaires dans les têtes. Par exemple, nous souhaitons implémenter des jonctions entre deux (ou plus) solutions. Par exemple, un mélangeur entre une solution de PEGDA et de GelMA nous permettrait de jouer sur les aspects mécaniques des matériaux imprimés.

Ajouter des réservoirs internes dans les têtes permettrait de réduire les volumes morts. Cela permettrait aussi de réduire la contrainte sur des cellules en suspension dans une solution en diminuant leur temps de résidence dans les canaux.

En conclusion de ce chapitre, nous avons démontré notre capacité de création et de caractérisation de têtes opto-fluidiques. Les chapitres suivant s'intéresseront à la caractérisation des paramètres d'impression, au niveau fluide d'abord dans le chapitre qui suit puis au niveau optique et photopolymérisation dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Contrôle et caractérisation microfluidique

4.1	Développement d'un modèle hydrodynamique numérique	84
4.1.1	Contexte et motivations	84
4.1.2	Description du modèle numérique	84
4.1.3	Analyse qualitative et validation du modèle numérique	89
4.1.4	Analyse quantitative par graphique et variables extraites	90
4.1.5	Étude comparative des résultats expérimentaux et de la modélisation numérique	94
4.2	Optimisation de l'architecture des têtes d'impression	95
4.2.1	Structuration de la surface de la tête pour modification de la résistance microfluidique locale	95
4.2.2	Description de l'architecture des têtes d'impression	95
4.2.3	Étude quantitative des paramètres géométriques de la tête d'impression sur les écoulements	97
4.3	Influence de la viscosité de la solution injectée	99
4.3.1	Illustration dans le cas d'une géométrie simplifiée	100
4.3.2	Étude quantitative dans une géométrie complète	100
4.4	Influence des paramètres d'impression	101
4.4.1	Influence de la hauteur de la tête	102
4.4.2	Influence de la direction et de la vitesse de la tête d'impression	104
4.4.3	Influence du rapport entre débit d'injection et d'aspiration R_ϕ	105
4.5	Étude des concentrations et des temps caractéristiques de renouvellement de matériaux dans la zone de polymérisation	106
4.5.1	Influence de la vitesse du fluide sur la concentration des matériaux	106
4.5.2	Temps caractéristiques de renouvellement de matériaux	107

Ce chapitre a pour but de détailler les méthodes mises en place pour la caractérisation hydrodynamique et la validation des concepts microfluidiques associés à la technologie 3D-FlowPrint. Dans un premier temps, nous présenterons le schéma microfluidique global et les différentes études de modélisation effectuées. Ensuite, nous présenterons une caractérisation expérimentale du comportement

microfluidique des dispositifs et nous analyserons les paramètres hydrodynamiques principaux en jeu lors de l'impression.

4.1 Développement d'un modèle hydrodynamique numérique

Dans cette partie, nous développons notre méthode pour étudier le système hydrodynamique par le biais de simulations. Nous argumentons en premier le choix de la méthode par simulations numériques, puis nous détaillons ce modèle, avant de le décrire par des analyses qualitatives ou quantitatives.

4.1.1 Contexte et motivations

Les méthodes de simulations numériques sont très largement utilisées pour la validation et la conception de dispositifs microfluidiques. Dans ce projet, nous avons eu recours à la modélisation numérique afin d'étudier l'impact de l'architecture des têtes d'impression sur les mécanismes d'injection et de collecte de matériaux et ainsi d'optimiser les designs. Ces développements ont pris part en parallèle du développement instrumental des têtes d'impression présenté dans le chapitre précédent. Ces modélisations ont été réalisées en couplant les modules hydrodynamiques et diffusion sous *COMSOL multiphysics*. Nous avons choisi d'y recourir pour optimiser les structures à la surface des têtes d'impression (voir partie 4.2) et pour caractériser les écoulements microfluidiques dans différentes configurations d'impression (voir parties 4.3, 4.4). Les simulations nous ont permis de réduire de façon significative les temps de développement des architectures des têtes d'impression en évitant une étude comparative uniquement basée sur des résultats expérimentaux. Néanmoins, les résultats des modélisations ont ensuite été systématiquement validés expérimentalement, les propriétés rhéologiques des matériaux hydrogels photosensibles étant difficile à intégrer dans le modèle numérique. Il s'agissait de comparer plusieurs formes de tête en observant les capacités d'injection, d'approvisionnement et de confinement du fluide induites par les structures présentes à la surface. À de nombreuses reprises, l'introduction de nouvelles architectures et la modification de la géométrie des têtes d'impression a nécessité le développement de méthodes spécifiques de fabrication. Dans ce contexte l'utilisation de l'outil de simulation est particulièrement avantageuse, car il permet d'anticiper les performances des différentes architectures microfluidiques en s'affranchissant du développement de méthodologies de microfabrications spécifiques, étape souvent chronophage. La conception et la fabrication de dispositifs requièrent un temps de conception (CAO), de fabrication, d'assemblage de caractérisation métrologique puis une caractérisation fonctionnelle. Les simulations microfluidiques nous ont permis d'identifier et d'évaluer l'impact des paramètres principaux afin de comparer plusieurs versions. Cette étude est décrite dans le chapitre sur la fabrication et la géométrie des têtes d'impression (voir partie 4.2).

Les simulations numériques ont aussi servi à caractériser les paramètres d'impression évitant la contamination du milieu et permettant un renouvellement efficace de la solution injectée. Nous avons obtenu des diagrammes de phase décrivant les performances du système en fonction des variables d'impression (vitesse, débit, hauteur, viscosité). Ces diagrammes permettent aux utilisateurs de choisir les paramètres expérimentaux lors d'une impression. Tout l'avantage des simulations se concentre dans le fait qu'une fois le modèle de simulation effectué, chacune de ces simulations était rapide à amorcer, à stocker et à analyser.

Nos résultats expérimentaux ont confirmé la validité de nos modèles numériques qui ont pu être utilisés en routine pour la caractérisation et l'optimisation des processus microfluidiques. Néanmoins, ce modèle est très dépendant de la viscosité de la solution injectée. Nous avons simulé plusieurs situations avec des fluides de 1 à 10 mPa.s (voir partie 4.3) et avons prouvé que ces simulations étaient valables pour étudier notre système. Néanmoins, pour des fluides aux propriétés plus éloignées comme le GelMA avec une viscosité supérieure à 100 mPa.s (voir partie 4.1.2.1), ces simulations pourraient être recalculées.

4.1.2 Description du modèle numérique

Les simulations ont été effectuées sous Comsol (v5.5 Comsol, Multiphysics, Comsol AB, Sweden), logiciel de calculs par éléments finis. les modules *Flux laminaires* et *Transport d'espèces diluées* ont été

sélectionnés. Dans cette partie, nous décrivons les propriétés physiques des fluides, puis les équations des deux modules, puis la modélisation 3D de la géométrie et enfin le modèle d'étude temporel.

4.1.2.1 Définition des propriétés des fluides

Tout d'abord, nous présentons ici les propriétés des matériaux utilisés, à savoir des solutions diluées des hydrogels PEGDA et GelMA.

Hydrogels à base de Polyéthylène Glycol diacrylate PEGDA Le PEGDA 700 est un fluide de densité 1.12 kg/L.²⁴⁰ Lorsqu'il est dilué à 40% dans une solution aqueuse comme dans la majorité de nos expériences, la densité du fluide final est égale à 1.065 kg/L et sa viscosité à 8.5 mPa.s.²⁴¹ Plus de valeurs sont spécifiées dans le tableau 4.1. Sous la tête d'impression, le fluide injecté se déplace à des vitesses entre 0 et 10 mm/s.

Concentration en PEGDA	Densité (kg/L)	Viscosité dynamique (mPa.s)
0	0.98	1
20	1.032	2.8
40	1.065	8.5
60	1.097	27.5
80	1.116	72.0
100	1.122	129.7

TABLE 4.1 – Tableau présentant la viscosité et densité du PEGDA 700 à différentes concentrations dans de l'eau à 20°C. Issu de²⁴¹

Hydrogels à base de Gélatine Méthacrylate GelMA Le GelMA est un hydrogel dont la viscosité, en solution aqueuse, dépend fortement de la température. Il est liquide à 37°C mais beaucoup plus visqueux à 20°C voire gélifié suivant les formulations.²⁴² À 40°C, sa viscosité est égale à 112 mPa.s à C = 10% (mesuré avec un cisaillement = 100 s⁻¹).²⁴³ Plus de valeurs sont spécifiées dans le tableau 4.2. Le GelMA a des propriétés différentes suivant ses origines.²⁴⁴ Nous avons utilisé un GelMA synthétisé en interne par D. Ferri-Angulo basé sur un protocole de la littérature.²⁴⁵ Le GelMA est introduit plus en détail dans la partie 5.2.2.

(mPa.s)	25°C	40°C
10% GelMA	170	112
15% GelMA	230	128

TABLE 4.2 – Tableau présentant la viscosité (en mPa.s) du GelMA à différentes températures et concentrations dans de l'eau. Viscosité mesurée avec un cisaillement = 100 s⁻¹.²⁴³

4.1.2.2 Présentation du module flux laminaires

Dans la simulation numérique, le premier module Comsol *flux laminaires* permet de calculer les pressions et débits des liquides en chaque point. Les simulations fluidiques sont basées sur les équations de Navier-Stokes,²⁴⁶ couplées à l'équation de continuité :

$$\rho \frac{\partial v}{\partial t} + (v \cdot \nabla)v = -\nabla P + \mu \nabla^2 v + F \quad (4.1)$$

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho v) = 0 \quad (4.2)$$

ρ est la densité en kg/L, v est la vitesse du fluide en m/s, P la pression en Pa, μ la viscosité dynamique Pa.s et F les forces extérieures en N/m³, dont la gravité.

Le développement suivant a pour but de justifier l'utilisation du module *flux laminaires* par le biais

du nombre de Reynolds. Pour le faire apparaître, nous commençons par postuler un régime stationnaire, négligeons les forces extérieures (comme la gravité) et considérons que les fluides sont incompressibles pour obtenir l'équation suivante. Nous distinguons les effets visqueux et les forces de convection.

$$\underbrace{\rho(v \cdot \nabla)v}_{\text{forces de convection}} = \underbrace{-\nabla P + \mu \nabla^2 v}_{\text{effets visqueux}} \quad (4.3)$$

Ensuite, nous effectuons un changement de variables afin de faire apparaître le nombre de Reynolds Re et de rendre les variables sans dimension. Nous utilisons pour cela les variables L et V , qui représentent respectivement la longueur et la vitesse caractéristiques du système.

$$Re = \frac{\rho \cdot V \cdot L}{\mu} \quad (4.4)$$

$$\begin{cases} \tilde{x} = \frac{x}{L} \\ \tilde{v} = \frac{v}{V} \\ \tilde{P} = \frac{PL}{\mu \cdot V} \\ \tilde{\nabla} = L\nabla \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} x = L \cdot \tilde{x} \\ v = V \cdot \tilde{v} \\ P = \frac{\tilde{P} \cdot \mu \cdot V}{L} \\ \nabla = \frac{\tilde{\nabla}}{L} \end{cases} \quad (4.5)$$

L'équation devient alors

$$\rho \left((V\tilde{v}) \cdot \left(\frac{\tilde{\nabla}}{L} \right) \right) (V\tilde{v}) = - \left(\frac{\tilde{\nabla}}{L} \right) \left(\tilde{P} \frac{\mu V}{L} \right) + \mu \left(\frac{\tilde{\nabla}^2}{L^2} \right) (V\tilde{v}) \quad (4.6)$$

$$Re (\tilde{v} \cdot \tilde{\nabla}) \tilde{v} = -\tilde{\nabla} \tilde{P} + \tilde{\nabla}^2 \tilde{v} \quad (4.7)$$

Nous voyons que le nombre de Reynolds est défini comme un indicateur entre les forces de diffusion (membre droit de l'équation) et de convection (membre gauche) lors de l'écoulement d'un fluide dans les équations de Navier-Stokes. En considérant les matériaux utilisés dans cette thèse et les valeurs de débit maximum étudiés dans ce travail de thèse, nous avons estimé les valeurs du nombre de Reynolds qui s'échelonnent entre 0,005 pour les conditions les plus favorables (faible viscosité i.e. le milieu, basse vitesse, faible distance) et 5,3 pour les conditions défavorables (haute viscosité pour solution concentré en hydrogel, haute vitesse, grande distance). La section 4.1.2.1 détaille les propriétés des fluides. Le calcul du nombre de Reynolds est donné ci-dessous :

$$\begin{cases} \text{Cas favorable :} \\ \rho = 1 \text{ kg/L} \\ V = 1 \text{ mm/s} \\ h = 50 \text{ } \mu\text{m} \\ \mu = 10 \text{ mPa}\cdot\text{s} \end{cases} \Rightarrow Re = 0,005 \quad (4.8)$$

$$\begin{cases} \text{Cas défavorable :} \\ \rho = 1.065 \text{ kg/L} \\ V = 10 \text{ mm/s} \\ h = 500 \text{ } \mu\text{m} \\ \mu = 1 \text{ mPa}\cdot\text{s} \end{cases} \Rightarrow Re = 5.3 \quad (4.9)$$

Ces résultats confirment que les expériences auront lieu à faible nombre de Reynolds et donc dans l'hypothèse d'écoulements laminaires.^{247, 248} Dans ce cadre d'approximation, nous obtenons finalement

l'équation de Stokes²⁴⁶ qui régit les modules *Flux laminaires*.

$$\tilde{\nabla} \tilde{P} + \tilde{\nabla}^2 \tilde{v} = 0 \quad (4.10)$$

4.1.2.3 Présentation du module transport d'espèces diluées

Le second module permet de représenter le transport d'une espèce injectée dans des conditions de faibles concentrations. Les équations sont celles de Fick.²⁴⁹

$$J = -D\nabla C \quad (4.11)$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \nabla \cdot J = 0 \quad (4.12)$$

J est le flux de molécules, D leur coefficient de diffusion, C la concentration en espèce. Ce module reprend les résultats hydrodynamiques obtenus dans le module *Écoulements en flux Laminaire* et y adjoint le déplacement des espèces concernées par les mécanismes de convection et de diffusion. Le fluide environnant et le fluide injecté sont miscibles, ce qui permet d'utiliser ce second module de façon pertinente.

Le module *Transport d'espèces diluées* est utilisé en injectant une molécule neutre à $C = 1$ mol/L. Lorsque la concentration est égale à 1, cela veut dire que seul le fluide injecté est présent. Dans notre modèle, trois zones sont définissables : la première correspond au milieu pur avec une concentration d'espèce diluée à $C = 0$ mol/L, la deuxième correspond au fluide injecté pur avec une concentration $C = 1$ mol/L, et la troisième zone est entre les deux autres où la diffusion prend place. Cela nous permet donc de modéliser deux fluides miscibles à haute concentration.

Les propriétés du fluide injecté sont modifiées par le biais de la variable c de la concentration. Les deux modules sont calculés en parallèle afin de prendre en compte la modification de la viscosité en fonction de la concentration des solutions considérées et de leur dilution dans le milieu. Nous faisons ici l'hypothèse d'un régime dilué dans lequel la viscosité varie linéairement avec la concentration en espèce visqueuse. Dans le modèle, deux espaces distincts sont présents, d'un côté le fluide avec $C_{\text{polymère}} = 0$ mol/L, et l'autre avec $C_{\text{polymère}} = 1$ mol/L. La zone intermédiaire est relativement négligeable. Nous utilisons les relations suivantes :

$$\mu = \mu_{med} + C \cdot (\mu_{mat} - \mu_{med}) \quad (4.13)$$

$$C_{\text{polymère}} = 0 \text{ mol/l} \Rightarrow \mu = \mu_{med} \quad (4.14)$$

$$C_{\text{polymère}} = 1 \text{ mol/l} \Rightarrow \mu = \mu_{mat} \quad (4.15)$$

Avec μ_{mat} en Pa.s, la viscosité de la solution injectée, μ_{med} en Pa.s la viscosité du médium et C en mol/L la fraction volumique en espèce injectée. Maintenant que les modules sont détaillés, il faut mettre en place un espace dans lequel ils prennent place.

4.1.2.4 Modélisation 3D de la géométrie des têtes d'impression microfluidiques

Les simulations Comsol sont basées sur une géométrie 3D représentant la surface externe de la tête microfluidique. Les figures 4.1.A-B montrent respectivement des vues 3D de la tête d'impression (solide) et de la zone dans laquelle la simulation fluide prend place (liquide).

La tête d'impression, étant un solide, sert de seuil au liquide. La simulation prend part dans la figure B, sous et autour de la tête d'impression. Plus précisément, le logiciel effectue un maillage de l'espace, visible sur les figures C-D. La densité du maillage est adaptée à la géométrie du modèle, plus faible dans la partie environnante, afin de limiter les calculs, et plus élevée proche des structures sur la surface de la tête d'impression afin d'obtenir des données précises sur les écoulements dans la zone confinée. Des simulations ont été réalisées avec différentes tailles de maillage. Une taille de maille trop importante ($> 10 \mu\text{m}$ dans la zone de maillage dense) peut conduire à des problèmes de convergence dans la simulation ou à des imprécisions sur les résultats numériques alors qu'une taille de maille trop

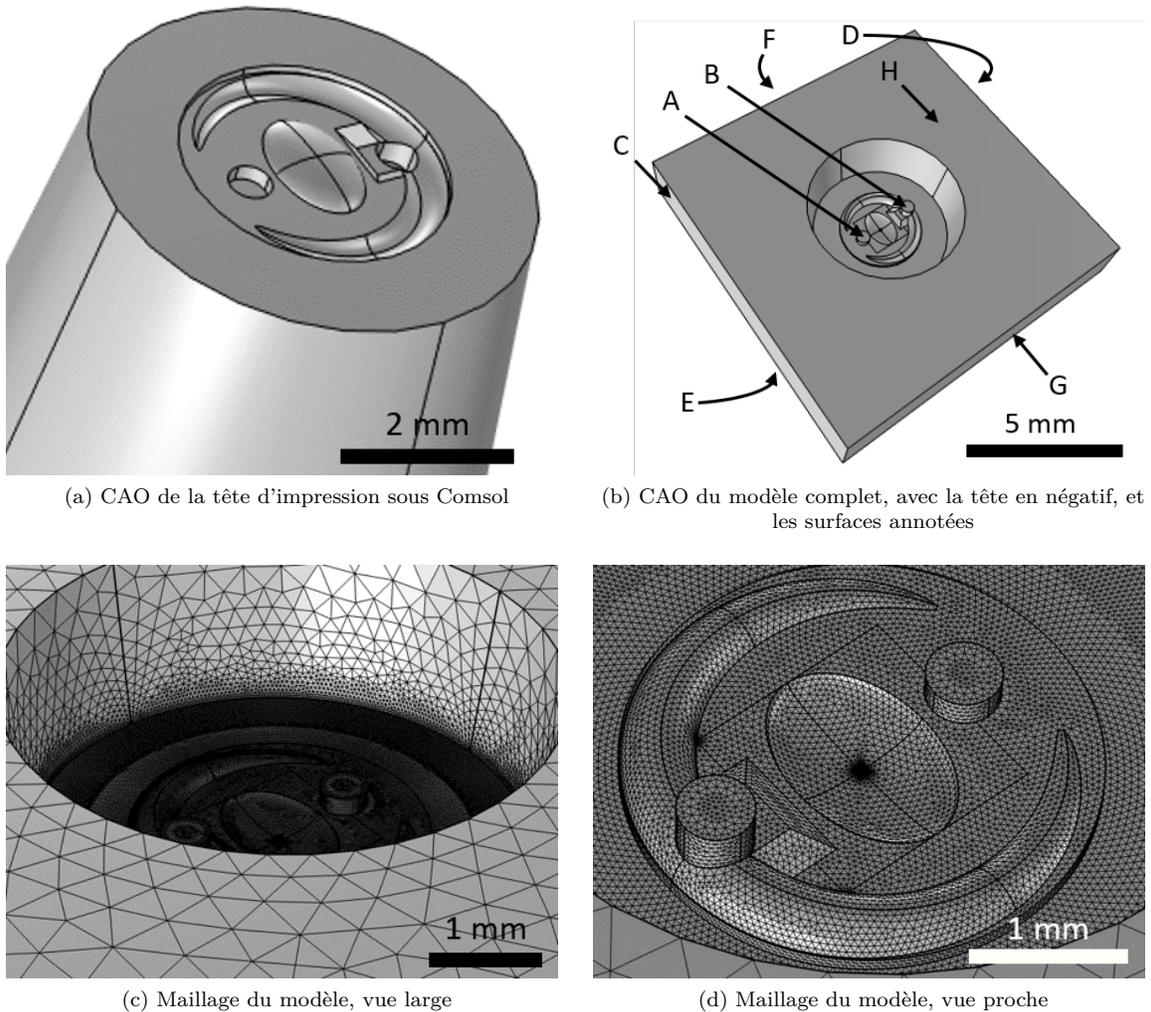


FIGURE 4.1 – Images Comsol de la géométrie du modèle

faible peut aisément conduire ($< 100 \mu\text{m}$ dans la zone de maillage éparse) à des temps de simulations très élevés, de plusieurs dizaines d'heures. Nous avons choisi les valeurs suivantes permettant une description détaillée des écoulements dans la zone confinée tout en limitant les temps de simulations raisonnables, de l'ordre de 3 heures : $10 \mu\text{m}$ dans la zone à haute densité de maillage, $50 \mu\text{m}$ dans la zone intermédiaire et $600 \mu\text{m}$ dans la zone du fluide environnant (pour une distance tête -substrat de $50 \mu\text{m}$).

Dans notre modèle, les conditions hydrodynamiques imposées sont les suivantes :

- Injection : un débit uniforme ϕ_{in} entrant est imposé sur la surface **A** correspondant à la section interne du canal d'injection.
- Aspiration : un débit uniforme sortant ϕ_{out} est imposé sur la surface **B** correspondant à la section interne du canal d'aspiration.
- Déplacement de la tête d'impression : Pour représenter le mouvement de la tête par rapport au substrat lors de l'impression, la surface **C** est contrainte par la vitesse fluide entrante V , la surface **D** par la vitesse fluide sortante V et la surface inférieure **E** par un glissement de valeur V .
- Pour représenter le milieu environnement, les surfaces **F**, **G** et **H** sont définies comme des surfaces ouvertes permettant un transport convectif de fluide.
- Toutes les autres surfaces, sur la tête d'impression ne permettent pas le passage de fluide et répondent à une contrainte de vitesse fluide nulle au contact.

L'injection de matériau est réalisée *via* le module *espèces diluées* qui considère un flux constant d'une espèce à une concentration de 1 mol/L sur la surface A. Les surfaces B, C, D, E, F, G et H sont considérées comme des zones d'échanges pour l'espèce en question permettant un flux convectif et diffusif.

4.1.2.5 Modélisation temporelle des mécanismes de transport

Chaque simulation se décompose en plusieurs séquences. Une première simulation est effectuée afin de trouver les valeurs stationnaires des écoulements à partir du module *Flux laminaire* seul. Dans cette première phase, aucune espèce secondaire n'est injectée, et la viscosité est celle du fluide d'environnement ($\mu = \mu_{med} = 1 \text{ mPa.s}$). Lorsque les paramètres hydrodynamiques ont été déterminés, une deuxième étape de simulation est réalisée en considérant les aspects temporels. Calculer directement la seconde situation est plus complexe pour Comsol que de passer par une première simulation stationnaire. La première simulation permet d'identifier un premier jeu de paramètres hydrodynamiques qui sert de base et facilite la convergence du modèle pour la seconde étape. La seconde simulation se positionne en régime temporel (et non en stationnaire). À $t = 0$, l'ensemble du fluide est celui de l'environnement, aux vitesses calculées dans la première simulation.

Durant cette deuxième étape, la distribution des flux est aussi modifiée par la viscosité de la nouvelle espèce et le couplage des modules *flux laminaires* et *transport d'espèces diluées* permet de déterminer l'évolution spatiale et temporelle des concentrations de l'espèce secondaire sous l'influence des flux convectifs et de la diffusion.

La fenêtre temporelle de simulations est de 50 secondes. Dans les cas de confinement, un régime stationnaire est rapidement atteint dans cette période. Le temps caractéristique de transition entre deux solutions (cas typique d'une impression multimatériaux) est inférieur à 50 secondes. La simulation temporelle fournit des informations sur les caractéristiques de changement de fluide par rapport à une simulation stationnaire.

Au cours de la simulation, l'espèce diluée est injectée au travers de la section **A**. L'aspiration, *via* la section **B**, collecte une fraction de cette espèce. Dans certaines conditions, il est possible de voir une partie de l'espèce se propager dans l'environnement en quittant l'espace confiné sous la tête.

4.1.3 Analyse qualitative et validation du modèle numérique

Une fois que le modèle a convergé vers une solution, l'ensemble des variables permettant de décrire le comportement hydrodynamique (distribution spatiale et temporelle des champs de vitesse et des champs de pression) du fluide a été déterminé par le logiciel. De cet ensemble de paramètres, nous avons extrait les paramètres permettant de décrire quantitativement les écoulements dans la région de la zone d'impression et de déterminer les performances du dispositif. Cette partie propose de décrire les résultats d'une simulation, afin de faciliter la compréhension des parties suivantes. Quand ce n'est pas précisé, les observables sont mesurées à $t_{max} = 50 \text{ s}$.

Pour une première compréhension qualitative, nous avons extrait des images de la simulation complète proposant une cartographie des lignes de flux à proximité de la zone d'impression dans un volume de $20 \cdot 20 \cdot 5 \text{ mm}^3$ (voir Fig. 4.2). Cette simulation a été réalisée avec une distance tête substrat de $50 \text{ }\mu\text{m}$, une vitesse de déplacement de la tête de 0.1 mm/s , un débit entrant de $25 \text{ }\mu\text{l/min}$, un débit sortant de $-125 \text{ }\mu\text{l/min}$, une viscosité du milieu de 1 mPa.s et une viscosité du fluide injecté de 8.5 mPa.s .

Nous pouvons voir apparaître sur ces images des lignes de flux en rouge représentant le mouvement de la tête. Elles sont issues des surfaces **C** et **D** et caractérisent les flux entrant et sortant dans le milieu environnant la zone d'impression. À proximité des surfaces C et D les lignes plus éloignées de la tête ont une trajectoire quasi-linéaire. Celles plus proches du centre contournent la tête d'impression. Du fait de l'aspiration du milieu par la surface **B**, certaines lignes rouges ne traversent pas la simulation d'une surface à l'autre, mais convergent en **B**.

Les lignes de flux de couleur verte apparaissent à l'injection (surface **A**) et de couleur bleue à l'aspiration (surface **B**). Comme l'aspiration collecte le fluide injecté, on peut voir des lignes bleues partant de la surface **A**. Le déplacement de la tête se voit dans la direction $-\vec{x}$, car l'aspiration collecte beaucoup de lignes de flux partant de la surface **C**. Nous pouvons observer que l'aspiration focalise le fluide injecté. Nous voyons aussi que l'aspiration du fluide environnant (lignes de flux bleues) enrobe

le fluide injecté (lignes de flux vertes) et aide à la collecte.

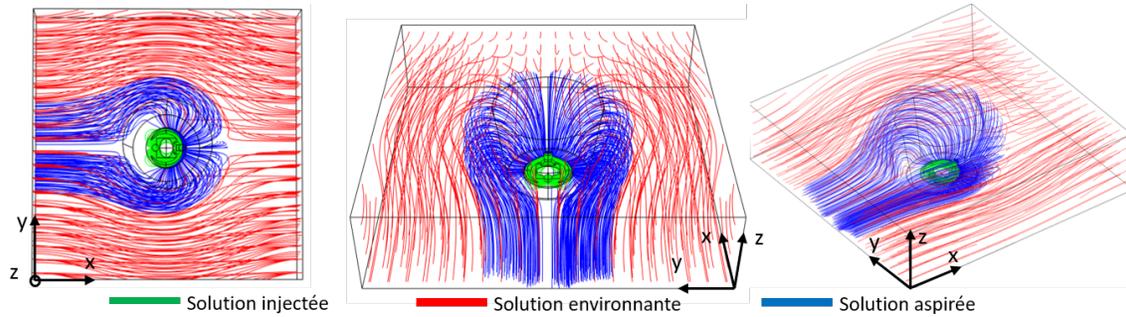


FIGURE 4.2 – Images Comsol en vue large avec lignes de flux

Afin de valider les aspects temporels liés au mécanisme de transport des espèces par diffusion, nous avons extrait la concentration en espèce diluée, sur le plan XY, à mi-hauteur entre la surface et la tête (Fig. 4.3). Ces images sont centrées sur la zone sous la tête. Le milieu environnant (ici de l'eau) apparaît en bleu alors que la concentration de l'espèce injectée est traduite par un gradient de couleur verte. Les lignes de flux bleues et vertes, pour le milieu et la solution injectée, peuvent apparaître (Fig. B). Quand ces images sont seules (Fig. A-B), elles sont à $t_{max} = 50s$. Par séquence (Fig. C), le temps est spécifié.

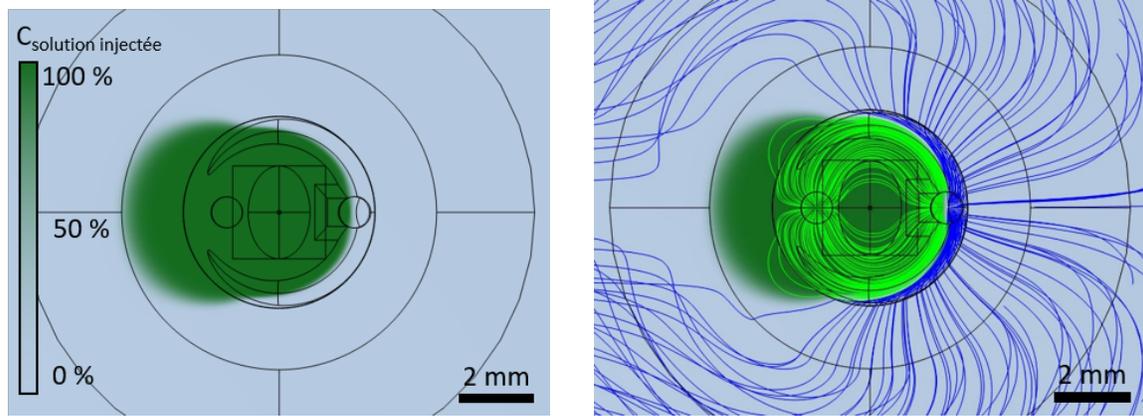
En première conclusion, il est possible de noter que le confinement de la solution injectée est validé. La solution est injectée *via* le canal sur la gauche de l'image, puis il se dirige le long des lignes de flux vertes (voir Fig. 4.3.B) vers le canal d'aspiration sur la droite. Le canal de sortie aspire aussi du liquide environnant, visible par les lignes de flux bleues, qui aide au confinement de la solution injectée en l'enserrant.

Sur la figure 4.3.C, nous pouvons noter qu'après un temps de l'ordre de 5 secondes, la concentration de l'espèce injectée dans la zone entre l'injection et l'aspiration augmente de façon significative. Cependant, ces images sont à mi-hauteur entre la tête et le support, et donc dans la tranche Z où le liquide est le plus rapide. En s'éloignant, l'espèce injectée met plus de temps à prendre possession de cet espace dû aux conditions limites sur le support et la tête d'impression. Nous observons que le régime stationnaire est atteint au bout de 20 secondes environ. Ces temps de stabilisation sont relativement courts et compatibles avec une potentielle impression multimatériaux où la plateforme devra alterner entre plusieurs fluides.

4.1.4 Analyse quantitative par graphique et variables extraites

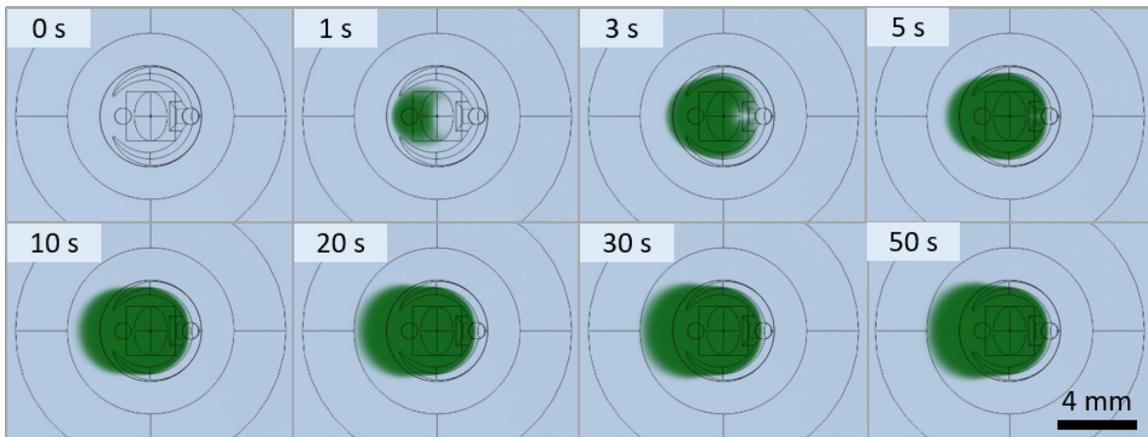
Cartographie de la vitesse des fluides De manière plus quantitative, la modélisation numérique nous permet d'extraire plusieurs paramètres hydrodynamiques, notamment la cartographie de la vitesse des fluides. La Figure 4.4 montre la distribution spatiale des vitesses dans les plans perpendiculaires (XZ) et parallèles (XY) au plan de substrat. Les plans XY sont localisés à mi-hauteur entre la surface et la tête et représentent l'évolution de la norme de la vitesse $|V|$. Les plans XZ sont positionnés à $y = 0 \mu\text{m}$. Le code couleur dans chaque plan permet de visualiser la composante de la vitesse d'écoulement suivant l'axe X (en bleu, les vitesses d'écoulement ayant une composante en x positive, en rouge une composante négative). Les vecteurs permettent de visualiser localement les vitesses et directions d'écoulement dans l'espace, la longueur des vecteurs étant représentatives de la norme de la vitesse.

En plan large, la vitesse du fluide loin de la tête est principalement déterminée par la vitesse de déplacement de la tête relativement au substrat d'impression ($V = 0.1 \text{ mm/s}$ dans la figure 4.4). Dans la zone de confinement située entre la tête et le substrat (distance $Z_{\text{gap}} = 50 \mu\text{m}$), les écoulements sont principalement déterminés par les débits d'injection et d'aspiration et la topologie de la surface de la tête d'impression. Dans la zone centrale notamment, nous apercevons que la présence du dôme de PDMS augmente l'effet de confinement, diminuant la distance entre la tête et la surface et conduisant à des pertes de charge et donc à des vitesses plus faibles dans cette zone, comme nous l'observons sur la figure 4.4.D. Aussi, proche de la tête, son propre déplacement détourne les fluides vers le haut ou vers le bas (zone verte sur la figure 4.4.A).



(a) Confinement de l'espèce injectée en régime stationnaire

(b) Confinement de l'espèce injectée en régime stationnaire avec ligne de flux



(c) Confinement de l'espèce injectée à 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 50 secondes

FIGURE 4.3 – Cartographie de la solution injectée sous la tête d'impression par simulation Comsol. Vue proche dans le plan XY. Espèce injectée en vert et milieu en bleu.

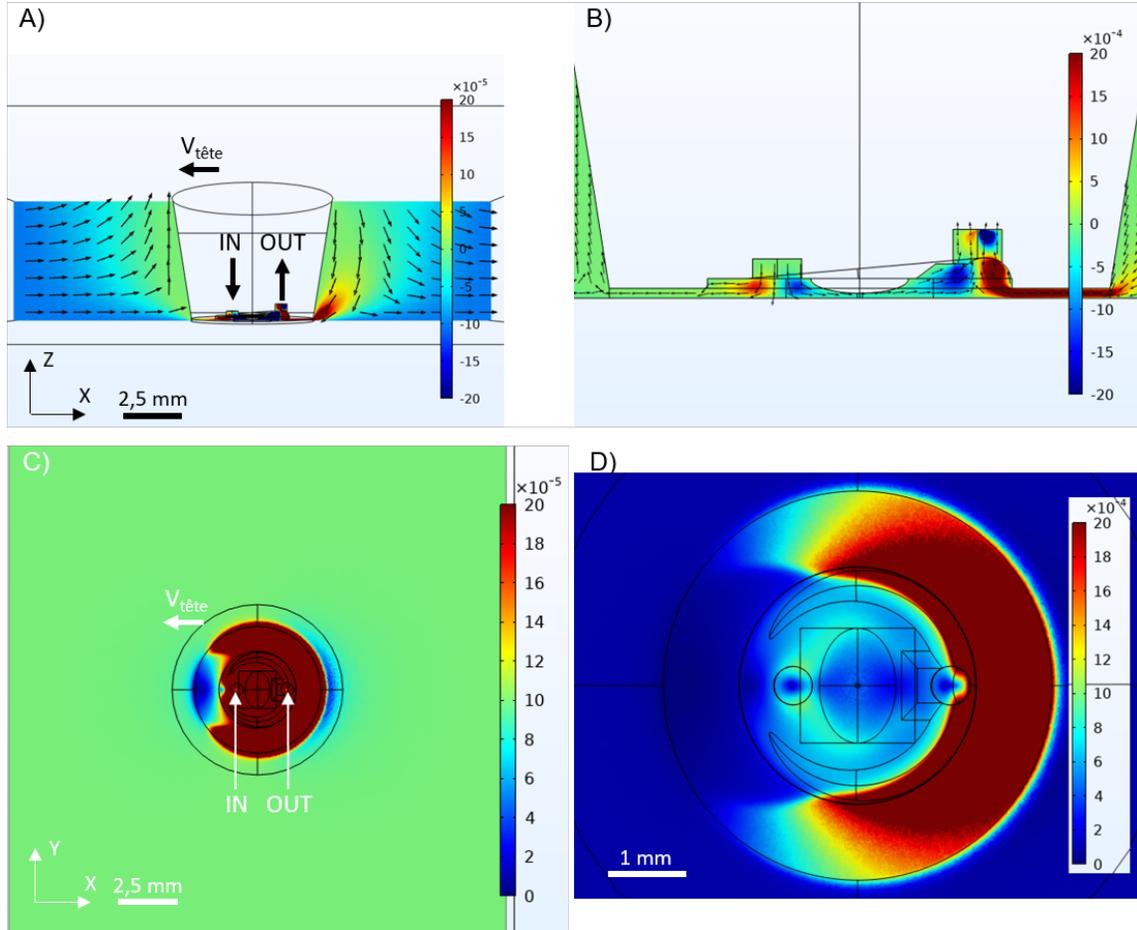
Sur les bases des simulations plusieurs paramètres hydrodynamiques ont pu être extraits et utilisés dans nos analyses comparatives. Il s'agit notamment de la vitesse d'écoulement du fluide au niveau de la zone de polymérisation, notamment de sa composante dans l'axe \vec{x} (Fig. 4.5) qui nous permet d'évaluer le flux et le bilan du transport de masse dans la région d'intérêt. Comme nous pouvons l'anticiper intuitivement, nous observons des courbes montrant un profil proche d'une parabole de Poiseuille montrant néanmoins une asymétrie induite par le mouvement de la tête. Ce type de profil est très similaire des conditions d'écoulement retrouvées dans le cas d'écoulements laminaires entre deux plaques parallèles en mouvement relatif.

Il est important de noter que, dans ces simulations, nous n'avons pas pris en compte la présence de structures précédemment imprimées ou en cours d'impression qui pourraient modifier les conditions d'écoulement dans la zone d'impression. Ce cas de figure sera traité dans la partie 5.4.

Calcul du taux de récupération et de la vitesse d'écoulement dans la zone de polymérisation Nous avons défini plusieurs paramètres afin de pouvoir évaluer les performances des dispositifs dans l'approvisionnement de la zone de polymérisation, dans la capacité de collecte et de ré-aspiration des matériaux injectés non polymérisés.

Le taux de récupération définit la proportion de matériaux injectés qui est collectée par le canal d'aspiration. Ce paramètre nous permet d'apprécier l'efficacité du confinement de la solution injectée dans la zone d'impression et d'anticiper des problèmes éventuels de contamination du milieu environnant la tête d'impression. Le taux de récupération est défini comme le rapport entre le flux de l'espèce

FIGURE 4.4 – Images Comsol de la cartographie des vitesses, mesurées par rapport à la tête. Vitesse de déplacement relative de la tête = 0.1 mm/s. Vitesses V_x pour A-B et $|\vec{V}|$ pour C-D. A) Vitesse du fluide V_x dans le plan XZ, vue large. Échelle = [-0.2 : 0.2] mmm/s. B) Vitesse du fluide V_x dans le plan XZ, vue proche. Échelle = [2 : 2] mmm/s. C) Vitesse du fluide $|\vec{V}|$ dans le plan XY, vue large. Échelle = [0 : 0.2] mmm/s. D) Vitesse du fluide $|\vec{V}|$ dans le plan XY, vue proche. Échelle = [0 : 2] mmm/s.



aspirée en **B** et le flux de l'espèce injectée en **A** (d'après la notation de la figure 4.1), décrit sur l'équation 4.16. Dans le cas d'un confinement parfait, le taux de récupération > 99% comme sur la figure 4.6.B. Au contraire, sur la figure 4.6.A, de la solution injectée contamine la solution environnante et nous pouvons le quantifier avec un taux de récupération = 84%. Nous pouvons aussi tracer cette valeur en fonction du temps afin d'estimer le temps de stabilisation du système.

$$\text{Taux de récupération} = \frac{\phi_{out}^{\text{espèce}}}{\phi_{in}^{\text{espèce}}} \quad (4.16)$$

La vitesse moyenne d'écoulement dans la zone de polymérisation (voir Fig. 4.7) est une autre valeur importante à quantifier, car elle représente la capacité du système à renouveler le fluide polymérisable. La vitesse est la moyenne des vitesses du fluide en chaque point d'un parallélépipède défini au niveau de la zone de polymérisation. Ce parallélépipède mesure 50 μm en largeur et longueur (une largeur de spot typique) et sa hauteur va du substrat à la tête. La moyenne est calculée à partir des vitesses selon l'axe \vec{x} .

Dans cette partie, nous avons détaillé la méthode de simulations numériques et prouvé que nous nous situons dans un régime adapté. Ce modèle numérique nous permet d'extraire à la fois des données

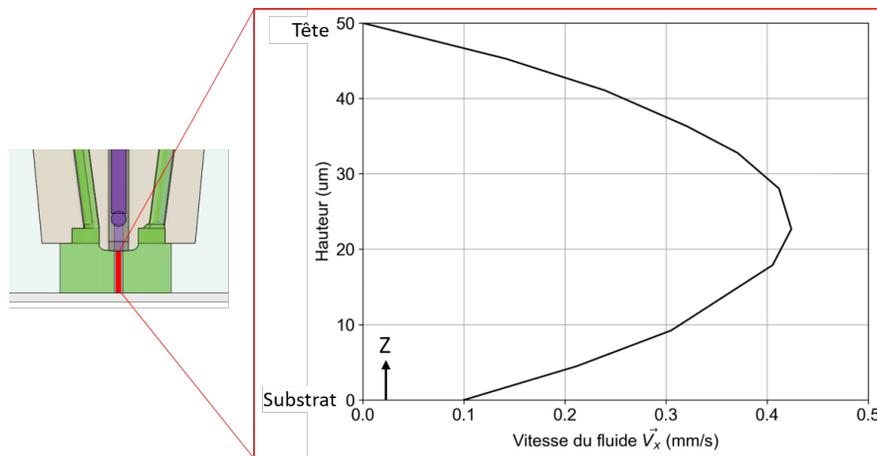


FIGURE 4.5 – Graphique Consol de la vitesse \vec{x} mesurée dans la zone de polymérisation (dans la continuité de la fibre) entre le substrat et la tête

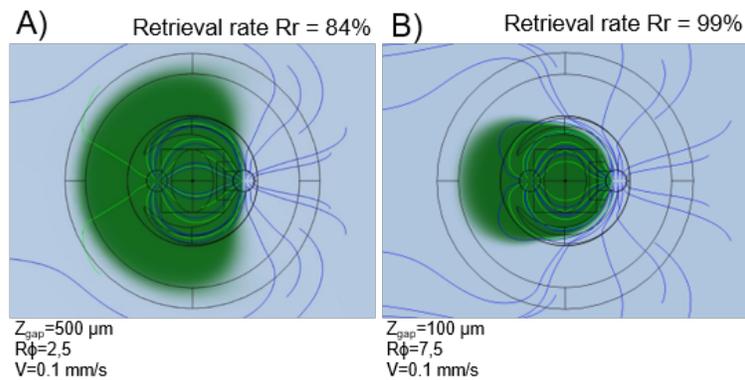


FIGURE 4.6 – Images consol montrant le confinement ou la perte de la solution injectée (en vert) dans le milieu (en bleu) et le taux de récupération associé

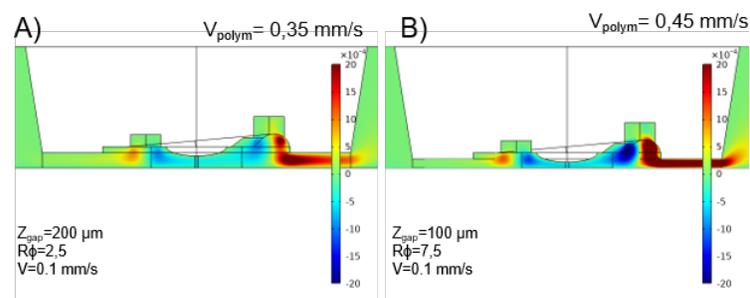


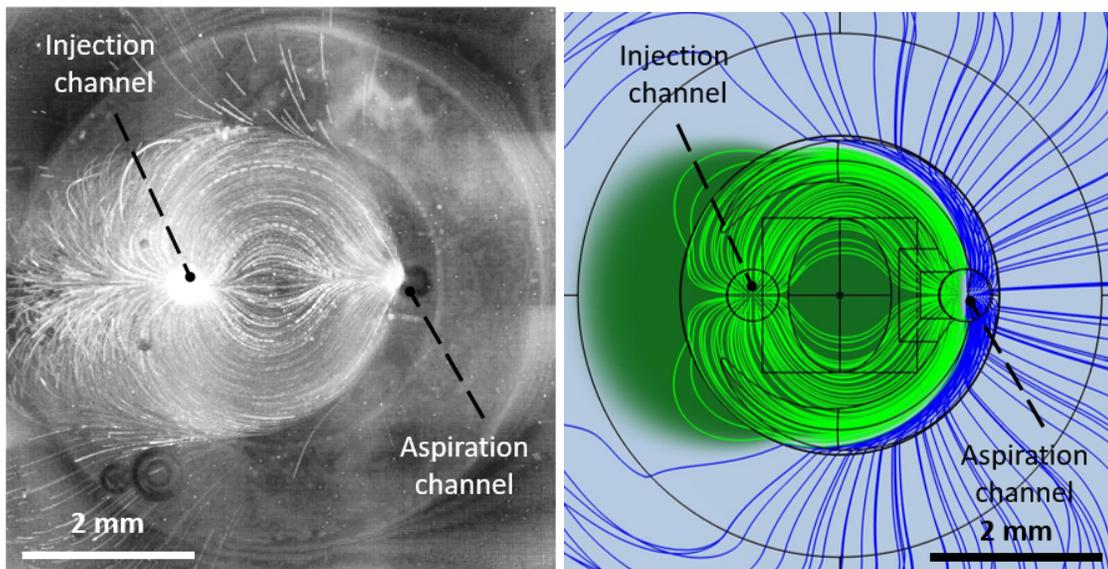
FIGURE 4.7 – Représentation de la distribution spatiale des vitesses du fluide V_x sous la tête et la vitesse dans la zone de polymérisation associée

visuelles pour une analyse qualitative, mais aussi des données numériques pour une comparaison quantitative des situations hydrodynamiques. Dans la partie suivante, nous démontrons que ces simulations sont cohérentes par rapport à des expériences réalisées avec les têtes d'impression.

4.1.5 Étude comparative des résultats expérimentaux et de la modélisation numérique

Dans cette partie, nous détaillons une expérience de confinement hydrodynamique réalisée en observant le système hydrodynamique à l'aide de nanoparticules fluorescentes. Cela nous permet de comparer cette expérience avec le modèle de simulation.

La figure 4.8 affiche la situation microfluidique entre la tête et le substrat. Cette expérience, ainsi que la simulation associée, ont été réalisées dans les conditions suivantes : $V = + 0.1$ mm/s, $Z_{\text{gap}} = 100$ μm , $\mu_{\text{mat}} = 8.5$ mPa.s, $\mu_{\text{med}} = 1$ mPa.s, $\phi_{\text{in}} = 25$ $\mu\text{L}/\text{min}$, $R_{\phi} = 5$. Nous pouvons y voir les flux de la solution injectée en vert et du milieu en bleu. Il s'agit d'une image en fluorescence vue par microscope inversé. La solution injectée est la solution typique de 40% de PEGDA. Les flux sont observés par l'intermédiaire de microparticules de 5 μm fluorescentes en suspension dans la solution injectée (concentration de volume de nanoparticules = 0.01 %). L'image montre une superposition d'images issues d'une vidéo de 30s, afin d'obtenir le tracé des particules. Le cercle extérieur sur l'image correspond au contour de la tête d'impression.



(a) Expérience de confinement du fluide injecté. Vue en fluorescence d'une solution de PEGDA avec microparticules fluorescentes de 5 μm en exposition longue (b) Simulation de la situation comparable à la figure (a)

FIGURE 4.8 – Comparaison entre expériences et simulations, $Z_{\text{gap}} = 100$ μm , $\phi_{\text{in}} = 25$ $\mu\text{L}/\text{min}$, $R_{\phi} = 5$, $V = 0$ mm/s

Sur la gauche de l'image, le canal d'injection éjecte le flux de solution dans l'espace confiné. Il est possible de noter la dispersion à 360° des microparticules à proximité du canal d'injection. Sur la droite de l'image, le canal d'aspiration collecte la solution injectée. Ce canal aspire aussi une partie du médium, visible par les quelques microparticules venant de l'extérieur de la tête se faisant aspirer. Avec un rapport d'aspiration $R_{\phi} = \frac{\phi_{\text{out}}}{\phi_{\text{in}}} > 1$ et grâce aux structures de surface de la tête, le flux des microparticules forme un cardioïde de l'injection vers l'aspiration.

La seconde figure est un résultat de simulation Comsol. Nous pouvons y voir les flux de solution injectée en vert et en bleu du médium. L'ensemble des lignes de flux injectées est dirigée vers l'aspiration ce qui témoigne d'une situation de confinement. Nous pouvons aussi voir les lignes de flux du médium entourant celles du fluide injecté, aidant le phénomène de confinement.

Les deux images sont très similaires avec une forme de cardioïde équivalente. La solution injectée est bien collectée par le canal de l'aspiration. Les lignes flux de solution se dirigeant initialement vers l'extérieur de la tête, à gauche de l'image, sont finalement redirigées vers la droite. Sur l'image expérimentale, cette partie donne une impression de sur-estimation. En effet, la solution dans cette zone a une vitesse faible et donc les nanoparticules fluorescentes fournissent une intensité lumineuse locale

très importante sur le temps d'acquisition. Au contraire, les nanoparticules dans la zone centrale de la tête ont une vitesse plus élevées et donc fournissent moins d'intensité. Sur l'image de simulation, cette zone correspond à la zone verte sur la gauche sans ligne de flux. La solution injectée est présente dans cette zone, mais à très faible vitesse, car aucune ligne de flux n'est visible. Les deux images, expérimentales et de simulations fournissent donc un résultat similaire pour cette zone.

Grâce aux quelques nanoparticules qui étaient dans le milieu, les lignes de flux provenant du milieu sont visibles sur l'image expérimentale. Il est possible de voir que le schéma hydrodynamique est une fois de plus similaire aux lignes de flux bleues (du milieu) sur la figure de simulation.

Dans cette partie, nous avons pu comparer un système expérimental et numérique. Les deux systèmes sont cohérents par l'analyse de la zone occupée par la solution injectée et par la forme des lignes de flux. Le modèle de simulation est donc validé par la vérification expérimentale.

4.2 Optimisation de l'architecture des têtes d'impression

Une partie des simulations a tout d'abord été dédiée à l'optimisation des structures présentées sur la surface de la tête d'impression afin de favoriser le confinement et l'approvisionnement de la solution injectée dans la zone d'impression. Deux variables ont été considérées : le taux de récupération du fluide injecté pour vérifier la non-contamination du milieu environnant et la vitesse du fluide dans la zone de polymérisation pour vérifier le renouvellement de la solution injectée. En gardant constants tous les paramètres d'impression (débits, viscosité, hauteur de la tête, vitesse de déplacement, etc), notre objectif a été de proposer des géométries permettant d'obtenir les valeurs les plus élevées pour ces paramètres. Cette optimisation n'a été faite que par le biais de simulations, afin d'accélérer le développement. Nous aurions aussi pu imprimer de nouvelles têtes d'impression pour chaque géométrie et mesurer les flux avec des billes fluorescentes. Cette seconde idée est en revanche plus chronophage et moins précise à quantifier.

4.2.1 Structuration de la surface de la tête pour modification de la résistance microfluidique locale

Par l'ajout ou le retranchement de structures dans la zone de confinement, les flux microfluidiques sont modifiés. En effet, plus l'espace disponible est grand, plus la résistance R chute. Par l'application d'une pression P , un flux ϕ est déclenché pondéré par la résistance. Les lignes de flux suivent les chemins de moindre résistance hydrodynamique dans les volumes larges. Dans le cas de la tête d'impression, nous avons ainsi rajouté ou enlevé certaines parts de la tête en contact avec le fluide afin de diriger les flux.

Ci-dessous les calculs de la résistance d'une zone rectangulaire avec K une constante pour la résistivité microfluidique (proche de 12 quand $h \gg w$), L la longueur de la zone, h la hauteur de la zone et l la largeur de la zone.

$$\phi = \frac{\Delta P}{R} R_{microfluidique} = k \cdot \frac{L}{h^3 \cdot l} \quad (4.17)$$

4.2.2 Description de l'architecture des têtes d'impression

La forme basique de la tête d'impression est un cylindre, avec deux canaux microfluidiques débouchant sur la surface inférieure. Dans cette partie, cette surface est utilisée comme origine de l'axe Z . Les distances positives dans l'axe vertical Z sont comptées vers le bas (vers le substrat) afin de mesurer les volumes rajoutés en positif et les volumes soustraits en négatif.

La réflexion sur l'optimisation microfluidique des têtes d'impression peut s'appliquer à n'importe quelle génération de têtes d'impression, à partir de la seconde. En effet comme elles sont imprimées en 3D, la liberté de modifier la structuration de surface existe. Cette optimisation est donc utilisable quelle que soit la génération.

Nous avons implémenté et modifié les structures suivantes. Les reliefs sont décrits sur la figure 4.9, en étant augmentés sans respecter l'échelle afin de les discerner facilement.

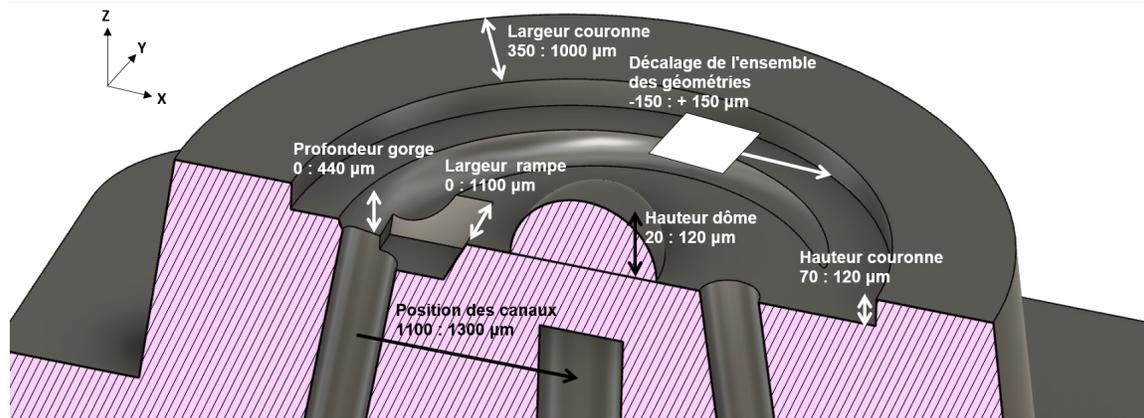


FIGURE 4.9 – Image Fusion CAO en coupe de la surface de la tête d'impression. Les échelles de chaque structure sont augmentées afin de favoriser la visibilité

- Une couronne encadre l'extérieur de la tête d'impression et forme une enceinte circulaire. Bien que les écoulements soient toujours possibles, cette structure permet d'augmenter la résistance hydrodynamique entre la zone de polymérisation et le milieu environnant. Elle contribue en premier lieu au confinement. Son diamètre interne est $1800\ \mu\text{m}$. Sa largeur est étudiée entre $350\ \mu\text{m}$ et $700\ \mu\text{m}$. Nous étudions aussi sa hauteur entre $70\ \mu\text{m}$ et $120\ \mu\text{m}$. Le dôme a une taille typique de $120\ \mu\text{m}$, ce qui signifie que si la couronne mesure $120\ \mu\text{m}$, les deux éléments auront la même hauteur.
- Un canal périphérique constitué d'une gorge de section hémicirculaire inclinée a été introduite entre l'injection et l'aspiration. Son empreinte a été générée sur la base d'une structure torique inclinée en négatif. Cette gorge est située en bordure de la zone de confinement. L'espace disponible créé augmente en s'approchant de l'aspiration. Un gradient de la résistance microfluidique existe alors entre l'injection et l'aspiration. Elle contribue à la collecte du fluide à la périphérie de la tête afin de guider les lignes de flux du matériau injecté vers l'aspiration et à limiter la contamination du milieu environnant par le matériau. L'inclinaison de la tête permet d'augmenter l'espace créé par la gorge en s'approchant de l'aspiration. Dans la partie sur la caractérisation microfluidique (Fig. 4.8,) nous pouvons voir que les lignes de flux sont distribuées dans cette structure. Son diamètre principal est de $1150\ \mu\text{m}$ et secondaire de $500\ \mu\text{m}$. Cette structure est placée sur un plan incliné à 7° . Cette structure est étudiée à travers sa profondeur maximale, impactée par sa position sur l'axe Z. Plus le tore négatif est à l'extérieur de la tête, moins il crée d'espace pour les flux. Les simulations ont été calculées avec le tore enfoncé de $0\ \mu\text{m}$ à $440\ \mu\text{m}$.
- Une structure creuse en négatif, appelée rampe, est présente à la sortie du canal microfluidique de l'aspiration. Elle permet de diriger les flux dans l'axe injection-aspiration pour passer à travers la zone de polymérisation. Elle permet d'augmenter la vitesse dans la zone de polymérisation. Elle mesure $500\ \mu\text{m}$ de profondeur et $800\ \mu\text{m}$ de long avec des pentes en biseaux. Elle a été étudiée avec une largeur allant de $0\ \mu\text{m}$ à $1300\ \mu\text{m}$.
- Une structure de protection en PDMS est introduite sur la fenêtre protégeant la fibre optique. Cette structure a été introduite d'une part pour bénéficier des effets d'inhibition de la réaction de polymérisation du PEGDA au contact du PDMS (voir partie 5.2.5.2) permettant de limiter l'adhésion de certains matériaux, tels que le PEGDA, durant la polymérisation. Néanmoins, la forme même de la structure réduit localement les vitesses d'écoulement dans la zone de polymérisation. Ce dôme ajoute un volume sur l'axe de polymérisation, augmente la résistance et diminue le débit à sa proximité. Pourtant, nous avons choisi de l'implanter afin d'éloigner légèrement le point de polymérisation du reste de la tête. En effet, la hauteur du point de polymérisation doit au moins être égale au reste de la tête, voire supérieure. Dans le cas contraire, lors du déplacement de la tête, les structures en cours d'impression pourraient être abîmées par le raclement de la tête (voir Fig. 4.11.B). Ce phénomène de raclement peut être augmenté si la tête d'impression n'est

pas parfaitement parallèle à l'axe de déplacement. Sans le dôme, la couronne ne pourrait pas exister, car elle abîmerait les structures imprimées, et sans couronne la contamination augmente. Le dôme permet donc le confinement à travers la couronne. Par contre, sans dôme, la vitesse dans la zone de polymérisation serait plus importante. Nous avons ainsi optimisé ce dôme afin de minimiser l'influence microfluidique négative tout en gardant sa fonction protectrice. Il mesure 1000 μm de large et 1000 μm de long. La hauteur du dôme est étudiée entre 20 μm et 120 μm . La hauteur de la couronne varie de paire pour garder un écart constant de 20 μm afin que le dôme dépasse toujours de la tête. Un dôme dépassant de 50 μm autorise un défaut angulaire de la tête de 1.14° qui protège toujours les structures imprimées. Un dôme dépassant de 20 μm n'autorise que 0.45°. La calibration de l'horizontalité de la tête présentée dans le protocole n°5, p.176 est à effectuer avec soin grâce aux goniomètres portant la tête.

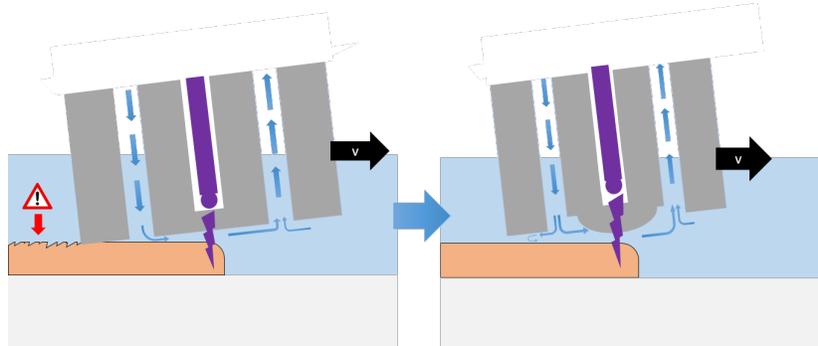


FIGURE 4.10 – Schéma illustrant l'intérêt de l'intégration d'un dôme de PDMS pour compenser les défauts de planéité de la tête et les dommages potentiels causés aux structures imprimées

- Enfin, nous pouvons aussi modifier le placement des structures existantes. Les canaux peuvent être rapprochés ou éloignés du centre. Les canaux ont été étudiés avec une distance au centre de 1100 μm à 1300 μm . Il est difficile de réduire cette valeur du fait de la taille des canaux fluidiques et optiques. Nous pouvons aussi déplacer l'ensemble des structures sur l'axe \vec{x} , afin de changer l'équilibre microfluidique entre la zone confinée et l'environnement. Entre autres, l'injection et l'aspiration sont plus ou moins proches du périmètre de la tête ce qui joue sur le positionnement des lignes de flux. Cette méthode a été étudiée avec décalage de - 150 μm à +150 μm .

4.2.3 Étude quantitative des paramètres géométriques de la tête d'impression sur les écoulements

Les résultats des simulations permettant d'étudier l'impact des paramètres listés dans le paragraphe précédent sont présentés dans la figure 4.11. Chaque courbe représente l'impact d'un des paramètres géométriques, les autres paramètres étant définis à leurs valeurs par défaut. Les valeurs par défaut sont indiquées sur le graphe. Chaque courbe de couleur représente l'évolution du taux de récupération et de la vitesse dans la zone de polymérisation en fonction du paramètre considéré. Les simulations ont été effectuées dans les conditions suivantes d'impression : $V = 0.1 \text{ mm/s}$, $Z_{\text{gap}} = 100 \mu\text{m}$, $\mu_{\text{med}} = \mu_{\text{mat}} = 1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, $R_{\phi} = 1.375$.

Comme nous le verrons par la suite, ces conditions d'impression sont plutôt défavorables, car R_{ϕ} est faible. Nous avons choisi de travailler dans cette gamme de vitesse afin de pouvoir mesurer la variation du taux de récupération. Travailler avec un R_{ϕ} trop élevé aurait conduit à un taux de récupération de 100% pour toutes les simulations rendant la comparaison impossible.

Sur le diagramme de synthèse, plus les points sont à droite, plus la vitesse de déplacement est élevée. Cela veut dire que la zone de polymérisation est mieux renouvelée en matériaux. Cela veut dire aussi que le temps de changement entre deux matériaux sera plus court. De plus, sur le diagramme, plus les points sont hauts, plus la collecte du matériau est efficace. La solution injectée contamine moins l'environnement.

Quasiment toutes les variations de géométrie font diminuer soit la récupération, soit la vitesse. Cela prouve que ces structures sont pertinentes dans leurs formes actuelles ou proches. Les exceptions

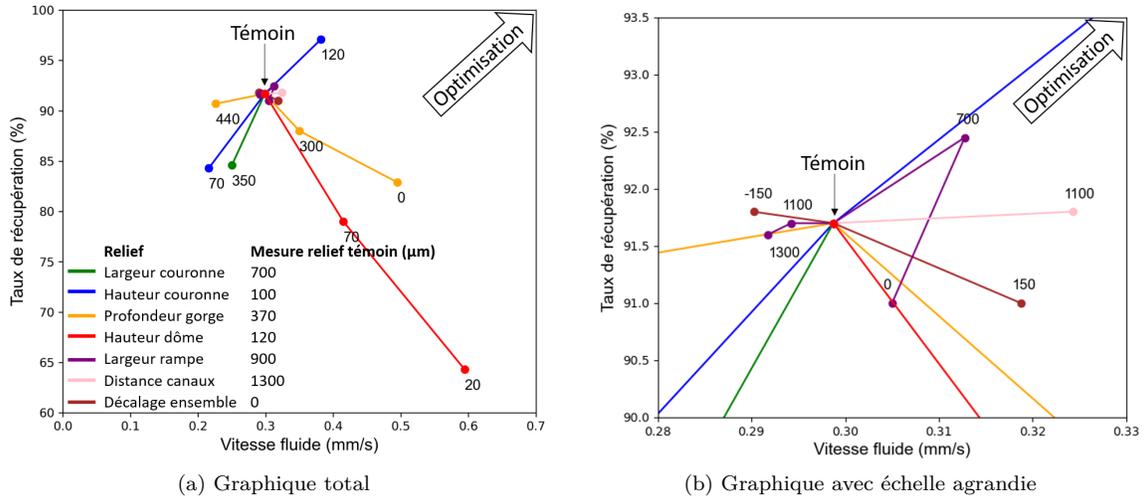


FIGURE 4.11 – Optimisation des structures de surface par l’observation du taux de récupération et de la vitesse du fluide. Chaque courbe représente l’étude d’un relief. La dimension du relief étudié est étiquetée sur chaque point. Les dimensions des reliefs du point témoin sont dans la légende.

sont la hauteur de la couronne, la largeur de la rampe et la distance des canaux, pour lesquels les simulations proposent une amélioration.

- Dans le cas de la couronne, sa présence permet d’augmenter le confinement de la solution injectée. Plus la couronne est large (700 μm plutôt que 350 μm) et plus elle est haute (120 μm plutôt que 100 μm ou 70 μm), plus elle augmente le taux de récupération. Elle permet d’isoler la zone sous la tête d’impression du fluide environnant en augmentant la résistance microfluidique entre les deux zones. Nous avons choisi de ne pas augmenter la largeur de la couronne afin de garder une tête d’impression d’un diamètre de 5 mm maximum. Lorsque la couronne mesure 120 μm de haut, elle est aussi grande que le dôme. L’effet de protection par le dépassement du dôme, décrit sur la figure 4.10 est perdu. Ce point a été simulé pour comprendre le système hydrodynamique, mais ne peut pas être appliqué. Nous avons donc choisi une hauteur de 100 μm ou plutôt un écart avec le dôme de 20 μm . La figure 4.12 démontre la pertinence de la couronne. Nous pouvons y voir la situation sans couronne où la solution injectée contamine le milieu alors que la situation avec couronne permet le confinement.

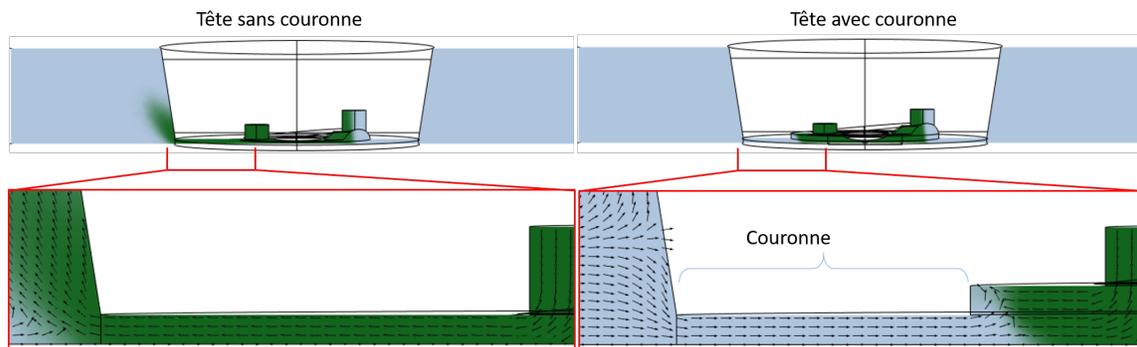


FIGURE 4.12 – Coupes dans le plan XZ de la concentration en solution injectée avec et sans couronne à la surface de la tête. Cas 1 sans couronne : le dôme mesure 20 μm . Cas 2 avec couronne : la couronne mesure 100 μm de haut et le dôme 120 μm . Cas 1 et 2 : distance dôme - substrat = 100 μm . Solution injectée en vert dans le milieu bleu. $V = 0.1 \text{ mm/s}$, $\mu_{med} = \mu_{mat} = 1 \text{ mPa.s}$, $R_{\phi} = 2.5$.

- Lors des simulations modifiant la hauteur du dôme, la hauteur de la couronne était maintenue 20 μm en dessous. Ainsi, ces simulations mesuraient à la fois l’impact du dôme lui-même, mais aussi

du système dôme - couronne. Nous voyons sur les résultats que l'augmentation de la hauteur du dôme a un effet antagoniste : cela augmente le taux de récupération, mais diminue la vitesse du fluide. En effet, le dôme ajoute un élément au niveau de la zone de polymérisation, ce qui augmente la résistance microfluidique à cet endroit. Le fluide préfère donc contourner le dôme ce qui conduit à une diminution de la vitesse dans la zone de polymérisation. Par contre, le dôme permet l'utilisation de la couronne. En gardant un écart de 20 μm entre les deux structures afin de protéger les objets imprimés, la couronne permet tout de même d'augmenter le taux de récupération. Nous avons choisi de favoriser un équilibre local, représenté par le point témoin avec un taux de récupération de 92% et une vitesse de 1.2 mm dans ce cas d'étude.

- Les simulations ont aussi montré qu'il est intéressant de rapprocher au maximum les canaux d'injection et d'aspiration du centre de la tête (à 1100 μm plutôt que 1300 μm). Cette configuration permet de limiter la résistance microfluidique entre l'injection et l'aspiration et d'augmenter la vitesse du fluide au niveau de la zone de polymérisation. Le taux de récupération n'est pas affecté. Nous ne pouvons pas diminuer la distance en dessous de 1100 μm à cause de la taille des canaux microfluidiques, du canal optique et de la présence du dôme.
- Pour la profondeur de la gorge et le décalage de l'ensemble des structures, un phénomène similaire à celui de la hauteur du dôme est visible : leurs variations conduisent à de meilleurs taux de récupération, mais à des vitesses plus faibles. Pour la gorge, nous avons choisi une profondeur de 370 μm qui permet un bon confinement, malgré une vitesse plus faible. Nous pouvons voir que le point suivant, avec une profondeur de 440 μm , n'augmente plus le taux de récupération tout en diminuant tout de même la vitesse. Pour le décalage des structures, nous avons choisi de rester dans une géométrie symétrique, avec un décalage nul.
- Enfin, la largeur de la rampe influe sur l'équilibre hydrodynamique de manière assez faible. Une largeur de 700 μm permet un gain sur le taux de récupération et sur la vitesse du fluide. C'est donc la géométrie qui sera prise en compte.

Ainsi, ce cycle de simulation a permis de prouver l'efficacité des structures utilisées et de les optimiser. Nous utilisons les paramètres suivants :

- Couronne : Diamètre interne 1800 μm , diamètre externe = 2500 μm , hauteur = 100 μm
- Dôme : Longueur = 1000 μm , Largeur = 1000 μm , hauteur = 120 μm
- Rampe : Longueur = 800 μm , Largeur = 700 μm , hauteur = 500 μm
- Gorge : Grand diamètre = 1150 μm , Largeur = 500 μm , pente = 7° , profondeur maximum = 370 μm
- Canaux fluidiques : Diamètre = 400 μm , distance au centre = 1100 μm

L'optimisation des paramètres géométriques a nécessité un investissement en temps de calcul et en optimisation assez conséquent. Ces optimisations sont conservées pour toutes les générations de têtes imprimées en 3D, dans lesquelles les méthodes de création ont évolué, mais pas la géométrie de surface. En cas de modifications du design des têtes, comme avec des têtes double fibre, il serait intéressant de simuler les structures de surface.

4.3 Influence de la viscosité de la solution injectée

Dans nos premières approches, nous avons considéré une situation simplifiée dans laquelle la viscosité du milieu est isotrope proche de celle de l'eau. Cette situation décrit bien le milieu environnant la tête d'impression, qui sera constitué par de l'eau ou du milieu de culture, mais il n'en prend pas en considération la viscosité des matériaux photopolymérisables injectés, qui seront majoritairement composés de solutions de précurseurs d'hydrogels (ex PEGDA, GelMA) dont la viscosité varie de 1 à 150 mPa.s (voir partie 4.1.2.1). Dans cette partie, nous étudions l'influence de la viscosité sur le système hydrodynamique et plus particulièrement sur le taux de récupération et sur la vitesse du fluide.

4.3.1 Illustration dans le cas d'une géométrie simplifiée

La différence de viscosité du fluide injecté, et surtout la différence qu'il existe avec le fluide compositant le milieu environnant, influent sur les mécanismes de transport de masse. Afin de caractériser l'impact de la viscosité dynamique, nous avons réalisé des simulations pour des gammes de viscosités comprise entre $\mu = 10 \text{ mPa.s}$ et celle de milieu de culture $\mu_{med} = 1 \text{ mPa.s}$.

Cette gamme de valeurs permet d'inclure la viscosité du PEGDA 700 dilué à 40% qui a été utilisé dans la plupart de nos expériences de preuve de concept. Alors $\mu_{mat} = 8.5 \text{ mPa.s}$,²⁴¹ alors que la viscosité du médium est associée à celle de l'eau $\mu_{med} = 1 \text{ mPa.s}$.

Dans une première approche, nous avons réalisé une analyse sur un modèle géométrique simplifié comprenant 3 canaux : Un canal horizontal, long de 1 mm de long et de section carrée $0.1 \cdot 0.1 \text{ mm}^2$, est modélisé. Les deux sections définissant les limites en amont et en aval du modèle constituent des zones d'écoulement libre. Ce modèle représente la zone de confinement hydrodynamique située sous la tête d'impression, ouvert sur l'environnement. Deux canaux verticaux sont insérés sur ce premier canal horizontal, long de 0.1 mm de long et de section $0.1 \cdot 0.1 \text{ mm}^2$. Ils représentent les canaux d'injection (à gauche) et d'aspiration (à droite). Le premier est réglé avec un débit entrant de $18 \text{ } \mu\text{l}/\text{min}$ et le second avec un débit sortant de $90 \text{ } \mu\text{l}/\text{min}$ soit un ratio R_{phi} de 4,5. Neuf simulations ont été réalisées sur la même géométrie, afin d'obtenir 3 points pour la viscosité du milieu (verticalement) et 3 points pour la viscosité du matériau injecté (horizontalement). La première image affiche la viscosité dans les géométries. La seconde affiche la concentration en espèce injectée.

Il est intéressant de noter que l'augmentation de la viscosité du fluide injecté et la diminution de la viscosité du milieu environnant, contribuent à diminuer le taux de récupération. Avec $\mu_{med} = 10 \text{ mPa.s}$ et $\mu_{mat} = 1 \text{ mPa.s}$, le taux de récupération est maximum. Au contraire, avec $\mu_{med} = 1 \text{ mPa.s}$ et $\mu_{mat} = 10 \text{ mPa.s}$, une fraction significative du fluide injecté dépasse la zone de confinement comme en témoignent les lignes de flux, induisant une contamination de l'environnement. L'aspiration, étant contrainte en débit, aspire indifféremment le fluide de l'environnement ou injecté. Celui injecté résistant plus du fait de sa viscosité élevée, est défavorisé face au fluide environnant.

Ces simulations nous ont permis de mettre en lumière que la viscosité impactait fortement le taux de récupération avec un modèle simple. Notre situation de travail étant proche du cas désavantageux ($\mu_{med} = 1 \text{ mPa.s}$, $\mu_{mat} = 10 \text{ mPa.s}$), nous avons décidé d'effectuer ces simulations sur la géométrie réelle. Cependant, faire varier la viscosité avec le cas réel implique souvent des problèmes de convergences du modèle numérique. C'est pourquoi nous avons aussi travaillé avec ce modèle simplifié.

Il est pertinent de noter que ces contraintes résultent de l'ouverture de notre système. Un système fermé, comme une puce microfluidique, diminuerait la problématique de la viscosité. L'étude du taux de récupération et son optimisation par la structuration de la surface prend une importance accrue dans ce contexte.

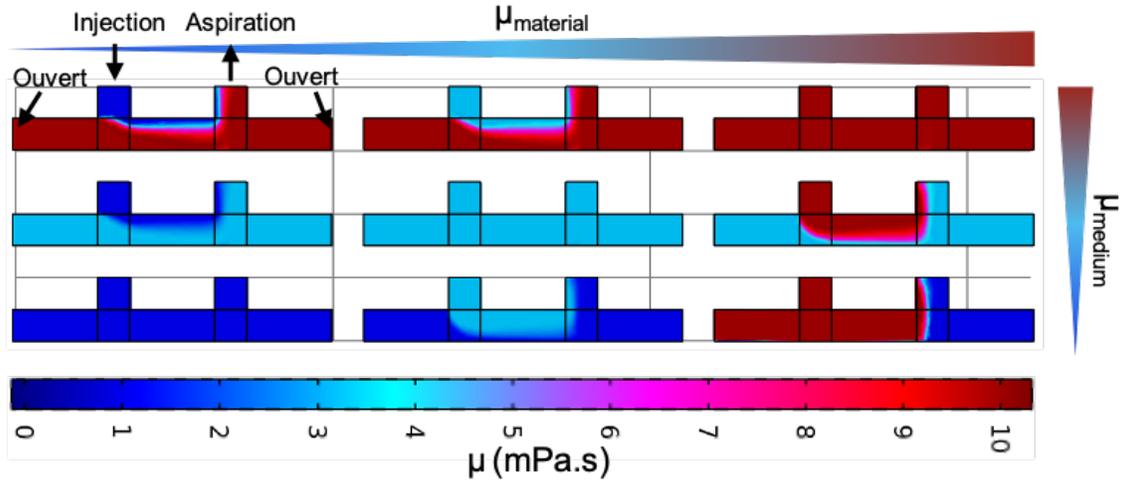
4.3.2 Étude quantitative dans une géométrie complète

Sur la base de ces premières simulations, nous avons ensuite intégré le modèle réel de géométrie tel que présenté dans la partie 4.2.2. Quatre valeurs de viscosité dynamique $\mu_{mat} = [1, 5, 8.5, 10] \text{ mPa.s}$ ont été choisies pour le matériau injecté, en gardant constante la viscosité du milieu à $\mu_{med} = 1 \text{ mPa.s}$ (voir Fig. 4.14). Nous mesurons le taux de récupération et la vitesse du fluide dans la zone de polymérisation. Nous nous sommes placés dans un régime proche de pertes afin de pouvoir mesurer une différence de taux de récupération entre les simulations : $V = 0.1 \text{ mm/s}$, $Z_{gap} = 50 \text{ } \mu\text{m}$, $\mu_{med} = 1 \text{ mPa.s}$, $R_{\phi} = 2.5$.

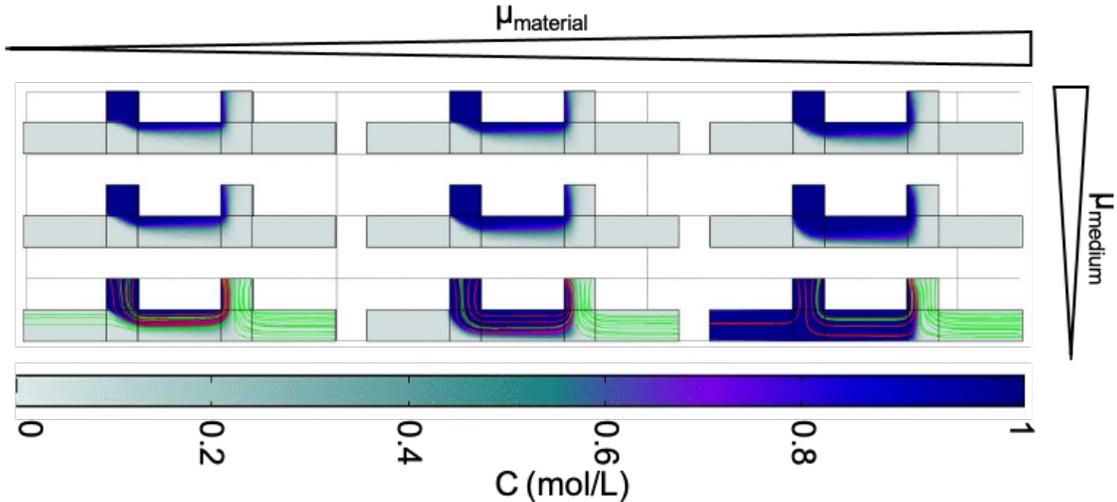
La figure 4.14 présente les résultats de cette étude. Le taux de récupération diminue avec l'augmentation de la viscosité sur la gamme $\mu_{mat} = [1 - 10] \text{ mPa.s}$ avec une baisse de 7%. La vitesse, elle, subit une chute plus importante de l'ordre de 30%. Dans la gamme 1-10 mPa.s, la vitesse du fluide injecté diminue pour atteindre une valeur plateau à 5 mPa.s et ne varie quasiment plus ensuite.

La situation avec $\mu_{mat} = 8.5 \text{ mPa.s}$ montre un élargissement de la zone occupée par le matériau injecté par rapport à $\mu_{mat} = 1 \text{ mPa.s}$. Néanmoins, cette configuration conserve un taux de récupération de 94% ce qui prouve la fonctionnalité de la tête.

Dans les parties suivantes, les diagrammes de phase d'impression issus des simulations ont été réali-



(a) Viscosités des solutions du milieu et injecté. μ_{med} est croissant des simulations du bas vers le haut, μ_{mat} est croissant des simulations de gauche vers la droite. Valeurs aux limites : 1, 3.16, 10 mPa.s.



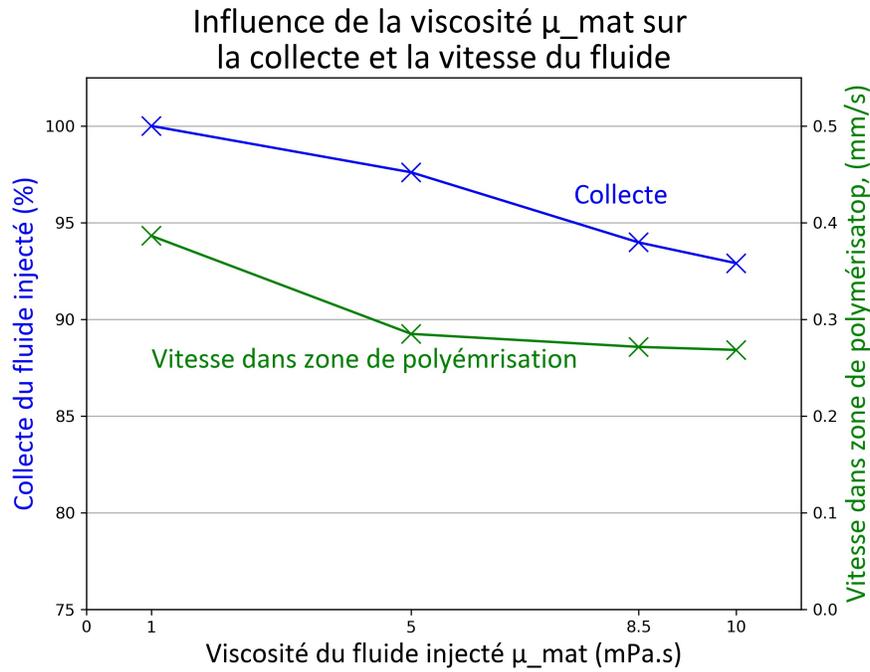
(b) Concentration en espèces injectées. Représentation des lignes de flux provenant de l'injection en rouge, et allant à l'aspiration en vert.

FIGURE 4.13 – Étude de l'influence de la viscosité dans un cas simple

sés avec une viscosité injectée de 8.5 mPa.s. Lors d'un changement vers une viscosité plus élevée comme le GelMA, il faudra prendre en compte ces phénomènes afin d'adapter les paramètres d'impression. Au contraire, si nous souhaitons travailler avec des viscosités faibles, pour effectuer de la click-chemistry par exemple,²¹³ nous pourrions relâcher les contraintes.

4.4 Influence des paramètres d'impression

Cette section décrit le résultat de modélisations numériques obtenues sur la base de l'architecture des têtes présentées dans la partie 4.2.2. Cette étude se focalise sur l'impact des paramètres d'impression (Z_{gap} et soit R_{ϕ} soit $V_{tête}$) sur l'évolution du taux de récupération et sur la vitesse du fluide dans la zone de polymérisation. Un total de cinquante simulations ont été effectuées et synthétisées dans les figures 4.15. À partir de chaque point (représenté par une croix sur les graphiques), une interpolation numérique a été effectuée permettant d'établir un diagramme de phase. Nous avons procédé



(a) Influence de la viscosité du fluide injecté sur la récupération et la vitesse

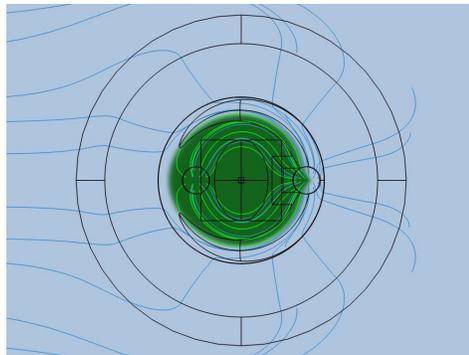
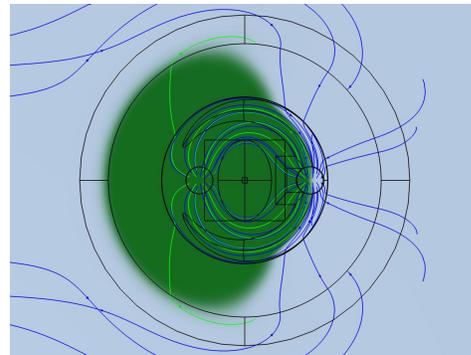
(b) Concentration en espèce injectée sous la tête. $\mu_{mat} = 1$ mPa.s(c) Concentration en espèce injectée sous la tête. $\mu_{mat} = 8.5$ mPa.s

FIGURE 4.14 – Influence de la viscosité du fluide injectée sur la récupération et la vitesse.

à un discrétisation par couleur afin de mieux visualiser les résultats.

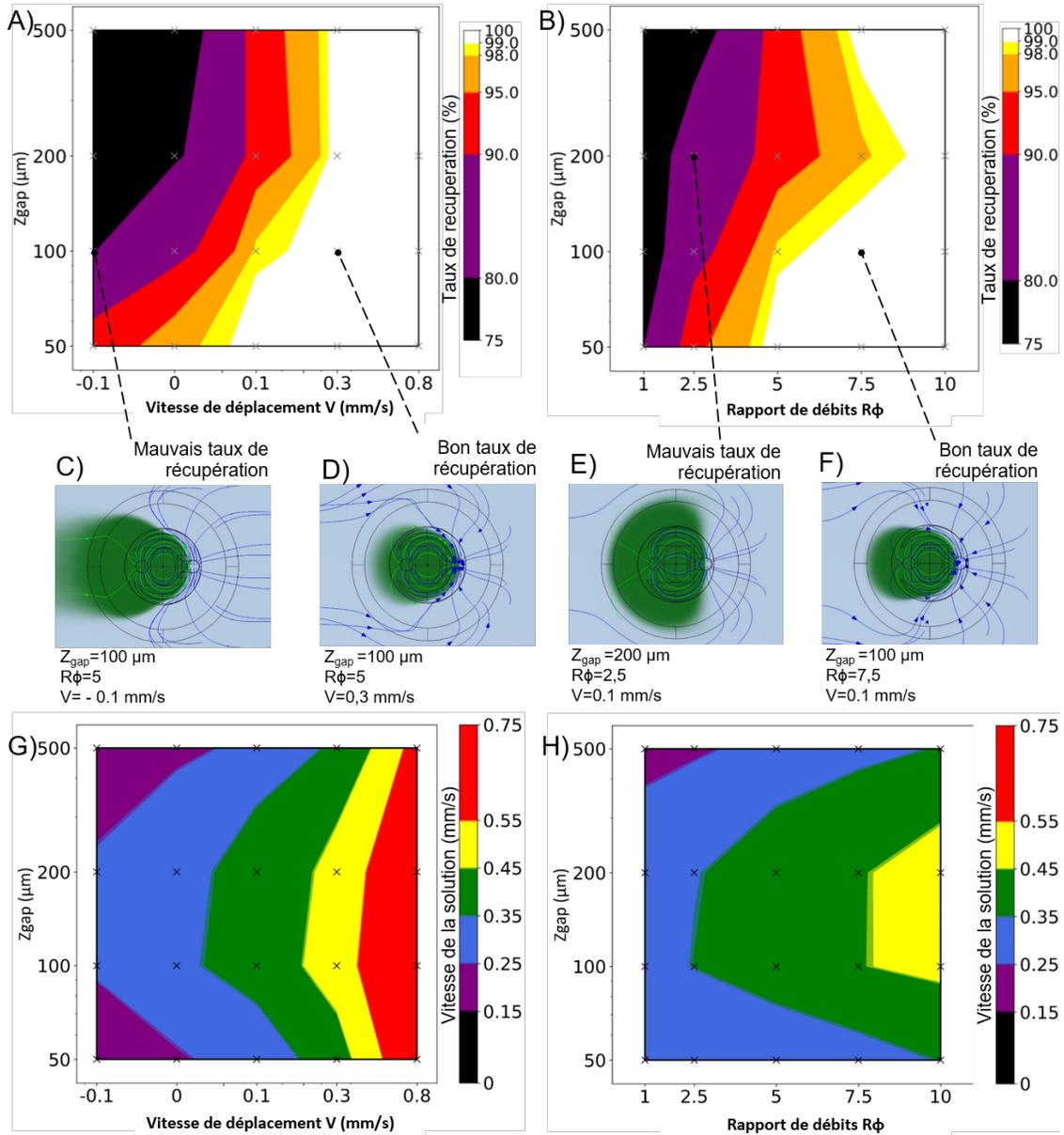
Pour les graphiques décrivant le taux de récupération, les parties blanches correspondent à un confinement hautement efficace, et les parties sombres à une contamination du milieu. Pour les graphiques représentant l'évolution de la vitesse d'écoulement, les couleurs chaudes correspondent aux vitesses élevées.

4.4.1 Influence de la hauteur de la tête

Influence de la hauteur sur le taux de récupération Les quatre graphiques 4.15A-B-H-H représentent Z_{gap} en ordonnée. Nous pouvons voir qu'en dessous de $200 \mu\text{m}$ la diminution de Z_{gap} conduit à un taux de récupération plus efficace. Ce phénomène est observé pour toutes les vitesses de déplacement V et tous les débits R_ϕ .

Pour $Z_{gap} < 200 \mu\text{m}$, le taux de récupération du flux est amélioré lorsque l'on se rapproche de la surface en raison de l'influence croissante des structures de la surface de la tête d'impression. Le confinement hydrodynamique induit par l'architecture de la tête d'impression augmente de manière significative à mesure que la distance entre la tête d'impression et la surface diminue jusqu'à l'ordre de

FIGURE 4.15 – Diagrammes de phase du taux de récupération et de la vitesse dans la zone de polymérisation (A) Taux récupération en fonction de la vitesse de déplacement et de la hauteur Z_{gap} . (B) Taux de récupération en fonction du ratio des débits R_ϕ et de la hauteur Z_{gap} . (C-F) Images montrant la concentration en espèce injectée sous la tête en fonction pour différents jeux de paramètres V , R_ϕ et Z_{gap} . (G) Vitesse du fluide dans la zone de polymérisation en fonction de la vitesse de déplacement V et de la hauteur Z_{gap} . (H) Vitesse du fluide en fonction du ratio des débits R_ϕ et de la hauteur Z_{gap} .



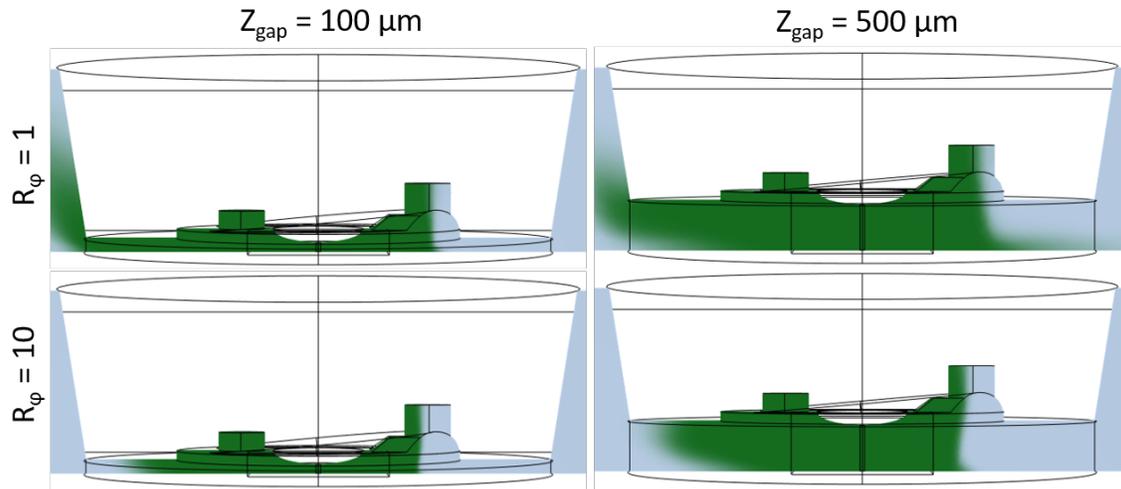
grandeur de la couronne et des autres structures de surface. Nous nous situons dans une configuration où le rapport de résistance hydrodynamique entre la zone de polymérisation et l'espace situé sous la couronne périphérique favorise le confinement hydrodynamique dans la zone de polymérisation.

Lorsque la tête d'impression est plus éloignée ($Z_{gap} \geq 200 \mu\text{m}$), le taux de récupération diminue et se stabilise. Dans ce régime, seul le rapport de débits R_ϕ et la vitesse V modifient le taux de récupération. Un Z_{gap} inférieur est favorable à l'impression de structures minces, mais le taux de récupération est toujours réalisable à un Z_{gap} plus élevé jusqu'à 500 μm (avec un rapport de débit approprié, comme le montre la figure 4.15.B), offrant la possibilité d'imprimer des structures élevées.

La figure 4.16 présente aussi de manière qualitative quatre coupes dans le plan XZ. Nous pouvons

y voir la solution injectée en vert être confinée sous la tête.

FIGURE 4.16 – Quatre coupe XZ issues de Comsol montrant la solution injectée (en vert) dans le milieu (en bleu) à $Z_{\text{gap}}=\{100;500\}$ μm et $R_{\phi}=\{1;10\}$, $V = 0.1$ mm/s



Il est notable sur la figure 4.15.B que le taux de récupération augmente légèrement entre 200 μm et 500 μm . En effet, nous avons postulé qu'à $Z_{\text{gap}} = 500$ μm , l'aspiration arrive bien à collecter du médium du côté de l'injection. Un confinement par le fluide environnant de la solution injectée se met alors en place.

Influence de la hauteur sur la vitesse du fluide L'augmentation du ratio des débits R_{ϕ} conduit à l'augmentation de la vitesse du fluide dans la zone de polymérisation. Cette observation s'explique assez naturellement par la pression négative induite par l'aspiration plus importante.

Trois régimes sont néanmoins identifiables. Dans le premier ($Z_{\text{gap}} \leq 100$ μm), la tête est très proche du substrat, ce qui augmente considérablement la résistance microfluidique et diminue la vitesse du fluide. Ensuite, (100 $\mu\text{m} \leq Z_{\text{gap}} \leq 200$ μm) la hauteur n'influe quasiment plus sur la vitesse du fluide, quelle que soit la vitesse de déplacement ou le ratio des débits. Enfin, ($Z_{\text{gap}} \geq 200$ μm), la vitesse augmente avec l'augmentation de la hauteur.

4.4.2 Influence de la direction et de la vitesse de la tête d'impression

Influence de la vitesse de déplacement V L'augmentation de la vitesse de la tête d'impression le long de l'axe X positif favorise la récupération du matériau, car cela contribue au mouvement du matériau vers le canal d'aspiration. Par exemple, avec $Z_{\text{gap}} = 100$ μm et $R_{\phi} = 5$, le taux de récupération est de 88 %, 98% et 100% (voir Fig. 4.15.B), respectivement, à $V = 0$ mm/s, 0,1 mm/s et 0,3 mm/s. Plus la vitesse de déplacement est grande, plus ce phénomène est accentué. L'augmentation de la vitesse de déplacement conduit donc à un meilleur taux de collecte. Inversement, le déplacement de la tête d'impression vers l'arrière contribue à l'étalement du matériau en dehors de la zone de la tête d'impression, réduisant ainsi le taux de récupération. Par exemple, $R_{\phi} = 5$ n'est pas suffisant pour maintenir une bonne collecte avec un mouvement vers l'arrière $V = -0,1$ mm/s pour tous les Z_{gap} . Dans ce dernier cas, l'effet de confinement est insuffisant et une progression du matériau injecté dans le milieu environnant est observée. La figure 4.15.C illustre ce phénomène.

Impact de la direction d'impression Comme nous l'avons expliqué dans la partie précédente, les vitesses de déplacement négatives de la tête conduisent à une moindre efficacité de réaspiration du matériau injecté. Ce phénomène est à prendre en compte dans les stratégies d'écriture de motifs étendus qui requièrent la juxtaposition de plusieurs structures imprimées. Une stratégie utilisée de façon conventionnelle pour l'écriture de motifs larges est basée sur l'utilisation d'un mode de balayage (raster scan) où l'impression est réalisée par un ensemble de trajectoires juxtaposées en aller-retour.

La figure 4.17.A montre l'impact du rapport de débits R_ϕ sur la taux de récupération pour des vitesses négatives et positives de valeur absolue $|V| = 0.1 \text{ mm/s}$. Pour $Z_{\text{gap}} = 50 \text{ }\mu\text{m}$, $R_\phi = 5$ est suffisant dans un déplacement dans le sens positif pour atteindre un taux de récupération $> 99\%$ alors qu'il faut $R_\phi = 7.5$ pour un déplacement inverse. Cette augmentation implique une consommation plus élevée de matériaux. Nous voyons que pour des valeurs de Z_{gap} plus élevées de l'ordre de $100 \text{ }\mu\text{m}$, le taux de récupération de matériaux baisse significativement avec un maximum de 95% à $R_\phi = 10$. Cette observation montre une limite de l'effet de confinement et a été confirmée par des observations expérimentales des écoulements. Ces résultats nous ont conduit à la décision suivante : nous ne considérons pas l'impression dans le cas de vitesses négatives, afin de limiter toute modification de la concentration du matériau durant la polymérisation.

En conséquence, dans la majorité de nos expériences, nous avons choisi une autre modalité d'écriture qui consiste à décomposer les motifs d'impression suivant une juxtaposition de trajectoires d'écriture parallèles orientées uniquement dans le sens positif de déplacement. Une fois la première trajectoire d'écriture achevée, le laser est éteint, laissant la tête se repositionner au point de départ de la trajectoire suivante. Durant ces phases de repositionnement, le rapport de débit R_ϕ est adapté afin de garantir la récupération de la solution injectée (voir 4.17.B). Cette stratégie induit une augmentation des temps d'impression, mais permet d'éviter toute problématique liée à une contamination du milieu environnant et de conserver des conditions d'écriture constantes sur l'ensemble des trajectoires.

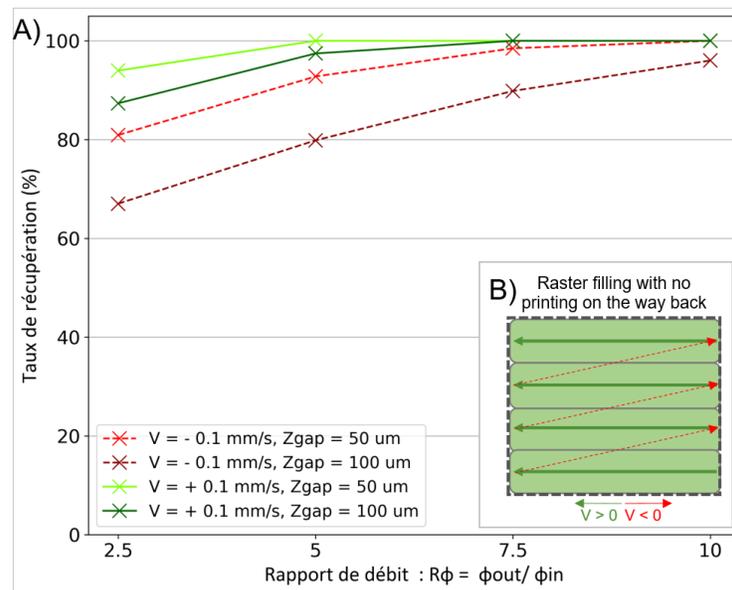


FIGURE 4.17 – Confinement lors de déplacements avec une vitesse positive ou négative. (A) Influence du ratio de débits avec $V = + 0.1 \text{ mm/s}$, $V = - 0.1 \text{ mm/s}$ et $Z_{\text{gap}} = 50 \text{ }\mu\text{m}$, $Z_{\text{gap}} = 100 \text{ }\mu\text{m}$. (B) Schéma d'une impression dans un seul sens (vert) et retour sans impression (rouge)

4.4.3 Influence du rapport entre débit d'injection et d'aspiration R_ϕ

La géométrie de la tête d'impression a été optimisée de façon à promouvoir la ré-aspiration des matériaux injectés. Néanmoins, les simulations et les résultats expérimentaux montrent que pour un rapport de débits $R_\phi = 1$, au moins 20% du fluide injecté est perdu quelle que soit la valeur de la distance Z_{gap} . Au contraire, avec une forte aspiration $R_\phi = 10$, la collecte atteint de valeurs supérieures à 99%. La figure 4.15.E ($R_\phi = 2.5$, $Z_{\text{gap}} = 200 \text{ }\mu\text{m}$) montre un cas de contamination de l'environnement ou une fraction du matériau injecté dépasse de la zone centrale de confinement. La figure 4.15.F quant à elle ($R_\phi = 7.5$, $Z_{\text{gap}} = 100 \text{ }\mu\text{m}$), montre un régime de confinement efficace.

Dans la majorité de nos expériences, nous avons privilégié des taux de récupération $> 98\%$ et donc un $R_\phi > 7.5$. Pour plus de précisions, l'utilisateur peut décider du taux de perte acceptable : moins de 1%, 2%, 5%. Pour $Z_{\text{gap}} = 200 \text{ }\mu\text{m}$ et $V = 0.1 \text{ mm/s}$, cela correspond respectivement à $R_\phi = 8.25$, 7.7, 6.4 (d'après les interpolations entre les points de mesures).

Dans cette partie, nous avons pu décrire l'influence des variables d'impression. Nous avons étudié l'impact de la hauteur, du rapport des débits et de la vitesse de déplacement sur la capacité de récupération de la solution injectée et sur la vitesse du fluide. Entre autres, une faible hauteur, grande vitesse et un grand rapport de vitesse permettent un bon taux de récupération. Cette étude fournit un diagramme de phase permettant à un utilisateur de la plateforme de se situer dans des conditions hydrodynamiques favorables dans le cadre d'une impression.

4.5 Étude des concentrations et des temps caractéristiques de renouvellement de matériaux dans la zone de polymérisation

4.5.1 Influence de la vitesse du fluide sur la concentration des matériaux

Nous avons souhaité étudier l'impact éventuel des paramètres d'impression sur les profils de concentration au niveau de la zone de polymérisation. Nous avons étudié s'il existait un potentiel effet de dilution induit par l'aspiration du milieu environnant qui viendrait modifier la composition du matériau photopolymérisable. La figure 4.18 montre les profils de concentration obtenus suivant l'axe X pour différentes conditions d'aspiration correspondant soit à un régime de contamination (A) soit à un bon régime de confinement (B) ($Z_{\text{gap}} = 100 \mu\text{m}$, $V = 0.1 \text{ mm/s}$, $\mu_{\text{med}} = 1 \text{ mPa.s}$ et $\mu_{\text{mat}} = 8.5 \text{ mPa.s}$. $R_{\phi} = 1$ ou $R_{\phi} = 7.5$).

La zone de polymérisation atteint une concentration nominale de solution injectée dès trois secondes dans les deux situations. Nous pouvons aussi voir qu'un régime totalement stable est atteint à 30 secondes. Que le confinement soit efficace ou non, l'état du matériau dans la zone de polymérisation n'est pas affecté. Ce système garde ainsi la capacité de renouvellement du matériau même en cas de contamination de l'environnement. Ainsi, le mouvement de la tête et l'injection en continu ne créent pas de dilution de la solution injectée. Les temps caractéristiques de diffusion sont très inférieurs aux temps de renouvellement du matériau.

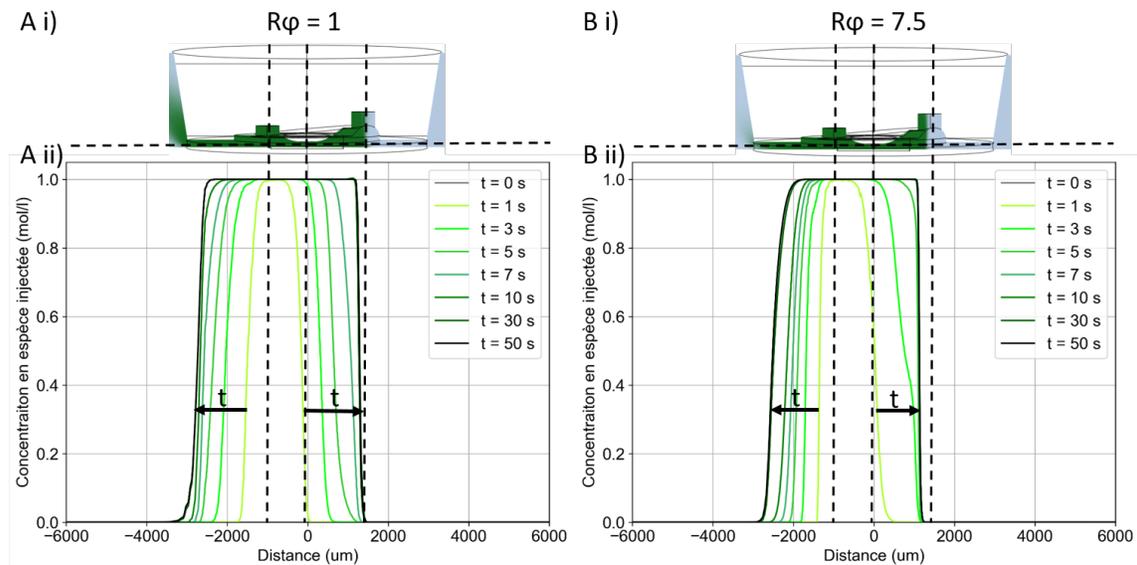


FIGURE 4.18 – Concentration normalisée en espèce injectée dans la zone de polymérisation. $Z_{\text{gap}} = 100 \mu\text{m}$, $V = 0.1 \text{ mm/s}$, $\mu_{\text{med}} = 1 \text{ mPa.s}$ et $\mu_{\text{mat}} = 8.5 \text{ mPa.s}$. A) $R_{\phi} = 1$, B) $R_{\phi} = 7.5$. i) Vue en coupe de la concentration en espèce injectée (vert dans le milieu (bleu)). ii) Concentration en espèce injectée selon l'axe X en fonction du temps à $Z = 50 \mu\text{m}$.

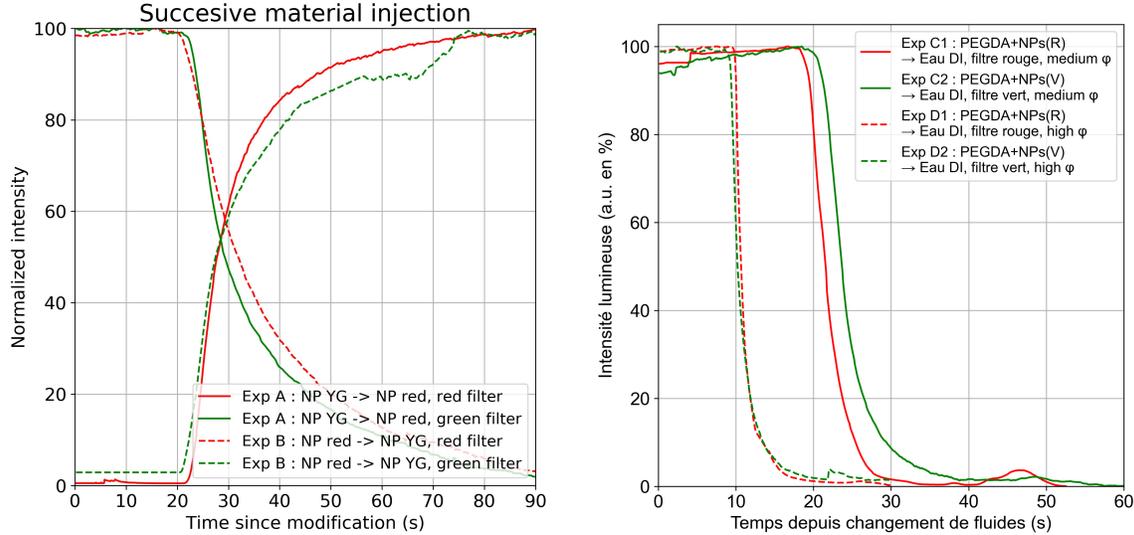
4.5.2 Temps caractéristiques de renouvellement de matériaux

La plateforme est construite de manière à pouvoir injecter plusieurs fluides successivement. Lors d'une impression multimatériaux, l'étude du transport de masse durant des temps de commutation entre deux matériaux est essentielle afin de pouvoir garantir une concentration nominale des matériaux injectés durant la photopolymérisation.

Nous avons souhaité évaluer les temps caractéristiques requis lors de séquences de lavage ou d'injection successives de matériaux de compositions différentes afin d'appréhender les effets de dilutions et d'obtenir une concentration homogène dans la zone de polymérisation.

Pour cela nous avons réalisé une première série d'expériences au cours desquelles nous avons suivi l'évolution temporelle des concentrations relatives de solutions d'hydrogel dans lequel nous avons introduit une suspension de particules (Exp. A et exp. B de la figure 4.19, $V = +0.1$ mm/s, $Z_{\text{gap}} = 200$ μm , $R_{\phi} = 5$, $\phi_{in} = 30$ $\mu\text{L}/\text{min}$). Dans l'expérience A, le premier matériau est constitué d'une solution de PEGDA à 40%, chargée en nanoparticules fluorescentes vertes (300 nm à 0.01 en volume) et avec $\mu_{mat} = 8.5$ mPa.s. Une seconde solution de PEGDA à 40% équivalente avec des nanoparticules fluorescentes rouges est ensuite introduite à $t=0$ s. L'expérience B a été réalisée en inversant l'ordre d'introduction des solutions.

L'intensité de fluorescence a été mesurée au cours du temps. Nous avons fait l'hypothèse que cette intensité est représentative de la concentration des solutions d'hydrogel. Les graphiques obtenus nous montrent ainsi l'évolution temporelle de la concentration de chaque solution. Nous observons des profils symétriques dans les expériences A et B qui confirment des propriétés rhéologiques identiques pour les deux solutions. Le délai de 20s observé entre l'injection des matériaux dans le système et la diminution observée de l'intensité est lié aux volumes morts entre le canal d'injection et la tête d'impression et à la diffusion de Taylor associée. Nous observons une décroissance de la concentration du matériau initial, progressivement remplacé pour le nouveau matériau avec un point de convergence proche de 50%. Les mesures montrent qu'après 30 secondes d'injection, pour un $\phi_{in} = 30$ $\mu\text{L}/\text{min}$ et $R_{\phi} = 5$, la concentration atteint la moitié de la valeur nominale, et 90% en 60 secondes.



(a) Etude expérimentale des concentrations dans la zone de polymérisation lors de l'injection successive de matériaux. Injections successives de solutions de PEGDA à 40% chargées en nanoparticules (nanoparticules fluorescentes vertes et rouge à 0.01% en volume). $V = +0.1$ mm/s, $Z_{\text{gap}} = 100$ μm , $\mu_{mat} = 8.5$ mPa.s, $\mu_{med} = 1$ mPa.s, $R_{\phi} = 5$, $\phi_{in} = 30$ $\mu\text{L}/\text{min}$. L'injection du deuxième matériau est initiée à $t = 0$ s.

(b) Etude expérimentale des temps de rinçage de la zone d'impression. Renouvellement de solutions de PEGDA à 40% chargées en nanoparticules (nanoparticules fluorescentes vertes et rouge à 0.01% en volume) par une solution de rinçage (eau déionisée) à 1 mPa.s. $V = +0.1$ mm/s, $Z_{\text{gap}} = 100$ μm , $\mu_{mat,1} = 8.5$ mPa.s, $\mu_{med} = \mu_{mat,2} = 1$ mPa.s, $R_{\phi} = 5$. L'injection de la solution de rinçage est initiée à $t = 0$ s. $\phi_{in,C} = 30$ $\mu\text{L}/\text{min}$, $\phi_{in,D} = 30$ $\mu\text{L}/\text{min}$

FIGURE 4.19 – Étude du temps de remplacement des fluides dans la zone de polymérisation

Une deuxième série d'expériences a été réalisée pour simuler une étape de lavage durant laquelle

une solution d'hydrogel (PEGDA 40%, nanoparticules fluorescentes) est remplacée par une solution de rinçage avec une viscosité de 1 mPa.s (Eau déionisée). Dans les expériences C1, C2 nous avons défini un débit $\phi_{in} = 30\mu L/min$ et un rapport de débits $R_\phi = 5$, alors que les expériences D1 et D2 ont été réalisées avec $\phi_{in} = 60\mu L/min$ et $R_\phi = 5$. Les deux expériences montrent des temps caractéristiques de l'ordre de 15s et 30s pour des débits de $\phi_{in} = 60\mu L/min$ et $\phi_{in} = 30\mu L/min$ respectivement pour atteindre des niveaux de concentration d'espèces $< 10\%$. Ces temps seront utilisés dans nos expériences d'impression multimatériaux (Chapitre 5). Le rinçage par une solution à faible viscosité (exp. C1) montre une accélération du temps de changement à 90%, avec seulement 30 secondes quand $\phi_{in} = 30\mu L/min$. Des débits entrant et sortant doublés (exp. C2), confirment le résultat attendu de la diminution du temps de changement. Une estimation, basée seulement sur ces deux points, suggère une relation de proportionnalité inverse entre le point ($\phi_{in} = 30\mu L/min; t = 30s$) et ($\phi_{in} = 60\mu L/min; t = 15s$).

Dans cette partie, nous avons étudié la capacité de renouvellement sous la tête expérimentalement. Nous avons pu mettre en avant les temps caractéristiques pour un renouvellement avec une solution équivalente ou avec une solution de rinçage. Ces valeurs sont à prendre en compte lors d'expériences multimatériaux demandant d'alterner entre plusieurs solutions.

Conclusion et perspectives sur le système microfluidique

Dans cette partie, nous avons décrit la plateforme expérimentale et le fonctionnement de la tête d'impression. L'utilisation couplée de la modélisation numérique et d'expériences nous a permis d'effectuer une preuve de concept de la fonctionnalité microfluidique et des capacités de confinement de la tête d'impression. Nous avons pu caractériser les paramètres expérimentaux principaux permettant de garantir le fonctionnement. Cette investigation nous a permis de réaliser les études suivantes.

- Optimisation des paramètres géométriques de la tête d'impression pour garantir un effet de confinement hydrodynamique en déplacement : par l'utilisation de simulations numériques, nous avons pu éviter des étapes successives de création de têtes d'impression et d'expériences de caractérisation. Nous avons implémenté plusieurs structures dont les plus importantes sont une couronne et une gorge permettant un haut taux de récupération de la solution injectée et une vitesse satisfaisante du fluide injecté dans la zone de polymérisation. Le dôme de PDMS a aussi été caractérisé et un équilibre entre sa fonction protectrice et son influence hydrodynamique a été trouvé.
- Impact de la viscosité du fluide injecté : nous avons réalisé une étude autour de plusieurs viscosités, dans un cas d'école, puis dans un cas réel, pour estimer l'impact de la viscosité du fluide injecté dans un fluide environnant. L'augmentation de la viscosité peut conduire à un taux de récupération diminué. Nous avons réalisé une étude avec plusieurs viscosités pour estimer l'ampleur de cette question puis choisi un modèle avec une viscosité à 8.5 mPa.s, représentant notre système, pour les études suivantes. Cette plateforme est optimisée pour des fluides à faibles viscosités (≤ 10 mPa.s) mais il serait intéressant de l'adapter pour des fluides plus visqueux (≤ 250 mPa.s). Nous gardons cet axe en perspective de l'étude microfluidique.
- Impact des paramètres d'impression sur le confinement et la vitesse du fluide : nous avons pu étudier l'impact de la hauteur, du rapport des débits et de la vitesse de déplacement sur la capacité de récupération de la solution injectée. Une faible hauteur, grande vitesse et un grand rapport de vitesse permettent un bon taux de récupération. Cette étude a fourni un diagramme de phase permettant à un utilisateur de la plateforme 3D-FlowPrint de se situer dans des conditions hydrodynamiques favorables dans le cadre d'une impression.
- Détermination du temps d'injection pour le lavage et l'injection séquentielle : Par une étude expérimentale, nous avons mesuré le temps de changement entre deux solutions équivalentes dans le cas d'une impression multimatériaux séquentielle. Nous avons aussi estimé le temps de rinçage par une solution à faible viscosité comme du milieu de culture.

Ces simulations ont aussi permis d'établir des conditions d'impression dans lesquelles le confinement de la solution injectée est conservé sans contamination du fluide environnant. Ces résultats ont été pris

en compte pour l'impression de structures, décrits dans les chapitres suivants. À ce stade du développement, nous avons pu valider un dispositif microfluidique fonctionnel capable de délivrer localement et précisément un hydrogel d'intérêt. Le prochain chapitre permettra de valider la fonctionnalité de la tête d'impression en validant les capacités de photopolymérisation dans des conditions d'écoulement du matériau.

Chapitre 5

Photopolymérisation sous écoulements microfluidiques

5.1	Caractérisation optique et contrôle du faisceau laser	112
5.1.1	Étude de l'impact du générateur de basse fréquence en modulation du laser	112
5.1.2	Caractérisation du faisceau lumineux	114
5.1.3	Tête d'impression intégrant deux fibres optiques pour l'impression multirésolutions	115
5.2	Aspects physico-chimiques du processus de la photopolymérisation	117
5.2.1	Développement de formulations à base de PEGDA	117
5.2.2	Développement de formulations à base de GelMA	118
5.2.3	Choix du photo-initiateur	120
5.2.4	Détermination des paramètres d'insolation pour les formulations à base de PEGDA et GelMA	120
5.2.5	Contrôle de l'adhésion des matériaux photopolymérisés durant l'impression	122
5.3	Dose seuil, largeur de ligne imprimée, résolution et temps d'impression	124
5.3.1	Approche théorique	124
5.3.2	Étude expérimentale	126
5.3.3	Estimation des temps d'impression	128
5.4	Influence de structures préexistantes sur l'impression	130
5.4.1	Impression en flux en présence de structures réticulées	130
5.4.2	Analyse des simulations	130
5.5	Influence de la transparence des matériaux	131
5.5.1	Modèles de polymérisation frontale	132
5.5.2	Analyse numérique d'une potentielle polymérisation frontale dans le cas de 3D-FlowPrint	133
5.6	Création de pièces 2D, 2.5, 3D et multimatériaux	134
5.6.1	Objets 2D en PEGDA et GELMA et caractérisation de la résolution d'impression	134
5.6.2	Impression de structures 2.5 D monocouche	137
5.6.3	Impression de structures 3D multicouches	138
5.6.4	Impression multimatériaux	140

Ce chapitre a pour ambition de démontrer la faisabilité de la photopolymérisation en flux et de caractériser les paramètres principaux de l'impression liés notamment aux aspects optiques. Dans ces objectifs, nous avons utilisé deux types d'hydrogels photosensibles le PEGDA et le GelMA qui sont très largement employés dans le domaine de l'impression 3D et de la bioimpression. Nous présenterons dans un premier temps les caractéristiques physico-chimiques de ces matériaux et les protocoles mis en place pour la caractérisation de leur mise en forme par photopolymérisation. Nous présenterons ensuite la méthodologie et les études quantitatives des paramètres optiques principaux impliqués dans le procédé d'impression. Ce chapitre s'intéressera également à deux aspects importants de l'impression liés à l'impact de la présence de structures préexistantes à l'impression et aux mécanismes d'adhésion qui peuvent apparaître dans le cas de la photopolymérisation de certaines formulations. Enfin, une caractérisation des paramètres d'impression et de leur impact sur les performances du procédé d'impression notamment en termes de dimensions et de résolutions, sur des structures 2D, 2,5 puis 3D conclura ce chapitre.

5.1 Caractérisation optique et contrôle du faisceau laser

Dans cette partie, nous développons notre stratégie d'impression d'hydrogels grâce au contrôle de l'intensité du faisceau lumineux et de la dose d'impression par notre plateforme expérimentale décrite au chapitre 2.1.3.

5.1.1 Étude de l'impact du générateur de basse fréquence en modulation du laser

Etude de l'influence du rapport cyclique sur la discrétisation des impressions Le laser est commandé *via* un boîtier *Laserboxx* d'Oxxius. La source laser émet un faisceau monochromatique à 405 nm avec une puissance ajustable entre 5 mW et 120 mW, avec une zone de contrôle linéaire entre 10 mW et 100 mW (mode APC). La lumière est ensuite convoyée par une fibre optique lentillée (BL-5, high power single mode 405 nm fiber de WT&T). La forme du faisceau optique dans la zone de polymérisation sera détaillée dans la partie suivante.

La puissance de sortie du laser est généralement trop élevée pour la majorité de nos formulations. Nous avons donc ajouté un Générateur Basses Fréquences (GBF, Keysight 33509B) pour contrôler par impulsion le temps d'allumage du faisceau laser dans le temps et moduler la puissance émise par un ajustement du rapport cyclique (Duty Cycle DC). Cette modalité est utile pour atténuer les potentielles non-linéarités du contrôleur laser lorsqu'il est utilisé en continu. Le GBF émet des signaux périodiques carrés entre 0 et 5 volts à la fréquence f . Le rapport cyclique détermine le rapport temporel entre les périodes d'allumage et d'extinction du faisceau. Par exemple, pour un signal $f = 1$ kHz, $DC = 25\%$, le GBF émettra à 5 V pendant 0.25 ms puis à 0 V pendant 0.75 ms. Ainsi la puissance du laser varie linéairement avec DC.

Il est pertinent de comparer le temps typique d'extinction avec les temps caractéristiques de déplacement de la tête. Pour une vitesse de déplacement V , la distance parcourue par la tête entre deux impulsions est $d_{pulse} = \frac{v}{DC}$. Si l'on considère une gamme de vitesse de 0.05 à 0.8 mm/s, un rapport cyclique de 25%, une fréquence de travail de 1kHz, nous obtenons des distances comprises entre 0.05 à 0.8 μm . Compte tenu de la résolution typique d'impression (de plusieurs micromètres), nous pouvons considérer que l'impact de la modalité d'allumage sur l'homogénéité des structures est négligeable.

Mesure de la puissance optique au niveau de la tête et de la linéarité Nous avons mesuré la puissance de sortie en bout de fibre P_{out} , puis nous l'avons comparée à la puissance de consigne P_{in} et à la valeur du rapport cyclique DC . La relation dépend du facteur de perte de puissance entre l'émission et le capteur $k_{transmission}$ et du facteur de non-linéarité de l'émetteur laser k_{laser} .

$$P_{out} = k_{transmission} \cdot k_{laser} \cdot DC \cdot P_{in} \quad (5.1)$$

La puissance de sortie est mesurée *via* une sonde S170C (photodiode en silicium) et un module PM200 de Thorlabs à 1 cm de la sortie de la fibre optique. Les figures 5.1A-B présentent la puissance mesurée en sortie en fonction de la puissance d'entrée, du rapport cyclique et de la fréquence. La figure 5.1.C présente le rapport de transmission $k_{transmission} \cdot k_{laser}$ pour différentes valeurs de puissance et rapports cycliques. Les courbes expérimentales montrent une dépendance linéaire vis à vis de la puissance.

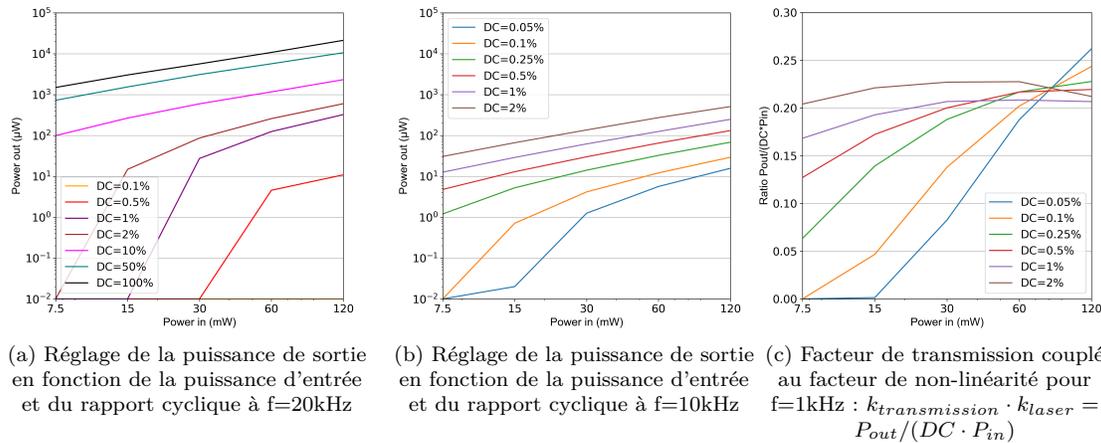


FIGURE 5.1 – Évolution de la puissance optique mesurée dans la zone d'impression en fonction du rapport cyclique et de la modulation de puissance du laser (Oxxius, 405nm)

Nous avons observé un seuil d'émission en puissance et en rapport cyclique. À 20 kHz, nous voyons par exemple qu'aucun signal n'est mesuré pour $DC = 0.1\%$ quelle que soit la puissance, et que pour $DC = 1\%$, un signal est mesuré seulement pour $P_{in} \geq 30\text{ mW}$. Ces impulsions durent respectivement 50 ns et 500 ns, des temps trop courts pour l'émetteur laser.

En réduisant la fréquence, les impulsions sont plus longues et le rapport cyclique peut être abaissé afin d'obtenir un seuil d'émission plus bas. La fréquence n'impacte pas sur la puissance de sortie. À 1 kHz, le contrôleur laser est capable d'émettre à de plus faibles couples puissances - rapports cycliques. Un seuil est atteint avec une puissance de sortie de $0.7\text{ }\mu\text{W}$ pour $P_{in} = 15\text{ mW}$ et $DC = 0.1\%$. Abaisser la fréquence laisse apparaître le risque d'une polymérisation discrète comme présenté précédemment.

En mesurant les facteurs $k_{transmission} \cdot k_{laser}$ sur la figure C, nous observons que bien que certaines valeurs semblent linéaires dans les graphes A et B (par exemple à $f = 1\text{ kHz}$, les courbes rouge, violette et marron), la réponse a une grande variabilité ($k_{transmission} \cdot k_{laser} = [13\%-23\%]$). Nous pouvons observer une zone de quasi-linéarité entre 0.20 et 0.23 principalement atteinte pour les hautes valeurs de puissance et de rapports cycliques. En estimant que $k_{transmission}$ est constant, nous pouvons estimer sa valeur à 22% au point de concordance des courbes dans la figure C. Le reste des variations est, nous estimons, dû à k_{laser} .

Nous avons déterminé un régime de fonctionnement linéaire du laser à $f = 1\text{ kHz}$, $DC \geq 1\%$ et $10\text{ mW} \geq P \geq 100\text{ mW}$. Dans cette gamme, le contrôle par P_{in} et DC permet d'obtenir une puissance de sortie linéaire en extremum de $29\text{ }\mu\text{W}$ à 21 mW , soit sur trois ordres de grandeur environ. En dehors du régime linéaire, ce système permet d'obtenir une puissance de sortie minimum de $0.7\text{ }\mu\text{W}$.

Notons qu'il est aussi possible de modifier l'intensité de l'émission laser par le biais d'une tension continue en modulant sa valeur nominale. La valeur de cette tension sur l'échelle 0 - 5 V détermine le facteur de modulation. Une tension de 1 V induit un facteur de diminution de 80%. Néanmoins, cette méthode permet d'atteindre un seuil d'émission moins bas. Il est possible que le coefficient modifie directement la commande d'intensité du laser sur l'échelle primaire de 5 mW à 120 mW. Alors, en choisissant un facteur 1000 de diminution et $P_{in} = 15\text{ mW}$, comme dans l'exemple plus haut, l'émetteur devrait en fait fournir un signal continu de 0.015 mW ce qui est en dehors de sa gamme. Cette méthode ne permet donc pas de diminuer le seuil de puissance émise.

Dans cette première partie, nous avons rappelé le montage optique, démontré l'utilité du GBF pour atténuer l'intensité du laser sans affecter les impressions et étudié la linéarité de l'intensité du faisceau d'impression. Nous avons ensuite étudié la puissance émise ainsi que la distribution spatiale de la lumière en sortie de fibre optique.

5.1.2 Caractérisation du faisceau lumineux

Caractérisation forme du faisceau optique Le flux de lumière issu du laser est acheminé *via* une fibre optique lentillée (*WT&T*, Canada). Cette fibre (high power single mode 405 nm fiber, coeur de 56 μm) est certifiée pour obtenir une largeur au point focal de 10 μm distant à 200 - 3000 μm de la lentille. Nous avons souhaité caractériser le profil du faisceau lumineux dans la zone de polymérisation.

Pour cela, nous avons utilisé une surface semi-transparente fluorescente *Daffodil 310 Roscolux* qui absorbe à 405 nm et ré-émet dans le vert. Ces expériences ont été réalisées grâce à un cube de microscopie par fluorescence FITC qui permet de bloquer la lumière issue du faisceau incident et d'observer en transmission l'émission seule de la surface. La fibre optique étant fixée sur une platine de translation suivant l'axe Z, nous obtenons la coupe du faisceau laser à différentes distances de la fibre optique (voir Fig. 5.2.A). Le protocole n°16, p.183 est détaillé en annexe.

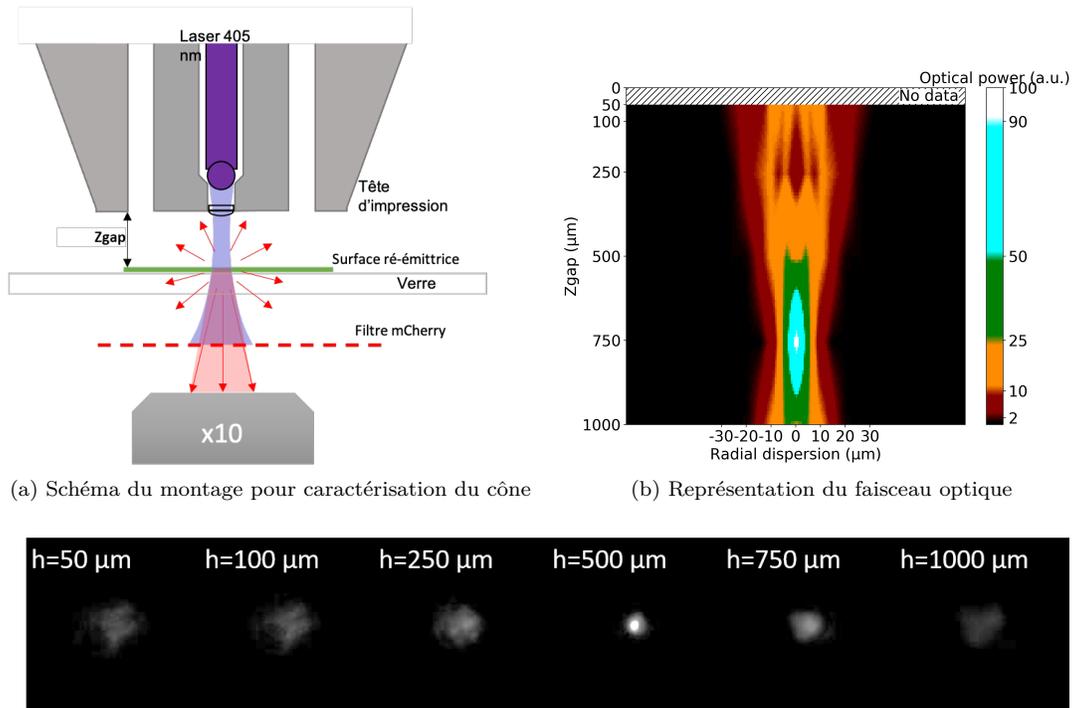


FIGURE 5.2 – Caractérisation du faisceau optique

Un code python développé pendant la thèse permet d'analyser ces images et de retranscrire leurs informations dans un graphique contenant les informations radiales (axe X, distance au centre du faisceau) et longitudinales (axe Z, distance à la fibre). Le code est accessible par demande à l'équipe. Ce programme nommé *Afficher faisceau optique spot laser* prend en entrée les images mesurées à différentes hauteurs. Il ouvre chacune de ces images, détecte le centre de la gaussienne optique et supprime le bruit de fond (voir Fig. 5.2.C). Ensuite, pour chaque image, le logiciel permet d'extraire l'intensité en fonction de la distance au centre de la gaussienne en moyennant de manière radiale. Puis, le programme réalise une reconstruction des profils d'intensité dans le plan XZ en interpolant entre chaque coupe du faisceau. Cette méthode permet d'obtenir une cartographie de l'intensité du faisceau depuis le centre de la gaussienne en X et depuis la fibre en Z. La couleur de chaque pixel est

la variable de sortie, du blanc à 100% de la puissance à noir à 0% en dehors du faisceau. Les valeurs sont normalisées. Un exemple est fourni sur la figure 5.2.B.

Analyse de la forme du faisceau optique Pour une fibre nue, nous observons un profil de faisceau focalisé : le diamètre du faisceau diminue depuis la fibre optique ($Z = 0 \mu\text{m}$) vers un minimum au point de focalisation puis s'élargit à nouveau. Nous voyons un point focal à $750 \mu\text{m}$ de la lentille de $7 \mu\text{m}$ (mesure par à la mi-hauteur de la puissance maximale, *Full Width Half Maximum*, *FWHM* en anglais). Autour du point de focalisation, nous mesurons une dispersion assez faible de la taille du faisceau le long de l'axe optique. Nous avons évalué une dispersion du diamètre jusqu'à $11 \mu\text{m}$ à $250 \mu\text{m}$ du point focal soit une dispersion angulaire de 0.46° .

À 25% de la puissance maximale du faisceau (en vert sur l'image 5.2.B), nous observons un faisceau d'environ $10 \mu\text{m}$ de large et long de $500 \mu\text{m}$, entre 250 et $750 \mu\text{m}$ de la fibre. Cela veut dire que si le seuil de polymérisation est atteint à cette puissance, le faisceau permet la polymérisation d'un objet de manière régulière dans l'axe Z sur $500 \mu\text{m}$. Nous considérons donc que le faisceau est homogène sur cette longueur.

Nous avons réalisé des mesures similaires avec la fibre optique insérée dans une tête d'impression avec le faisceau traversant la lamelle de verre et le PDMS. Les résultats étaient comparables et ont prouvé que ces interfaces n'affectaient pas le profil du faisceau laser (voir Fig. 3.15 dans le chapitre sur les têtes d'impression).

Maintenant qu'une fibre est caractérisée, il faut créer des têtes d'impression adaptées afin d'obtenir le diamètre de faisceau optique désiré à l'extrémité de la tête. En bloquant la fibre dans le canal optique avec un épaulement créé lors de l'impression 3D des têtes, nous pouvons choisir la distance entre la lentille et l'extrémité de la tête, donc la largeur du faisceau au point de polymérisation. La fibre n'est donc pas en contact avec la lamelle de verre, mais généralement espacée de quelques centaines de micromètres.

Prenons par exemple la caractérisation ci-dessus : il s'agit d'une fibre de diamètre $10 \mu\text{m}$ au point focal à $750 \mu\text{m}$ de distance de la lentille, avec une profondeur d'homogénéité de $250 \mu\text{m}$ avant et après le point focal (en considérant un seuil à 25% de la puissance). Afin de pouvoir polymériser à haute résolution, il faut que le spot optique ait ce diamètre dès l'extrémité de la tête. Nous bloquons la fibre à $500 \mu\text{m}$ de l'extrémité de la tête avec un épaulement. Dans l'exemple, le faisceau optique mesurera $10 \mu\text{m}$ depuis l'extrémité de la tête jusqu'à $500 \mu\text{m}$ de distance.

Nous pouvons aussi décaler la fibre afin de la positionner hors du point focal. En bloquant cette fibre à $0 \mu\text{m}$ (ou au contraire à $1500 \mu\text{m}$), le faisceau mesure $37 \mu\text{m}$ (FWHM) à l'extrémité de la tête. Cela nous permet de polymériser des motifs plus gros, et donc de gagner en vitesse volumétrique. Nous développons ce point dans la partie suivante.

Nous avons observé une variabilité sur la forme du spot optique lors de changement de têtes et de fibres. Entre autres, le diamètre du spot peut varier, ce qui influe sur la puissance surfacique et sur la dose reçue par les matériaux. Nous avons observé des variations au maximum de l'ordre d'un facteur 2. Cette variabilité peut provenir de la reproductibilité de l'assemblage des têtes (alignement de la lamelle de verre, volume de la couche de PDMS), de l'alignement de la fibre et de son positionnement dans la tête d'impression. Enfin, des paramètres externes, liés au vieillissement des matériaux et à leur contamination de surface peuvent influencer la taille et l'intensité du spot. Il s'agit de pistes d'amélioration que nous gardons en perspective pour augmenter la reproductibilité de la plateforme. Lors de l'impression, la vérification des paramètres d'écritures (voir protocole n°8, p.177 et n°10, p.179) sont nécessaires. Cela peut nous amener à compenser les pertes d'intensité par un ajustement de la puissance d'entrée ou de la vitesse de déplacement jusqu'à un facteur 2.

5.1.3 Tête d'impression intégrant deux fibres optiques pour l'impression multirésolutions

Pour plus de versatilité de la plateforme d'impression, nous avons choisi d'insérer une seconde fibre optique dans certaines têtes d'impression. La fabrication par impression 3D des têtes par stéréolithographie haute résolution est particulièrement avantageuse, car elle permet d'adapter facilement le design et rend possible ce type d'intégration. Notre motivation est de démontrer la possibilité d'utiliser sur une même tête d'impression des faisceaux lumineux de longueurs d'onde différentes ou, comme nous le verrons dans ce chapitre, la possibilité de réaliser des impressions avec différentes tailles de

faisceaux. Un faisceau de faible dimension peut être utilisé pour réaliser les structures nécessitant une haute résolution. Un faisceau plus large permet d'imprimer des objets demandant moins de précision avec une vitesse volumétrique plus élevée. La possibilité de pouvoir sous-diviser un échantillon en zones d'impression et d'adapter la résolution d'impression au motif permet un gain de temps significatif dans l'impression.

Dans cette perspective, nous avons choisi de garder une seule source laser et un seul type de fibre. Pour permettre l'utilisation de deux tailles de faisceaux, nous bloquons les deux fibres à deux distances différentes dans la tête d'impression. Une des deux fibres a son faisceau laser focalisé à la sortie de la tête pour des impressions haute-résolution, et la deuxième fibre est défocalisée dans la zone de polymérisation pour des impressions basse résolution. Une fois de plus, c'est le choix de la création des têtes par impression 3D qui permet le positionnement précis des fibres dans la tête et la programmation des tailles de faisceaux.

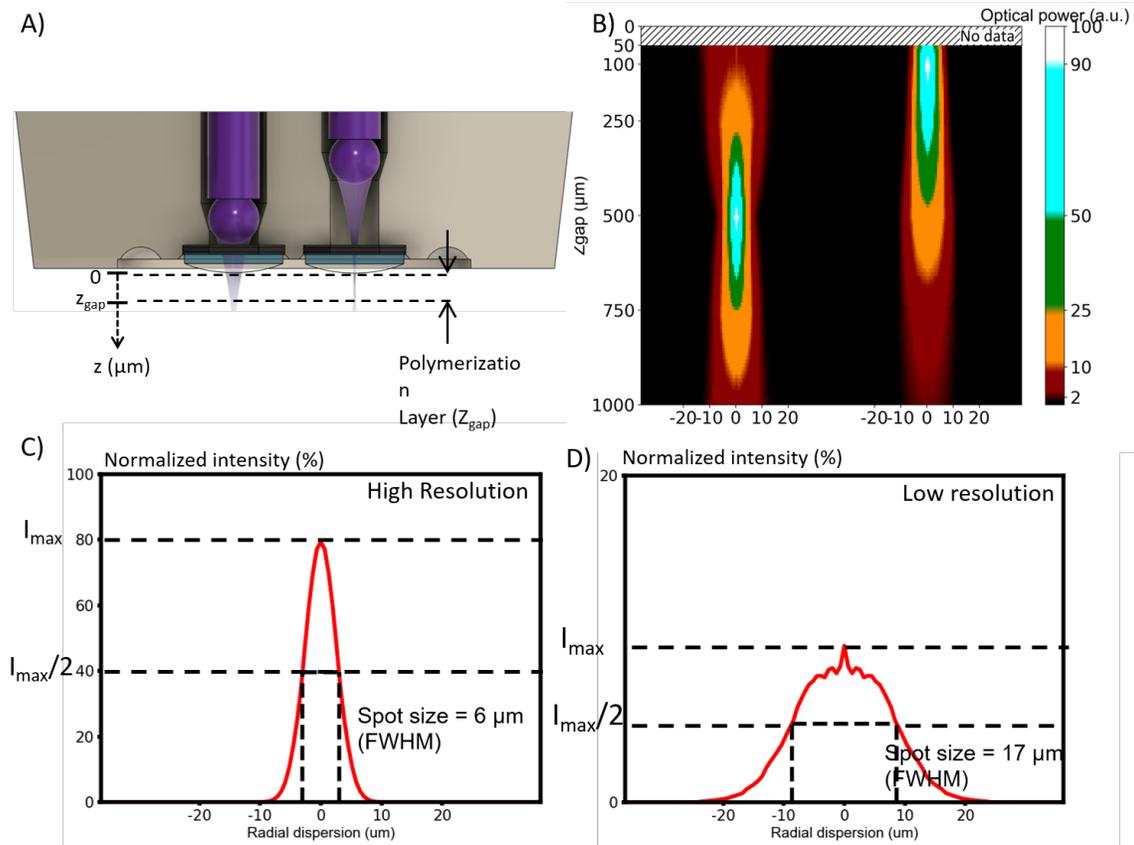


FIGURE 5.3 – Impression avec deux fibres pour imprimer en multirésolutions. A) Schéma d'une tête avec deux fibres bloquées à deux distances pour créer deux largeurs de spots à la hauteur de polymérisation. B) Représentation graphique des deux cônes optiques. C et D) profils optiques à 50 μm de l'extrémité de la tête pour les deux fibres avec les largeurs à mi-hauteur.

Dans la figure 5.3.A, nous pouvons voir un schéma d'une tête avec deux fibres. Leurs faisceaux optiques sont représentés côte à côte sur la figure 5.3.B. Cette image a été obtenue après analyse expérimentale et traitement d'image avec le programme Python présenté ci-dessus. Nous observons que la distance focale est très différente dans les deux cas, avec une première située à 500 μm de l'extrémité de la tête et la deuxième focalisée à 100 μm de l'extrémité de la tête. Si l'on considère une distance tête - substrat $Z_{\text{gap}} = 100 \mu\text{m}$, nous pouvons mesurer un diamètre de faisceau entre la zone de polymérisation ($Z = 50 \mu\text{m}$) de 6 μm et 17 μm respectivement (voir Fig. 5.3.C-D).

Dans la perspective d'une impression multirésolutions nous avons configuré la plateforme avec une seule source laser et deux fibres optiques toutes deux connectées à un commutateur optique 1 \rightarrow 2 (FFSW-122000323-MD, Laser Components). Le laser émet dans une fibre optique qui rentre dans le commutateur. Par commande informatique, nous pouvons définir laquelle des deux fibres optiques en

sortie du commutateur sera sollicitée.

Afin de pouvoir exploiter cette capacité d'impression, l'interface logicielle a été modifiée pour prendre en compte une variable *fibre optique* qui permet au logiciel de sélectionner la ligne optique adaptée à la résolution d'écriture choisie (voir partie 2.3.3). Le vectoriseur, que nous avons pu développer, prend aussi cette possibilité dans ses paramètres. Il est capable de déterminer des zones basse résolution, au centre de l'objet et des zones haute résolution, pour les motifs en surface. Il s'agissait d'une des capacités rendant nécessaire le développement d'un nouveau vectoriseur (voir partie 2.3.2. Ces développements nous ont permis de valider l'impression multirésolutions et sont caractérisés dans la partie 5.3.3.2.

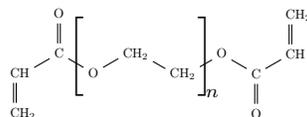
Dans cette partie, nous avons caractérisé le faisceau optique et détaillé le processus d'optimisation du diamètre du faisceau. Dans la partie suivante, nous étudions la chimie des polymères en jeu dans cette plateforme afin de pouvoir combiner lumière et matière dans la troisième partie de ce chapitre.

5.2 Aspects physico-chimiques du processus de la photopolymérisation

Dans cette partie, nous étudions les aspects réactionnels impliqués dans la photopolymérisation et leurs impacts sur le processus de bioimpression. Nos développements se sont appuyés sur deux hydrogels, le PEGDA et le GelMA, que nous avons combinés à un photo-initiateur de référence, le LAP (Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate). Nous présenterons tout d'abord les modalités de réticulation de ces matériaux. Nous aborderons ensuite les problématiques d'adhésion des matériaux polymères avec le substrat et avec la tête d'impression chacun d'eux ayant nécessité des développements et traitements de surface spécifiques.

5.2.1 Développement de formulations à base de PEGDA

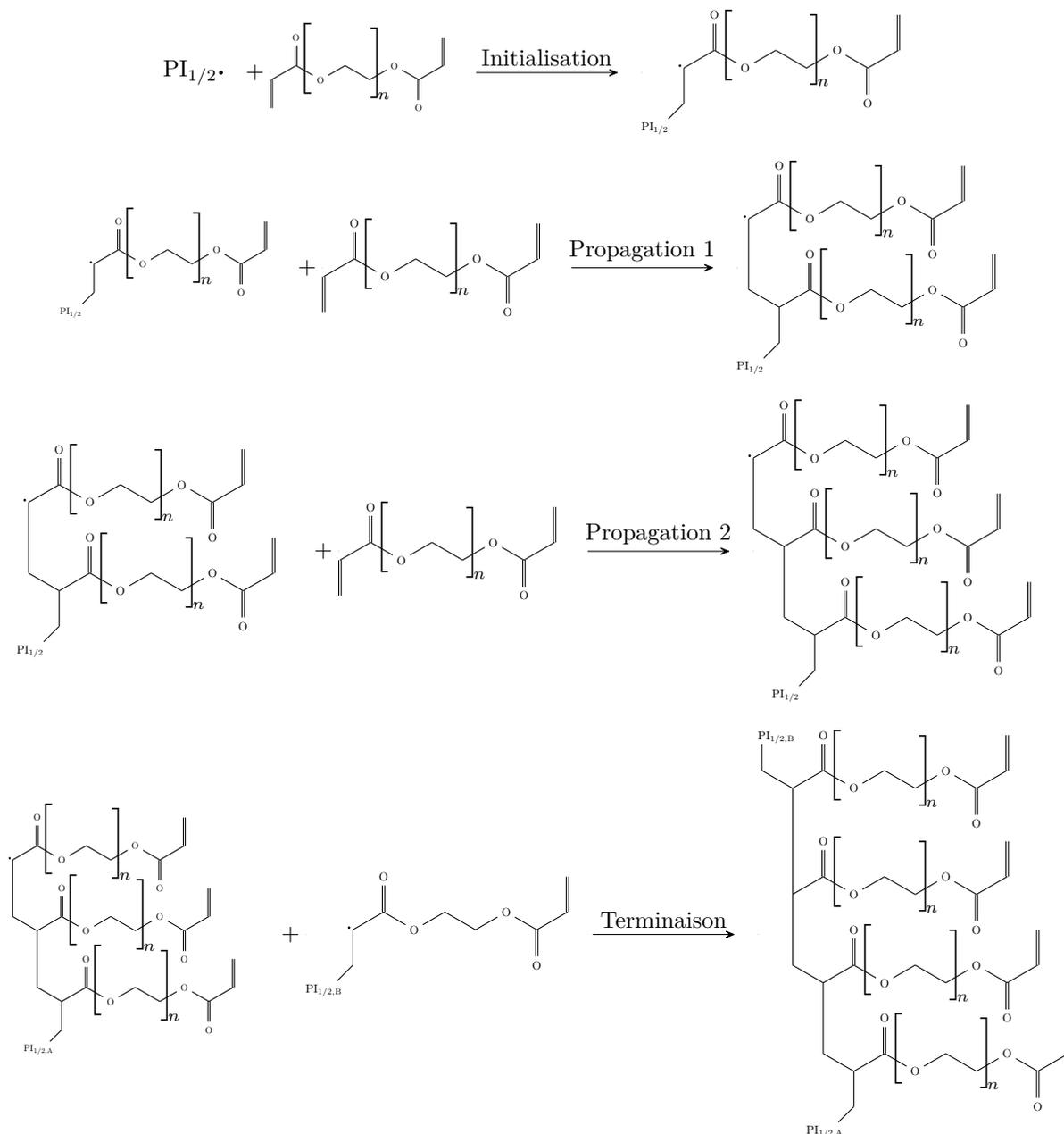
Le Polyéthylène Glycol Diacrylate a été utilisé dans la quasi-totalité de nos expériences de caractérisation et de preuve de concept. Ce matériau synthétique est très largement utilisé dans le domaine de la microfluidique,²⁵⁰ de la bioimpression,^{251,252} mais aussi de la biofabrication.^{253,254} Le PEGDA est un polyéther d'origine synthétique biocompatible, de formule :



Le protocole de préparation des solutions de PEGDA est décrit dans cette rubrique (voir protocole n°2, p.174). Plusieurs masses moléculaires sont accessibles commercialement pour le PEGDA. La longueur de la chaîne influe sur les propriétés mécaniques du matériau, sa porosité et sa viscosité à l'état liquide. Des longues chaînes (> 2000 g/mol) sont privilégiées dans de nombreuses expériences de bioingénierie mais leur forte viscosité et leur faible tenue mécanique sont des limitations importantes dans notre approche (viscosité = {36.4, 126.5} mPa.s pour des poids moléculaire de {3350, 8000} g/mol dilués dans de l'eau déionisée à 40% m/m à 25°C²⁵⁵). Les chaînes trop courtes (≤ 375 g/mol) conduisent à des matériaux trop durs avec lesquels la plupart des cellules n'auront pas d'affinité. Dans nos expériences, nous avons principalement utilisé du PEGDA 700, ce qui équivaut environ à 13 motifs de monomères (8.5 mPa.s à 40% en solution aqueuse²⁴¹).

La polymérisation est initiée par l'activation sous insolation d'un photo-initiateur qui génère des radicaux (voir partie 5.2.3). Dans l'initiation de la réaction, l'activation par photoclivage du photo-initiateur permet la création de précurseur radicalaire. Cette espèce interagit avec la chaîne de PEGDA, produisant un centre radicalaire sur la double liaison C=C de la molécule de PEGDA comme présenté dans le schéma ci-dessous (avec PI_1 , une moitié du photo-initiateur).¹⁴⁷ Ce centre radicalaire peut interagir avec une nouvelle chaîne de PEGDA créant une liaison covalente entre les chaînes et la réaction peut se poursuivre sur une nouvelle chaîne. Lorsque deux centres radicalaires se rencontrent, une

liaison C-C est créée et met fin à la réaction. Le mécanisme décrit est une terminaison par combinaison, il est aussi possible de terminer la réaction par dismutation ce qui n'est pas montré sur les schémas ci-dessous. Chaque groupe acrylate permet donc de réaliser deux liaisons avec d'autres molécules. Le PEGDA ayant un groupement acrylate à chaque extrémité, il peut se fixer sur quatre molécules. Sur les schémas ci-dessous, les réactions n'ont lieu que d'un côté des molécules. Évidemment, l'arrangement des molécules est en trois dimensions et non planaire.



5.2.2 Développement de formulations à base de GelMA

Dans la perspective de valider la plateforme 3D-FlowPrint, nous avons choisi d'utiliser la Gélatine Méthacrylate (GelMA) qui est un matériau très largement utilisé dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.^{237, 256-258} Le PEGDA sans modification, ne permet pas l'adhésion cellulaire, n'est pas adapté à l'encapsulation de cellules et n'est pas dégradé in vivo. Au contraire, le GelMA est couramment utilisé comme un modèle de matrice dégradable. Le GelMA est dérivé de la gélatine, un produit de la dégradation du collagène. La gélatine est un polymère hydrophile naturel produit à partir de l'hydrolyse et de la dénaturation du collagène à haute température. La gélatine possède une série d'avantages,

notamment une bonne biocompatibilité, une bonne solubilité, une bonne dégradabilité et est largement disponible commercialement (gélatine de porc, bœuf, poisson ou humaine). La gélatine conserve la séquence peptidique arginine-glycine-acide aspartique (RGD) qui favorise certains comportements cellulaires (tels que l'adhésion, la prolifération et la différenciation)^{259,260} et une séquence de dégradation de la métalloprotéinase matricielle (MMP) qui favorise l'adhésion des cellules par dégradation enzymatique.

Le GelMA est obtenu par synthèse et greffage de groupements méthacrylates sur les groupes amines et alcools de la gélatine (voir Fig. 5.4). Cette étape a été réalisée et optimisée dans le laboratoire par G. Eke et D. Ferri-Angulo sur la base d'un article de Shirahama *et al.*²⁴⁵ avec de la gélatine type A (90-110g bloom). Les synthèses réalisées au sein du laboratoire nous permettent de produire du GelMA en conditions stériles et d'atteindre un degré de substitution de 88% (Caractérisation par RMN). En comparaison du PEGDA, de par sa nature physico-chimique et le faible nombre de sites réactionnels accessibles pour la réticulation (voir Fig. 5.4), le GelMA offre des rigidités plus faibles.²⁶¹⁻²⁶³ Des collaborateurs internes (G. Eke et V. Mansard) ont mesuré le module d'Young à différentes concentrations. Lorsque la polymérisation totale est atteinte, ils ont mesuré $E = 9.5, 37, 73$ kPa pour des concentrations respectives de 10%, 15% et 20%. Ces mesures ont été réalisées par compression (système Mark 10) sur des échantillons cylindriques de 5mm · 8mm réticulés à 405 nm (FormCure, Formlabs).

Une solution aqueuse de GelMA a une viscosité variable en fonction de la température et de sa concentration en polymère (voir partie 4.1.2.1. Pour des concentrations de GelMA à 10% dans l'eau déionisée, la viscosité est de l'ordre de 120 mPa.s à 40 °C. Le GelMA a un coefficient d'absorbance $\epsilon = 0.69 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol/l}^{-1}$ (mesuré à 20% en masse par volume, sur 1 cm, avec une machine *NanoDrop* de *Thermo Scientific*). Pour une épaisseur de 1 mm (distance maximale de polymérisation avec la plateforme 3D-FlowPrint), la transmittance est de 97%. Le protocole de préparation des solutions est détaillé lors de la description des méthodes d'une impression (voir protocole n°2, p.174).

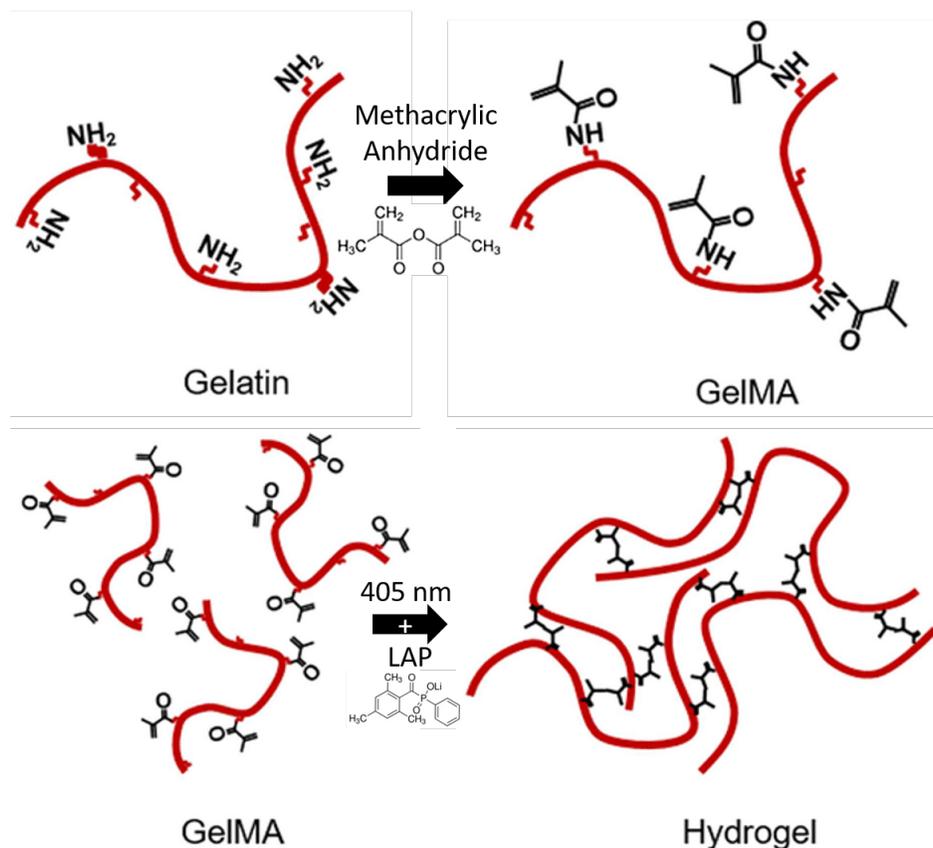
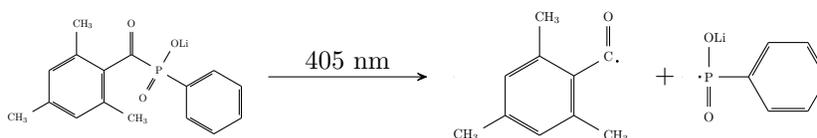


FIGURE 5.4 – Illustrations des étapes essentielles du protocole permettant la synthèse du GelMA à partir de gélatine et de sa réticulation par photopolymérisation.

5.2.3 Choix du photo-initiateur

Les photopolymérisations radicalaires sont initiées par la combinaison d'une irradiation avec des longueurs d'onde de lumière appropriées et la présence d'une espèce spécifique qui absorbe cette lumière. L'espèce absorbante se décompose alors, ou facilite la décomposition d'une espèce en radicaux qui initient la polymérisation. Une large gamme de photo-initiateurs a été présentée dans la littérature pour l'initiation de réaction radicalaire.^{264,265} Dans le domaine de la bioingénierie, une grande majorité de photo-initiateurs sont activés par des UVs, comme la gamme Irgacure qui a été majoritairement utilisée.

En comparaison de ces photo-initiateurs, le LAP offre des avantages pour la bioimpression. Il dispose d'une bonne solubilité dans des solutions aqueuses, il peut être photo-activé jusqu'à des longueurs d'onde de 425 nm et montrent une cytotoxicité réduite.⁸¹ Au-delà de la compatibilité avec une large gamme de système de lithographie et stéréolithographie qui utilisent des sources à 405 nm, l'activation dans les longueurs d'onde du visible permet de réduire l'impact sur la viabilité cellulaire, notamment les dégâts causés à l'ADN.⁷² Le LAP a donc souvent été préféré. L'influence de la concentration en LAP sur la viabilité est caractérisée dans la partie 6.3.0.6.



L'usage de longueurs d'onde proche du visible à 405 nm plutôt que d'UV permet de limiter les potentiels dommages direct à l'ADN.⁷⁰⁻⁷³ Malgré ce faible impact de la lumière à 405 nm, certaines équipes ont préféré travailler dans des longueurs d'onde plus élevées avec des photo-initiateurs, comme la camphorquinone,²⁶⁶⁻²⁶⁸ l'éosine-Y,^{150,269} la fluoresceine,²⁶⁶ la riboflavine²⁶⁶ et le rose Bengal,²⁷⁰ comme reporté par Lim *et al.*²⁷¹

5.2.4 Détermination des paramètres d'insolation pour les formulations à base de PEGDA et GelMA

Détermination des doses nécessaires à la polymérisation du PEGDA Nous avons d'abord caractérisé le seuil de polymérisation du PEGDA avec une source de lumière collimatée (aligneur de masques Suss MA-6 Gen4, 21 mW/cm², 405 nm) qui offre une densité optique homogène. Bien que cette approche ne reproduise pas les conditions d'illumination de la plateforme de bioimpression qui repose sur l'utilisation d'un faisceau ponctuel avec un profil d'énergie gaussien et donc des cinétiques de réactions différentes, cette approche nous a permis de caractériser la photo-polymérisation sur un grand nombre d'échantillons. Cette étude permet donc d'établir une base de réflexion, mais les valeurs de doses extraites ne sont pas transférables directement au système 3D-FlowPrint.

Nous avons polymérisé la solution avec différentes concentrations en polymères et en LAP. Nous avons injecté des volumes définis (0.37 ml) de solution photopolymérisable dans des puits de plaques de culture de 96 puits, chacun recouvert d'une lamelle. Après l'insolation, nous avons évalué qualitativement le degré de réticulation du matériau par observation. (Fig. 5.5.A-C). Le protocole n°17, p.185 est détaillé en annexe.

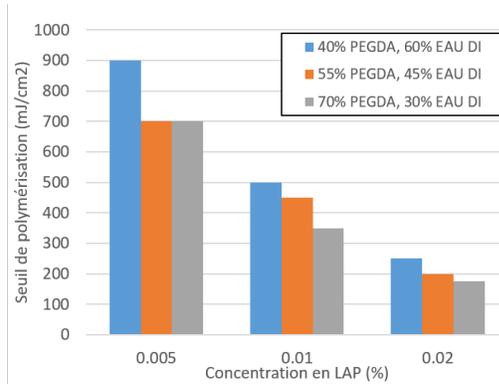
Pour le PEGDA, nous avons pu déterminer un seuil de polymérisation de l'ordre 500 mJ/cm² pour une solution avec 40% de PEGDA 700, 60% d'eau DI et 0.01% de LAP (voir Fig. 5.5.B). Nous observons également que l'augmentation de la concentration en PEGDA ou en LAP conduit à une diminution de la dose seuil.

Cette étude préliminaire prouve que nous pouvons faire varier le couple dose - photo-initiateur pour assurer la photopolymérisation du matériau. Nous pourrions éventuellement adapter le temps de polymérisation, la puissance laser ou la concentration en photo-initiateur pour répondre à des contraintes de viabilité cellulaire (voir partie 6.3.0.6).

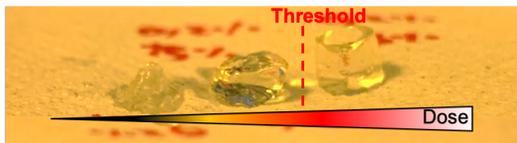
Détermination des doses nécessaires à la polymérisation du GelMA Nous avons aussi caractérisé la dose seuil de polymérisation du GelMA. Nous avons cette fois utilisé une lampe *Formcure* de la marque *Formlab* qui sert à surpolymériser aux UV des pièces d'impression 3D en SLA. Nous



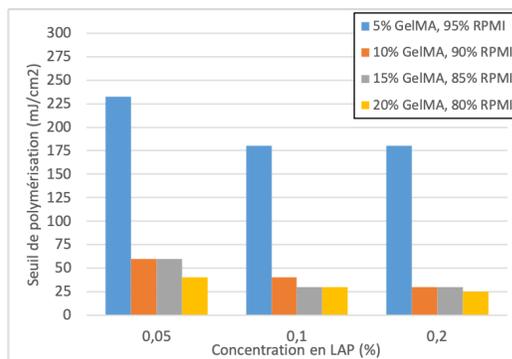
(a) Image de cylindres de PEGDA polymérisés avec lumière collimatée dans une plaque de 96 puits avec une dose croissante



(b) Graphique des valeurs de seuils de polymérisation en fonction des concentrations en PEGDA et en LAP



(c) Image de cylindres de GelMA polymérisés avec lumière collimatée dans une plaque de 96 puits avec une dose croissante



(d) Graphique des valeurs de seuils de polymérisation en fonction des concentrations en GelMA et en LAP

FIGURE 5.5 – Caractérisation du seuil de polymérisation du PEGDA et du GelMA avec une lumière collimatée

avons préféré ce modèle à l’aligneur de masque, que nous avons utilisé environ deux ans plus tôt, car il permet de réticuler les matériaux à des longueurs d’onde de 405 nm, similaire à la plateforme de bioimpression et à température contrôlée (37°C) permettant de conserver le GelMA liquide, condition requise lors de l’étape d’injection et nécessaire pour maintenir la viabilité cellulaire. Un cache est introduit dans l’enceinte afin de limiter la puissance émise au niveau du support à 0.665 mW/cm². En effet, comme nous le montrons ci-dessous, la puissance nominale de 5.5 mW/cm² induit des temps d’insolation de l’ordre de la seconde et donc difficiles à maîtriser. À titre de comparaison, la puissance est donc 30 fois plus faible qu’avec l’aligneur de masque MA-6 utilisé aussi à 405 nm pour le PEGDA.

Nous avons déterminé des doses de polymérisation pour des solutions de GelMA entre 5% et 20% de GelMA et 0.05% et 0.2% de LAP. Le polymère est dilué dans du milieu de culture RPMI. Nous n’y avons pas ajouté de SVF, ni de rouge de phénol alors que ces éléments sont des composants habituels des milieux de culture cellulaire. En effet, ils induisent des phénomènes d’absorption optique à 405 nm qui pourraient interférer avec la photo-polymérisation. À la fin d’une impression, l’objet est rincé avec du RPMI, puis une solution complète, avec SVF et rouge de phénol est rajoutée afin de permettre la prolifération des cellules.

Nous avons déterminé des doses seuil comprises entre 25 et 60 mJ/cm² pour des concentrations de GelMA supérieures ou égales à 10 % (voir Fig. 5.5.D). Pour 5% de GelMA, la dose atteint une valeur plus élevée de l’ordre de 300 mJ/cm². La dose évolue de façon similaire à celle du PEGDA. L’augmentation de la concentration en photo-initiateur ou en polymère conduit à une diminution de la dose seuil.

5.2.5 Contrôle de l'adhésion des matériaux photopolymérisés durant l'impression

5.2.5.1 Greffage des polymères acrylates sur le substrat en verre avec un traitement de surface

Le substrat servant au support d'impression est constitué de lamelles de microscopie en verre (voir partie 2.4). Afin de favoriser l'adhésion du matériau polymérisé sur le substrat et de garantir la stabilité mécanique des structures après impression, nous avons validé un protocole de traitement de surface permettant un greffage covalent des matériaux. Nous utilisons du 3-(Triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (MAPTMS ou TMSPMA). Le MAPTMS comprend un atome de silicium qui lui permet de se fixer sur la surface de verre et un groupe méthacrylate pour se fixer de façon covalente aux acrylates de l'hydrogel.²⁷² Les molécules de MAPTMS ont un seul atome de silicium. Une monocouche est donc formée sur le verre avec des liaisons Si - O. Le protocole est inspiré de²³⁵ et décrit lors de la description des méthodes d'une impression (voir protocole n°3, p.175).

5.2.5.2 Prévention de l'adhésion de la solution photopolymérisable sur la tête d'impression

Inhibition de la réaction par piégeage des radicaux libres par le dioxygène L'impression par une tête d'impression nécessite de garantir un flux permanent d'hydrogel au niveau de la tête et repose sur un mouvement de la tête relativement au substrat d'impression. Ce mécanisme requiert implicitement que la solution polymérisable n'adhère pas à la tête durant le processus de réticulation. Dans le cas de l'impression par stéréolithographie, il n'y a pas de tête d'impression, mais le laser doit traverser le fond du réservoir de résine. De ce fait, il ne faut pas que la résine adhère au fond du bac. Il faut donc prévenir l'adhésion des hydrogels dans certaines conditions (sur les têtes d'impression ou au fond du bac).

La méthode principalement revendiquée pour limiter les interactions et l'adhésion des polymères acrylates est l'inhibition par le dioxygène. Le schéma de la réaction est décrit sur la figure 5.6. Si lors de l'impression, de l'O₂ est au contact de la solution polymérisable, la réaction de polymérisation n'aura pas lieu. Comme montré précédemment, la polymérisation des acrylates se fait par l'intermédiaire de radicaux libres, initialement créés par la photo-réaction des photo-initiateurs. L'O₂ a une forte capacité de réaction avec les radicaux libres R·. Sa constante de réaction k_O est bien plus importante que celle k_P entre les radicaux libres R· et les acrylates P. Dans ce processus l'O₂ réagit pour former RO₂·, puis complète la réaction avec un proton H⁺ pour former le complexe RO₂H. Ce phénomène a été étudié et décrit de manière approfondie par Decker *et al.* en 1985²⁷³ et repris par d'autres équipes.^{271,274}

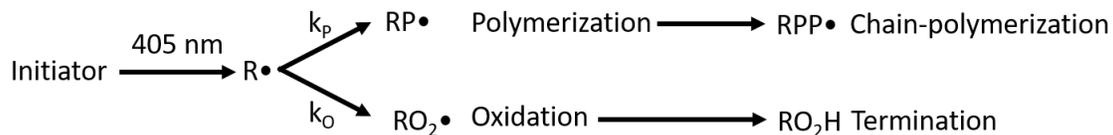


FIGURE 5.6 – Schéma du piégeage des radicaux libres par le dioxygène

En stéréolithographie, pour permettre l'approvisionnement d'oxygène jusqu'à la zone de contact, de nombreuses équipes utilisent un matériau (épais ou en film) poreux à l'oxygène. Le plus classique est le PDMS^{197,205,206} mais certains utilisent aussi des films de Teflon poreux AF 2400.^{167,168} À proximité de ces interfaces, la présence d'un gradient de concentration d'oxygène inhibe la réaction de polymérisation jusqu'à des distances de plusieurs micromètres de la surface. L'équipe de Dendukuri a prouvé en 2006 que quelle que soit l'épaisseur de PDMS, l'épaisseur de l'inhibition valait 2.5 μm.¹⁷⁶

L'équipe de Tumbleston a utilisé ce phénomène pour éviter la méthode de *Relever-Rabaisser* de la plateforme substrat, nécessaire habituellement en SLA pour ré-approvisionner en résine liquide au niveau de la pièce en cours.¹⁶⁸ À l'aide d'un filtre en Téflon AF2400 poreux à l'oxygène, ils créent une zone inhibée au niveau du fond du bac de résine, pour que de la résine liquide soit donc toujours disponible dans la zone de photo-polymérisation et pour permettre de relever la plateforme de manière

continue.

Pour la plateforme 3D-FlowPrint, nous avons utilisé du PDMS. La lumière issue de la fibre optique traverse une lamelle de verre, puis un dôme de PDMS qui a été déposé dessus avant d'atteindre le PEGDA. Nous n'avons jamais eu de problème d'adhérence du PEGDA sur les têtes d'impression dans nos conditions expérimentales. Pourtant, lors de l'utilisation de GelMA, celui-ci se fixait sur la tête au contraire du PEGDA. Ce problème est décrit ci-dessous et nous avons proposé de remplacer le PDMS par une bulle d'air afin de régler le problème d'adhérence.

Hypothèses sur l'adhésion du GelMA au PDMS Le phénomène d'inhibition par le PDMS et l'O₂ ne dépend pas du polymère, comme décrit dans la figure 5.6. Comme expliqué dans la partie 3.5, le dôme de PDMS n'empêche pourtant pas l'absorption du GelMA sur notre tête d'impression. Ainsi, bien que le phénomène d'inhibition reste applicable à la réticulation du GelMA, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'adhésion au PDMS.

Potentiellement, l'inhibition de la polymérisation du PEGDA au contact du PDMS peut provenir d'un second phénomène indépendant de la réaction des radicaux libres avec le dioxygène. Ce second phénomène n'empêcherait pas la polymérisation du GelMA. Cette idée est supportée par l'agencement de certaines puces microfluidiques comme celles de Dendukuri *et al.*¹⁷⁶ Dans cette situation, une première couche de PDMS est fixée sur une lamelle en verre. Une seconde couche de PDMS, contenant une partie creuse, est ajoutée afin de créer un canal microfluidique entre les deux couches. Le but est de photopolymériser en flux, sans adhésion ni sur la paroi inférieure ni supérieure, pour la création d'objets 2D flottants. Le dioxygène peut diffuser facilement à travers la couche supérieure du PDMS (en contact avec le canal microfluidique d'un côté et l'air de l'autre) et inhiber la réaction de polymérisation à son contact. Mais pour le PDMS inférieur (en contact avec le canal microfluidique d'un côté et la lame de verre), la lame de verre bloque le passage direct du dioxygène. Il ne peut diffuser que le long de l'épaisseur de la couche inférieure de PDMS et non à travers, donc sur une distance bien plus importante. Or, cette méthode de polymérisation d'objets en flux fonctionne avec du PEGDA. L'hypothèse de l'inhibition par l'oxygène au contact du PDMS est donc seulement partiellement satisfaisante. De plus, cette même étude a prouvé que l'épaisseur de PDMS n'influe pas sur l'épaisseur de la couche inhibitrice. Pourtant, l'épaisseur de PDMS joue sur la diffusion du dioxygène et devrait donc influencer sur l'inhibition. L'inhibition de la polymérisation du PEGDA au contact du PDMS ne s'explique donc peut-être pas qu'avec le dioxygène.

Dans la même ligne d'idée, la tête d'impression de notre plateforme est immergée et le dôme de PDMS est positionné entre la lamelle de verre d'un côté et la solution polymérisable de l'autre. Il n'a donc pas d'interface avec l'air et donc pas de diffusion d'oxygène possible. Or, même après des impressions immergées de sept heures, le PEGDA n'adhère pas à la tête d'impression alors que l'oxygène potentiellement stocké dans le PDMS a été consommé. Nous postulons donc qu'il existe un second phénomène à l'œuvre.

Le PDMS et le PEGDA pourrait avoir une affinité si faible qu'ils n'adhéreraient pas ensemble. La couche d'inhibition par l'oxygène serait un phénomène supplémentaire. Le GelMA, lui, est composé de peptides avec des affinités très différentes. Il est possible que certains aient des affinités avec le PDMS et lui permettent de se fixer par interaction hydrophobe.

À l'opposé de notre projet, certaines équipes²⁷⁵ essaient au contraire de fixer des hydrogels sur du PDMS, ce qui n'est pas si simple quand on le souhaite, en supprimant l'inhibition de l'oxygène par de la benzophénone.²⁷⁶ Ils arrivent alors à lier de manière covalente l'hydrogel et le PDMS.

Nous n'avons pas de conclusion sur cette réflexion. Il nous reste cependant à tester l'hypothèse du film poreux de teflon AF 2400. L'oxygène pourrait diffuser à travers ce film depuis le canal optique. Nous avons tout de même déjà testé d'autres films de Teflon et film de PDMS sans succès. Nous avons alors préféré une approche expérimentale basée sur ces résultats d'adhésion du GelMA sur tous les matériaux testés. À partir de ce constat, nous avons contourné le problème en préférant une interface air-biomatériau (voir partie 3.5). Le GelMA est polymérisé dans l'espace entre la tête et le substrat. Cependant, il n'adhère pas à la tête, car il est en interface avec une bulle d'air qui n'offre par définition aucun point d'accroche.

Dans cette partie, nous avons développé les principes chimiques à l'œuvre dans la plateforme. Les propriétés des matériaux ont été rappelées ainsi que la description des phénomènes de réticulation.

Nous avons montré les résultats de caractérisation des doses seuil de polymérisation du PEGDA et du GelMA pour plusieurs concentrations en polymères et en photo-initiateurs. Cette partie a aussi développé les aspects d'adhérence des polymères, sur le substrat d'une part, mais aussi sur la tête d'impression. Dans la partie suivante, nous étudions la photo-polymérisation des matériaux avec la plateforme 3D-FlowPrint et ses caractéristiques.

5.3 Dose seuil, largeur de ligne imprimée, résolution et temps d'impression

Les matériaux utilisés dans cette thèse sont des polymères photosensibles et hydrosolubles qui nous permettent d'obtenir des hydrogels dits réticulés.

La dose correspond à l'énergie apportée par la source lumineuse. La dose seuil correspond à l'énergie minimum nécessaire pour atteindre le palier permettant la tenue mécanique de l'objet. En dessous de cette valeur, la réaction est incomplète et le matériau n'atteint pas un taux de réticulation suffisant pour garantir sa stabilité mécanique après développement. Au-dessus de cette valeur, le nombre de points de réaction augmente et le matériau est plus polymérisé. En augmentant encore la dose, l'ensemble des sites réactifs sont consommés et la dose n'a plus d'impact. Généralement, les utilisateurs de stéréolithographie travaillent plutôt proches du seuil de polymérisation que de la dose maximale afin d'obtenir des objets précis. La détermination de cette dose seuil est importante afin de ne pas sous-insoler (objet inexistant ou mal-défini) ou sur-insoler (géométrie mal respectée).

Dans cette partie, nous commencerons notre analyse des paramètres influençant la dose par une approche théorique en considérant un spot homogène ou un spot laser de distribution gaussienne. Une première étude expérimentale de la dose sera évaluée à travers une illumination optique collimatée et homogène. Ensuite, nous analyserons une caractérisation expérimentale avec illumination laser où nous avons fait varier la dose à travers la puissance de commande et la vitesse de déplacement de la tête. Enfin, nous analyserons les conséquences de ces études sur la vitesse d'impression volumétrique et la possibilité d'implémenter une seconde fibre pour profiter de multirésolutions.

Ici, nous nous intéressons à la résolution dans le plan XY. La résolution dans l'axe Z, l'épaisseur de couche, n'est pas liée à la distribution spatiale de l'énergie, mais à la distance de confinement entre la surface de la tête d'impression et le substrat. L'analyse de la résolution dans l'axe Z est réalisée dans la partie 5.6.2.

5.3.1 Approche théorique

5.3.1.1 Détermination de la résolution et de la dose seuil de polymérisation

Afin de caractériser la résolution d'impression, nous avons imprimé des réseaux de lignes parallèles et mesuré leur largeur. La valeur de la largeur de ces lignes nous a permis de déterminer la résolution spatiale du procédé d'impression dans le plan XY. La résolution d'une impression pour des paramètres donnés instrumentaux est définie comme la largeur de ligne après impression et développement.

Dans les deux parties suivantes, nous étudions la théorie de la résolution de la photopolymérisation entre la forme d'un spot optique et la largeur de ligne imprimée attendue. Plusieurs approximations sont faites, sur la forme du spot par exemple. Il est aussi considéré qu'il n'y a pas de diffusion de la lumière dans le matériau et pas de diffusion des espèces réactives.

5.3.1.2 Méthode de détermination expérimentale de la dose

La dose se calcule par la multiplication de la puissance par le temps d'exposition : $D = P \cdot t$. Le matériau est illuminé par une face. On mesure donc la puissance en W/m^2 et la dose en J/m^2 .

Si l'on approxime le spot laser comme un carré homogène de côté l , alors $D = \frac{P_{out}}{l^2} \cdot t$. Le temps d'exposition dépend de la vitesse v à laquelle le spot laser passe au-dessus de la zone insolée. Pour ce même carré de côté l , $t = \frac{l}{v}$, ce qui donne finalement.

$$D = \frac{P_{out}}{l^2} \frac{l}{v} = \frac{P_{out}}{l \cdot v} \quad (5.2)$$

Dans le cas d'une illumination avec un faisceau gaussien, nous comprenons aisément que la distribution de l'énergie n'est pas homogène. Le cœur de la ligne reçoit une dose plus importante et est plus polymérisé que les bords qui ont reçu par définition la dose seuil de polymérisation. Au-delà, le matériau n'a pas reçu assez d'énergie pour que la polymérisation lui permette de maintenir sa forme. Cela implique qu'une augmentation de la dose conduit à une augmentation de la largeur des lignes imprimées.

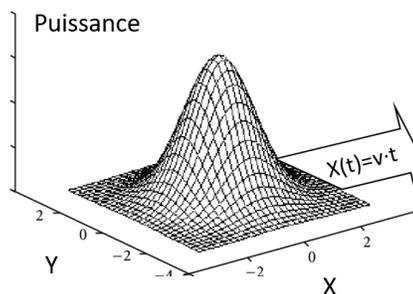
Dans certaines expériences, nous avons choisi d'attribuer la largeur d'une ligne à la largeur estimée du spot laser. Ainsi, nous avons une méthode simple pour calculer la dose seuil de réticulation à partir de l'observation de l'impression de lignes en connaissant simplement la puissance lumineuse, la vitesse et en mesurant la largeur. En diminuant progressivement la puissance ou en augmentant la vitesse, nous pouvons retrouver le seuil de polymérisation d'un matériau.

5.3.1.3 Méthode de calcul de la dose seuil en considérant une distribution gaussienne du faisceau

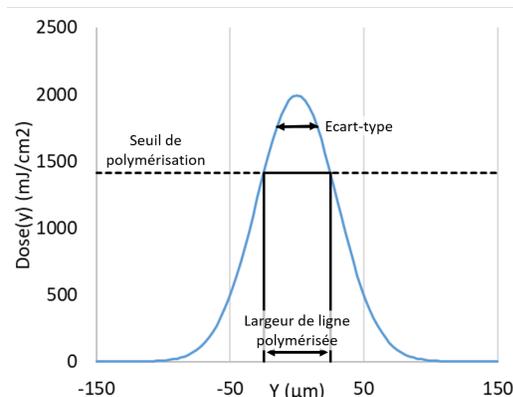
Nous considérons maintenant un faisceau gaussien et non plus homogène pour une approche plus précise de la détermination de la dose. La gaussienne donne l'énergie en un point $(x;y)$ en Watt, en fonction de la puissance fournie par le laser P_{out} en W/m^2 , l'écart type σ en mètre et P_{out} en Watt. L'écart-type correspond à la largeur de la gaussienne 63% de la valeur maximum.

$$\begin{cases} P(x, y) &= \frac{P_{out}}{(\sigma \cdot \sqrt{2\pi})^2} e^{-\frac{1}{2} \frac{x^2+y^2}{\sigma^2}} \\ \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} P(x, y) \cdot dx \cdot dy &= P_{out} \end{cases} \quad (5.3)$$

Considérons le déplacement du laser, à la vitesse v en m/s, le long de l'axe x , avec $x(t)=v \cdot t$ (voir Fig. 5.7.A). La dose est indépendante de la position absolue en x , mais dépend de la valeur de vitesse v . Considérons la $Dose(y)$ mesurée en J/m^2 .



(a) Schéma du déplacement d'une gaussienne 2D suivant l'axe x



(b) Diagramme d'une gaussienne correspond à l'équation 5.6, avec $P_{out} = 0.3 \text{ mW}$, $\sigma = 30 \text{ µm}$, $V = 0.2 \text{ mm/s}$ et $Dose_{seuil} = 1410 \text{ mJ/cm}^2$

FIGURE 5.7 – Déplacement du laser sous la forme d'une gaussienne pour photo-réticuler

$$Dose(y) = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{P_{out}}{(\sigma \cdot \sqrt{2\pi})^2} e^{-\frac{1}{2} \frac{(v \cdot t)^2 + y^2}{\sigma^2}} dt \quad (5.4)$$

$$Dose(y) = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \frac{y^2}{\sigma^2}} \cdot \frac{P_{out}}{v} \cdot \left(\frac{1}{(\sigma/v) \cdot \sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{1}{2} \frac{t^2}{(\sigma/v)^2}} dt \right) \quad (5.5)$$

$$Dose(y) = \frac{P_{out}}{v} \cdot \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \frac{y^2}{\sigma^2}} \cdot 1 = \frac{P_{out}}{v} \cdot gaussienne(y, \sigma) \quad (5.6)$$

$$(5.7)$$

Nous voyons que le déplacement d'une gaussienne 2D le long d'une ligne revient à gaussienne 1D orthogonale au déplacement multipliée par le facteur P/v . La détermination de la zone réticulée à partir de la distribution d'énergie suivant l'axe y nous permet d'obtenir la largeur des lignes imprimées (voir Fig. 5.7.B). En associant une valeur seuil $Dose_{seuil}$ à l'équation 5.6, nous pouvons déterminer la *largeur* de ligne en fonction de P_{out} , σ et $Dose_{seuil}$.

$$Dose_{seuil} = \frac{P_{out}}{v} \cdot gaussienne(largeur/2, \sigma) \quad (5.8)$$

$$largeur = 2\sigma \cdot \sqrt{2 \cdot \ln \left(\frac{P_{out}}{v} \frac{1}{Dose_{seuil}} \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \right)} \quad (5.9)$$

Expérimentalement, nous pouvons mesurer la *largeur* de ligne imprimée. Il manque la connaissance de l'écart-type pour déterminer la dose seuil d'après l'équation 5.9. Pour l'écart-type, nous pouvons utiliser les données obtenues lors de la caractérisation du laser. Nous pouvons aussi travailler expérimentalement en mesurant la largeur de plusieurs lignes imprimées *largeur* à des couples puissances / vitesses différentes P/V . Avec un jeu de données, nous pouvons retrouver les valeurs conjointes de la dose seuil $Dose_{seuil}$ et l'écart-type σ .

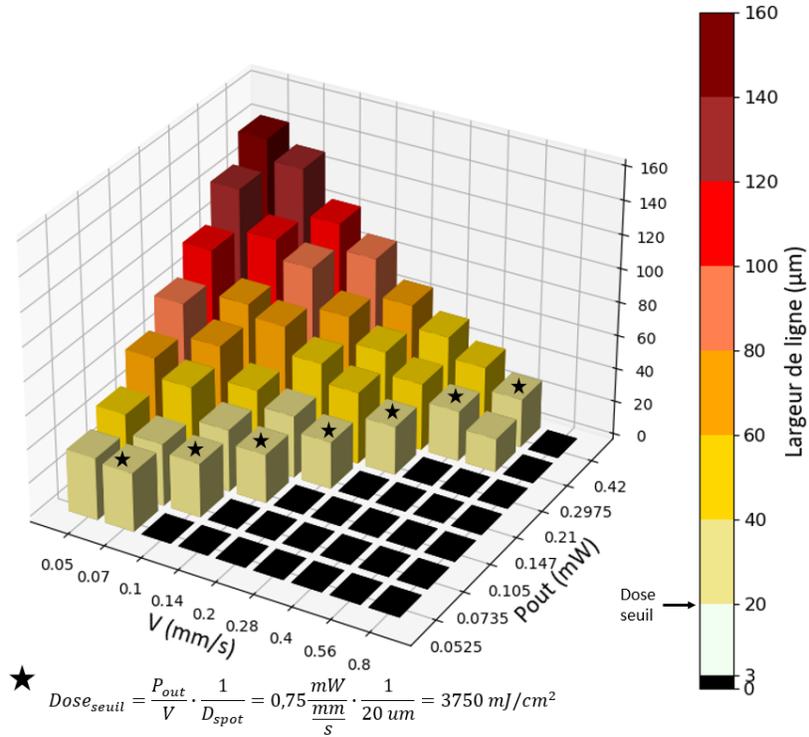
5.3.2 Étude expérimentale

L'étude suivante a été réalisée avec du PEGDA 700 à 40% et du LAP à 0,1%, avec $\phi_{in} = 25 \mu\text{l}/\text{min}$ et $R_\phi = 5$. La figure suivante (5.8.A) montre les largeurs mesurées en faisant varier la puissance de sortie entre 0.0525 mW et 0.42 mW et la vitesse de déplacement entre 0.05 mm/s et 0.8 mm/s. L'axe Z et le code couleur indiquent la largeur des lignes mesurées. Comme attendu, nous observons que plus la vitesse augmente et la puissance diminue, moins les lignes sont larges. Nous observons une valeur minimum pour la combinaison $P_{out}/v = 0.75 \text{ mJ}/\text{mm}$ qui détermine le seuil de polymérisation. À cette valeur, nous avons été capables d'obtenir de manière reproductible des lignes de largeur comprises entre 20 et 30 μm . Cette valeur de résolution est comparable aux meilleures technologies utilisées en bioimpression et en stéréolithographie laser ou DLP. Nous notons aussi que la largeur est stable sur l'axe P/v comme le suggèrent les formules des parties précédentes (voir eq. 5.2 et eq. 5.9).

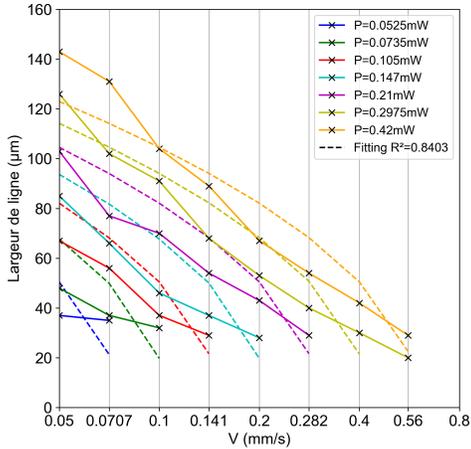
En utilisant la formule plus simple (eq. 5.2), et en prenant la largeur de ligne minimum de 20 μm , nous obtenons une dose_{seuil} de 3750 mJ/cm^2 . Dans ce cas, une partie importante de la puissance totale est en fait concentrée au centre des lignes et une autre partie est perdue en dehors de la ligne polymérisée. Cette valeur est donc exagérée, mais conserve l'ordre de grandeur.

La corrélation avec la formule établie *via* la forme de la gaussienne (eq. 5.9) donne les valeurs suivantes : $\sigma = 55 \mu\text{m}$ et $Dose_{seuil} = 500 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ (voir Fig. 5.8.B). Cependant, la corrélation concorde mal ($R^2 = 84\%$), comme nous le voyons sur la figure 5.8.B. Entre autres, nous observons expérimentalement une dépendance logarithmique entre le couple P/v et la largeur, alors que la théorie prévoit une relation avec la racine carré du logarithme de P/v (eq. 5.9). La diffusion des espèces, le comportement du matériaux et l'impact du développement peuvent jouer un rôle qui n'est pas pris en compte dans cette analyse.

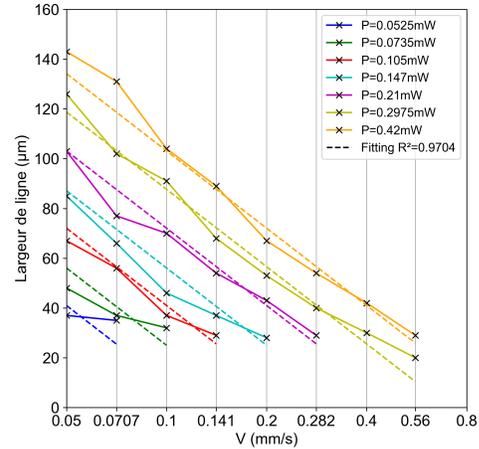
Nous avons proposé une corrélation expérimentale qui garde le facteur $\ln(P/v)$ (voir eq. 5.10). Nous avons pu établir une corrélation avec un R^2 de 97% (voir Fig. 5.8.C).



(a) Mesure de la largeur de lignes imprimées en fonction de la puissance et de la vitesse de déplacement. Seuil de polymérisation marqué par une étoile.



(b) Evolution de la largeur de ligne en fonction de la vitesse d'impression et de la puissance. Corrélation avec le modèle théorique considérant un spot optique gaussien (voir eq. 5.9) avec $\sigma = 55 \mu m$ et $Dose_{seuil} = 500 \text{ mJ/cm}^2$. Valeurs mesurées en traits continus, valeurs calculées en traits pointillés



(c) Evolution de la largeur de ligne en fonction de la vitesse d'impression et de la puissance. Corrélation avec un modèle expérimental (voir eq. 5.10). Valeurs mesurées en traits continus, valeurs calculées en traits pointillés

FIGURE 5.8 – Étude du seuil de polymérisation du PEGDA avec la plateforme en fonction de la puissance et de la vitesse de déplacement

$$l = k_1 \cdot \ln \left(k_2 \cdot \frac{P}{v} \right) = 44.82 \cdot \ln \left(2.376 \cdot \frac{P}{v} \right) \quad (5.10)$$

5.3.3 Estimation des temps d'impression

5.3.3.1 Calcul de la vitesse volumétrique

La haute résolution et la capacité à imprimer des motifs à l'échelle micrométrique sont des critères importants du cahier des charges que nous avons défini dans cette thèse. Néanmoins, la perspective de réaliser des modèles de microenvironnements représentatifs de tissus réels nécessite également de considérer la réalisation d'échantillons volumineux (plusieurs mm^3 à plusieurs cm^3) dans un temps compatible avec les contraintes de production. Or, réduire la dimension du faisceau laser pour améliorer la résolution induit une augmentation du nombre de vecteurs nécessaires pour insoler l'ensemble du volume de la structure recherchée, et naturellement une augmentation du temps total d'impression. Dans le cas de la bioimpression une contrainte temporelle supplémentaire est liée au temps permettant de conserver une bonne viabilité cellulaire. Nous avons donc souhaité caractériser les temps d'impression caractéristiques et corrélés les vitesses de déplacement décrites ci-dessus à une vitesse volumétrique, plus représentative du temps de fabrication d'un dispositif donné.

La vitesse volumétrique $V_{\text{volumétrique}}$ peut s'exprimer comme suit, avec v la vitesse de déplacement de la tête, $hauteur$ la hauteur d'une ligne imprimée et $largeur$ la largeur d'une ligne imprimée :

$$V_{\text{volumétrique}} = v \cdot hauteur \cdot largeur \quad (5.11)$$

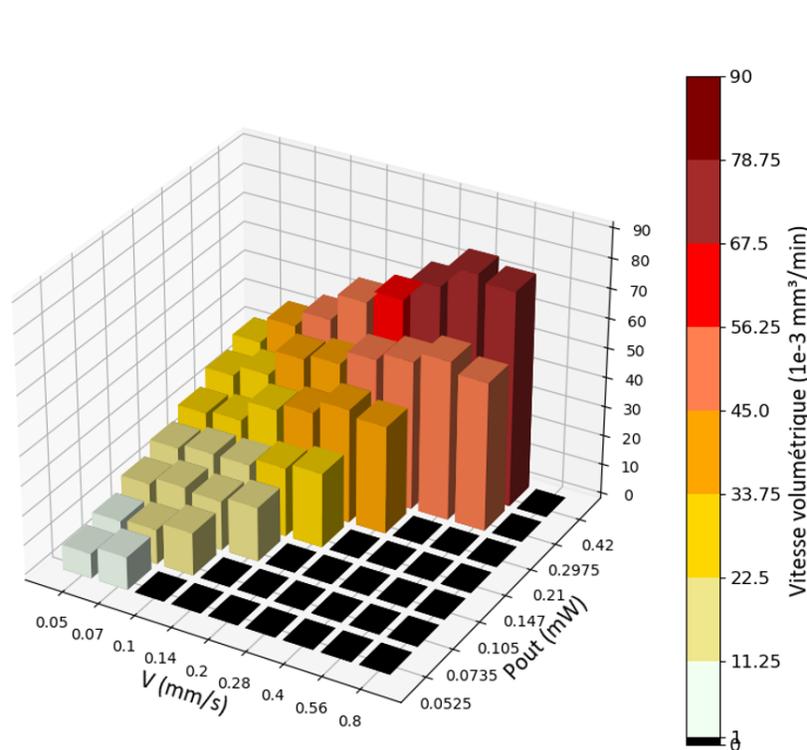


FIGURE 5.9 – Étude de la vitesse volumétrique en fonction de la puissance et de la vitesse de déplacement, basée sur les données en Fig. 5.8

Deux stratégies peuvent être considérées pour optimiser la vitesse d'impression volumétrique :

- Soit augmenter la vitesse d'impression en ajustant la puissance pour maintenir une dose au-dessus de la valeur seuil. Cette approche est limitée en premier lieu par la puissance maximum délivrable par la fibre optique et en second lieu par les capacités de déplacement de la platine motorisée.
- Soit augmenter la puissance laser à vitesse constante afin d'augmenter la largeur des structures imprimées et ainsi augmenter la vitesse d'impression volumétrique. L'élargissement des structures impacte implicitement la résolution d'écriture et requiert d'adapter la puissance aux dimensions

minimum des structures à imprimer.

Afin d'identifier le meilleur compromis entre ces deux approches, nous avons repris les données décrivant l'évolution de la largeur des structures imprimées en fonction de la vitesse et de la puissance, et représenté l'évolution de la vitesse volumétrique pour une hauteur de couche donnée de 50 μm . Le graphique 5.9 reprend les résultats de l'expérience précédente (Fig. 5.8) en calculant la vitesse volumétrique.

Nous observons que les vitesses volumétriques maximales sont obtenues à haute vitesse de déplacement. En effet, la vitesse volumétrique est proportionnelle à la vitesse de déplacement (eq. 5.11) alors qu'une dépendance logarithmique a été observée avec la largeur des structures (eq. 5.10). Nous avons donc privilégié les impressions à hautes vitesses qui permettent de conserver une résolution proche de la valeur limite (20 - 30 μm).

Augmenter la hauteur permet d'augmenter la vitesse volumétrique si la structure le permet. Néanmoins, l'augmentation des facteurs de forme des structures imprimées peut être une limite, notamment pour les hydrogels et les matériaux de faibles modules de conservation. Par exemple, la figure 5.15.A.ii, présentée dans la partie sur les objets 2.5D, montre des lignes avec un rapport de forme de 5.5 qui s'affaissent. Nous pouvons estimer qu'imprimer des lignes plus larges permettraient de les imprimer à une plus grande hauteur tout en gardant un rapport de forme identique. Nous pourrions donc aussi jouer avec le dernier paramètre de l'équation de la vitesse volumétrique : la hauteur h . Au final, il revient à chaque expérimentateur de choisir les variables adaptées pour son expérience en fonction du temps disponible, de la résolution requise, des propriétés mécaniques du matériau et des facteurs de forme recherchés.

5.3.3.2 Vers une méthode d'impression multirésolutions

L'augmentation de la puissance laser permet d'augmenter la largeur de trait par un effet de surdosage, mais cette stratégie ne permet pas de l'améliorer de façon significative. Une stratégie alternative consiste à utiliser des faisceaux lumineux de tailles variables et d'adapter la résolution d'impression aux dimensions des motifs désirés. En choisissant un faisceau optique plus large notamment, nous pouvons profiter d'une largeur d'écriture plus importante tout en conservant une dose d'écriture à la valeur seuil. Cette approche permet d'augmenter la vitesse volumétrique sans sacrifier la vitesse de déplacement.

Nous avons traduit cette solution en intégrant un commutateur optique (5.1.3) qui permet d'alterner entre deux fibres optiques focalisées à des distances différentes et donc offrant des largeurs de faisceaux de tailles différentes au sein de la zone de réticulation. La commutation entre les deux lignes optiques est programmée *via* le logiciel de pilotage qui permet d'adapter la résolution aux tailles de motifs désirés.

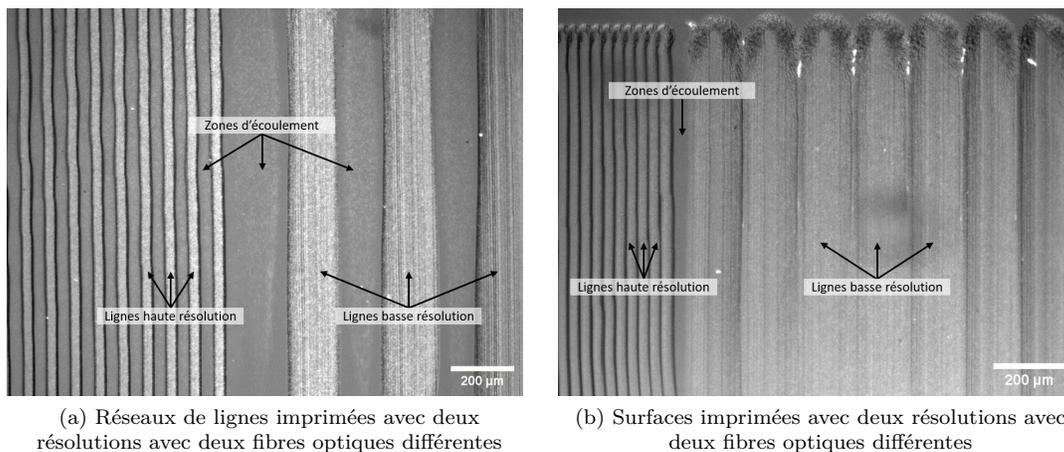


FIGURE 5.10 – Impression avec deux fibres optiques

Les figures suivantes (Fig. 5.10) montrent quatre réseaux de lignes imprimées dans ces deux configurations. Les lignes haute résolution mesurent 31 μm de large et les lignes basse résolution mesurent

152 μm de large, soit un facteur 5 entre les deux configurations.

5.4 Influence de structures préexistantes sur l'impression

Dans les deux parties suivantes, nous souhaitons montrer que le processus de réticulation n'est pas impacté par les modifications éventuelles des écoulements dues à la présence de structures en cours de construction. Une fois l'ensemble de ces analyses effectuées, nous pourrions mettre à profit les connaissances accumulées pour la création d'objets 3D.

5.4.1 Impression en flux en présence de structures réticulées

Les simulations présentées précédemment (voir chapitre 4) ont été réalisées en considérant la tête d'impression positionnée au-dessus du substrat, sans autre élément géométrique. Cette configuration simplifiée nous a permis d'identifier et de quantifier l'impact des principaux paramètres de l'impression. Toutefois, la présence de structures 3D préalablement imprimées ou de structures en construction pourrait potentiellement modifier la cartographie des écoulements et induire des modifications des vitesses effectives des solutions. De façon plus globale, nous avons souhaité évaluer l'impact de la vitesse d'écoulement sur le processus de photo-polymérisation.

La tête d'impression, contenant la source lumineuse, est en mouvement par rapport au substrat. Par ailleurs, la solution elle-même est en mouvement par rapport au substrat et à la tête d'impression sous l'influence des canaux d'injection et d'aspiration. En conséquences, deux questions se posent dans cette configuration :

- Quelle est la vitesse d'écoulement dans la zone d'illumination ?
- Quel est l'impact de la vitesse du fluide sur le processus de polymérisation dans la zone exposée ?
- Quel est l'impact de structures pré-existantes ou en cours d'impression sur la distribution spatiale des flux et sur le processus de polymérisation.

Pour répondre à ces questions, nous avons choisi une approche basée sur des simulations numériques. Nous avons modélisé les flux microfluidiques dans la zone d'illumination i) sur une surface plane, exempte de structures, ii) au cours de l'impression d'une ligne isolée et iii) au cours de l'impression d'une structure étendue, composée de plusieurs lignes parallèles juxtaposées (voir Fig. 5.11).

5.4.2 Analyse des simulations

La figure 5.11 présente les résultats des simulations de l'influence de la présence des structures, en cours d'impression ou déjà imprimées, sur la distribution spatiale des flux. La vitesse de déplacement de la tête par rapport au support est de 0.1 mm/s, $\phi_{in} = 25 \mu\text{l}/\text{min}$, $R_\phi = 5$.

Lors du commencement de la polymérisation d'une structure, aucun objet n'est en place pour modifier l'écoulement fluide, ce qui correspond à la situation A sur la figure 5.11. Nous observons une vitesse de la solution dans la simulation témoin de 0.3 mm/s (moyenne dans la zone de polymérisation) avec un maximum à 0.43 mm/s (mesurée à mi-hauteur). La circulation des flux modifie donc la vitesse du fluide relativement à la tête avec une valeur triple par rapport à la vitesse de déplacement de la tête par rapport au support ($v = 0.1 \text{ mm/s}$). Pour l'impression des premiers blocs de structures, ce phénomène est à prendre en compte. Pour compenser la trop grande vitesse de la solution, nous avons ajouté la capacité d'attendre de façon stationnaire à l'allumage du laser avant de se déplacer pour créer la ligne. La valeur typique d'attente est de 0.2 s. Cette étape permet d'assurer la polymérisation du premier point.

Lors du déplacement de la tête, une ligne est créée à partir de ce premier point dans l'axe de déplacement, ce qui modifie les écoulements (voir Fig. 5.11.B). La vitesse d'écoulement dans la zone de polymérisation chute à 0.153 mm/s. Si nous considérons maintenant l'impression d'une surface étendue (voir Fig. 5.11.C), plusieurs lignes sont imprimées parallèlement. Au point de polymérisation, l'écoulement est limité sur deux cotés. La vitesse d'écoulement dans la zone de polymérisation est alors de 0.142 mm/s.

Nous voyons que la présence de structures en cours d'impression diminue l'impact de la circulation

forcée *via* l'injection et l'aspiration, au profit du mouvement de la tête par rapport au substrat et aux structures déjà imprimées ($v = 0.1 \text{ mm/s}$).

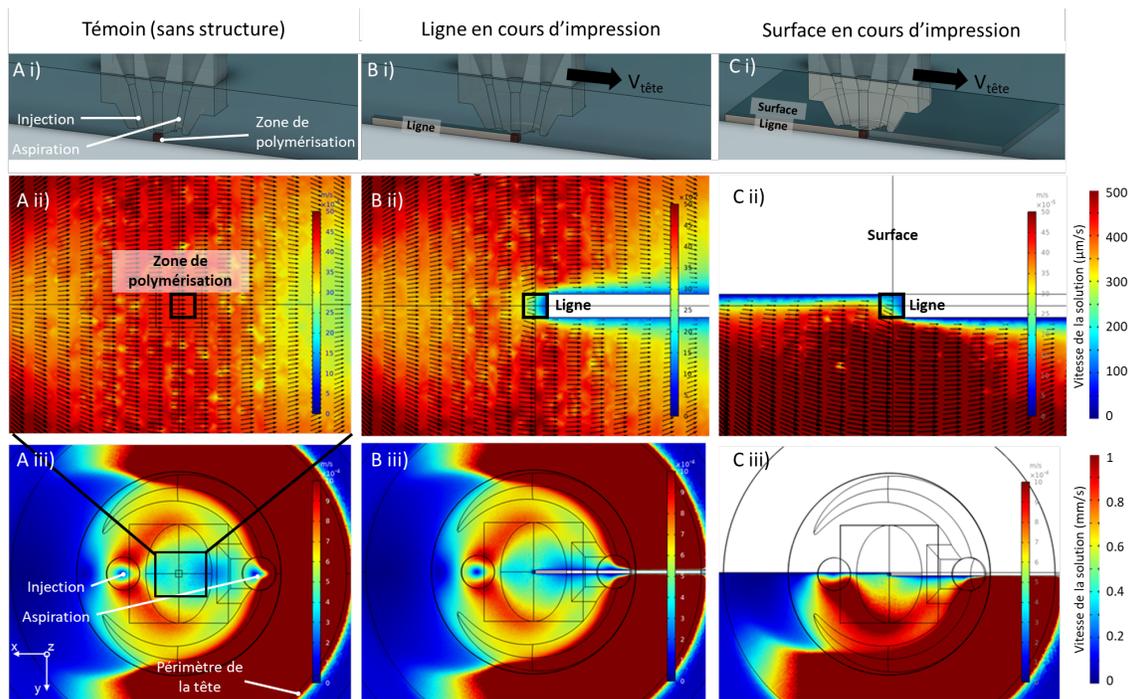


FIGURE 5.11 – Influence de structures déjà imprimées sur la vitesse de la solution dans la zone de polymérisation. Résultats obtenus par simulations Comsol avec $Z_{\text{gap}} = 50 \text{ }\mu\text{m}$, $v = 0.1 \text{ mm/s}$, $\phi_{in} = 25 \mu\text{l/min}$, $R_{\text{phi}} = 5$. (i) Schéma 3D pour la caractérisation de l'influence de structures en cours d'impression. (ii-iii) Vitesse de la solution dans le plan XY à mi-hauteur entre le substrat et la tête. En bleu, les vitesses les plus faibles, en rouge les vitesses les plus élevées et en blanc les structures en cours d'impression. (A) Témoin sans structure. (B) Influence d'une ligne en cours d'impression. (C) Influence d'une surface en cours d'impression.

Lors de l'impression, le déplacement continu de la tête positionne la zone de polymérisation au-dessus d'un nouvel élément de matériau non-polymérisé, à la suite de l'objet polymérisé. Cet élément est grandement ralenti par les parties déjà imprimées. De plus, la polymérisation n'est pas instantanée et le déplacement est continu. Donc le fluide augmente progressivement son degré de réticulation depuis son entrée dans la zone illuminée jusqu'au moment où il est mécaniquement stable, au bout de la ligne en cours de polymérisation. Ce phénomène continu augmente sa viscosité progressivement dans la zone de polymérisation. La vitesse de l'élément de matériau, par rapport au substrat, diminue jusqu'à zéro lorsque l'élément se solidifie au contact de l'objet déjà polymérisé. Ce phénomène augmente l'influence du déplacement de la tête (qui ne dépend pas du matériau) par rapport à l'influence des écoulements fluidiques.

Nous pouvons voir sur la figure 5.8 que la largeur quasi-constante des lignes imprimées pour une valeur stable de P/v confirme cette idée. Cela prouve que la vitesse de déplacement de la tête v est aussi importante que la puissance P , sans altération par le déplacement fluide de la solution. Ce point prouve aussi la décorrélation entre l'acheminement du matériau et la méthode de polymérisation.

5.5 Influence de la transparence des matériaux

Dans le paragraphe précédent, nous avons montré que la présence de structures en cours d'impression ne perturbe pas de façon significative le processus d'écriture par photopolymérisation. Dans le paragraphe ci-dessous nous souhaitons aborder les questions d'absorption optique des matériaux et évaluer l'impact de ce paramètre sur la cinétique du processus de polymérisation.

Dans le concept 3D-FlowPrint, l'épaisseur du matériau polymérisé est définie par son confinement entre le substrat et la tête d'impression. Notre objectif est de pouvoir réaliser des structures de hauteurs variables, comprises typiquement entre 10 μm et 1 mm. Il convient d'analyser l'atténuation du faisceau due à l'absorption du matériau qui pourrait impacter la distribution de l'énergie suivant l'axe z et causer des inhomogénéités, voire empêcher d'atteindre le seuil de polymérisation sur les couches les plus profondes. Ce phénomène est à la base du mécanisme de polymérisation frontale (front wave polymerization) qui est décrit ci-dessous.

5.5.1 Modèles de polymérisation frontale

5.5.1.1 Modèle simplifié de la polymérisation frontale

La polymérisation frontale est un phénomène observé lors de la polymérisation d'un volume de matériau absorbant illuminé par une source lumineuse depuis une surface. Lorsque l'énergie seuil est atteinte, la polymérisation commence à cette surface, car la puissance optique reçue dans cette zone est nominale. L'intensité I du faisceau lumineux, et donc l'énergie E distribuée dans le matériau diminue au fur et à mesure de la pénétration du faisceau. Puis, plus le temps augmente, plus l'énergie distribuée augmente avec un rapport proportionnel (voir eq. 5.14)

Dans notre cas (sans additif absorbant), nous pouvons considérer que l'absorption principale provient du photo-initiateur qui a pour but d'absorber la lumière traversante. Nous considérons une situation stable avec une insolation depuis une surface, sans flux de matériau. Considérant une intensité I_0 du faisceau incident, et une exposition à vitesse de déplacement nulle, l'intensité suivant l'axe de pénétration (z) peut être corrélée au temps t d'exposition, à la concentration en espèce C et à l'absorption molaire associée ϵ suivant l'équation suivante :

$$\log\left(\frac{I(z)}{I_0}\right) = \epsilon \cdot C \cdot z \quad (5.12)$$

$$I(z) = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot C \cdot z} \quad (5.13)$$

$$E(z, t) = I(z) \cdot t \quad (5.14)$$

$$\text{Pour } t \cdot I_0 \geq E_{seuil}, E_{seuil} = E(z_i, t_i), \text{ où } \{z_i, t_i\} \text{ sont couplés} \quad (5.15)$$

Pour un temps d'exposition t fixé, l'énergie distribuée diminue suivant l'axe Z depuis la surface avec $E_0(t) = I_0 \cdot t$ jusqu'à la constante énergétique du seuil de polymérisation et la valeur limite $E_{seuil} = E(z_{front}, t) = I(z_{front}) \cdot t$. Plus l'insolation est longue, plus $I(z_{front})$ peut être faible et donc plus z_{front} est grand. Le seuil de polymérisation est alors atteint plus en profondeur. Il y a donc un front de polymérisation temporel depuis la surface vers le volume du matériau.

$$\text{Profondeur polymerisee} = z(t) = \frac{\log\left(\frac{I_0 \cdot t}{E_{seuil}}\right)}{\epsilon \cdot C} \quad (5.16)$$

Dans cette équation, nous voyons que la profondeur de matériau polymérisé augmente avec une dépendance logarithmique du temps d'exposition t . Cette étude simple de la polymérisation frontale suppose les approximations suivantes. Nous considérons que le principal absorbant est le photo-initiateur et que sa concentration reste constante tout au long de la réaction. L'absorption ϵ de la solution est donc considérée comme constante dans le temps. Nous considérons également qu'il existe un seuil de $Dose_{seuil}$ à partir duquel le seuil de polymérisation est atteint, pour une concentration en hydrogel donné. A partir de ce seuil, le matériau est capable de maintenir sa forme. Pour autant, une fraction est polymérisée. Au-delà de ce seuil, le taux de polymérisation augmente encore avec la dose, mais nous nous intéressons ici seulement au seuil de polymérisation.

5.5.1.2 Modèle prenant en compte la cinétique des réactions chimiques dans le mécanisme de polymérisation frontale

On peut considérer des modèles plus complexes dans lesquels nous considérons l'évolution de la concentration de photo-initiateurs (PI) dans le temps en considérant leur dégradation par photo-activation et leur fixation dans l'hydrogel. Le nombre de photo-initiateur en forme pré-photo-réaction, post-photo-réaction et fixé sur le polymère est pris en compte, ainsi que l'absorption de chaque forme. Les cinétiques de ces réactions sont sujettes aux constantes de réaction k .

L'efficacité quantique $k_{lumiere\ sur\ PI}$, fait le lien entre l'absorption de la lumière par la molécule et sa réaction chimique. La première étape de la réaction est l'activation du photo-initiateur par la lumière. Cette équation fait apparaître l'absorption de la lumière $\epsilon \cdot I(z)$ par le photo-initiateur, que l'on retrouve dans l'atténuation de l'intensité lumineuse (eq. 5.12). La seconde étape est la création et la consommation de la forme active du photo-initiateur. La troisième étape est la polymérisation de l'hydrogel. On considère ici un rapport linéaire entre les concentrations en espèces disponibles et le nombre de réactions.

$$\begin{cases} \frac{\partial C_{PI}^{initial}(z,t)}{\partial t} &= -C_{PI}^{initial}(z,t) \cdot \epsilon \cdot k_{lumiere\ sur\ PI} \cdot I(z) \\ \frac{\partial C_{PI}^{radicalaire}(z,t)}{\partial t} &= -\frac{\partial C_{PI}^{initial}(z,t)}{\partial t} - C_{PI}^{radicalaire}(z,t) \cdot C_{hydrogel}^{non-polymerise} \cdot k_{PI\ sur\ hydrogel} \\ \frac{\partial C_{hydrogel}^{polymerise}(z,t)}{\partial t} &= -\frac{\partial C_{hydrogel}^{non-polymerise}(z,t)}{\partial t} = C_{PI}^{radicalaire}(z,t) \cdot C_{hydrogel}^{non-polymerise} \cdot k_{PI\ sur\ hydrogel} \end{cases} \quad (5.17)$$

Pour améliorer le modèle, on considère maintenant que les coefficients d'absorption molaire du photo-initiateur avant et après réaction sont différents. On peut aussi considérer l'absorption de l'hydrogel, qui peut, elle aussi, avoir deux valeurs suivant son état. De manière générale :

$$I(z) = I_0 \cdot 10^{-\sum_{espece\ i} \int_0^z \epsilon_i \cdot C_i(z,t) \cdot z} \quad (5.18)$$

Ce dernier type de modèle est particulièrement utile si la solution de photo-polymères avant réaction est très absorbante, et la forme photo-réagie l'est beaucoup moins. Dans ces cas, à $t = 0\ s$, la lumière ne peut traverser qu'une fine couche du matériau, qu'elle polymérise. Cette couche devient alors quasi transparente, ce qui permet à la lumière de progresser plus profondément et de polymériser la couche suivante. Un phénomène de polymérisation frontale par différence de coefficient de coefficient d'absorption est alors en place.^{277,278}

Ces phénomènes de polymérisation frontale sont utilisés en lithographie par niveau de gris (Grayscale en anglais). L'objet est insolé de manière non uniforme afin de le façonner en 2.5 dimensions. C'est la profondeur à laquelle le seuil de polymérisation a été atteint en chaque point qui détermine son épaisseur. Une autre possibilité est d'insoler un objet fin afin que le seuil de polymérisation soit atteint sur l'entièreté. On joue alors sur son niveau de polymérisation qui modifie les propriétés mécaniques par zones de l'objet. En créant des contraintes non-uniformes, l'objet peut se plier et passer de 2D à un origami 3D.²¹² Bien que ces phénomènes soient intéressants, notre approche de photopolymérisation avec un laser dans une tête d'impression n'a pas vocation à être appliquée à ces applications. Ces modèles nous permettent par contre de vérifier la potentielle présence de polymérisation frontale.

5.5.2 Analyse numérique d'une potentielle polymérisation frontale dans le cas de 3D-FlowPrint

À la suite des modèles théoriques, nous souhaitons évaluer l'influence de la polymérisation frontale dans nos expériences, à travers l'absorption des espèces présentes et de la profondeur typique de polymérisation. Dans cette analyse, nous négligeons la diffusion optique qui peut diminuer localement l'intensité lumineuse en la propageant dans plusieurs directions de l'espace.

L'absorption ϵ du PEGDA²⁷⁹ et de l'eau²⁸⁰ à 405 nm sont négligeables dans les ordres de grandeur

en jeu ($< 1 \text{ (mol/l)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). L'absorption ϵ_{LAP} du LAP vaut respectivement 25 et 50 $(\text{mol/l})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ avant et après photo-réaction.⁸¹ Notre concentration typique en photo-initiateur dans du PEGDA est de 0.01% w/V. Avec une masse molaire de 294.21 g/mol, cela donne une concentration molaire en photo-initiateur C_{LAP} de $3.4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$. Nous pouvons donc calculer l'absorption du photo-initiateur d'après l'équation 5.12 :

$$\frac{I(z = 500\mu\text{m})}{I_0} = 10^{-C_{LAP} \cdot \epsilon_{LAP} \cdot z} = 10^{-3.4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} \cdot 50 (\text{mol/l})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 0.05 \text{ cm}} = 99.8\% \quad (5.19)$$

L'analyse montre que, dans notre configuration, l'absorption du photo-initiateur est négligeable à 405 nm. Si nous considérons une épaisseur maximale de matériau z de 500 μm , les pertes sont de 0,2%. Nous pouvons donc affirmer que ce phénomène est négligeable dans nos expériences.

Dans le cas d'une solution à 20% de GelMA, nous avons mesuré un coefficient d'absorption $C_{20\% \text{ GelMA}} \cdot \epsilon_{\text{GelMA}}$ de 0.138 cm^{-1} . En considérant une profondeur z de 500 μm , nous obtenons une absorbance de 1.6% que nous considérons aussi comme négligeable.

$$\frac{I(z = 500\mu\text{m})}{I_0} = 10^{-C_{20\% \text{ GelMA}} \cdot \epsilon_{\text{GelMA}} \cdot z} = 10^{-0.138 \text{ cm}^{-1} \cdot 0.05 \text{ cm}} = 98.4\% \quad (5.20)$$

Cette analyse numérique a été effectuée à 405 nm. Si nous avons souhaité travailler à 365 nm, la situation aurait été légèrement différente. En effet, $\epsilon_{LAP,365\text{nm}} = 200 \text{ cm}^{-1} \cdot (\text{mol/l})^{-1}$ et $C_{20\% \text{ GelMA}} \cdot \epsilon_{\text{GelMA},365\text{nm}} = 0.328 \text{ cm}^{-1}$. L'absorbance du LAP vaut alors 0.8% et celle du GelMA 3.8%.

Pour une épaisseur de matériau jusqu'à 500 μm , à 405 nm ou 365 nm, l'absorbance des solutions est inférieure à 5%. Nous considérons donc que ce phénomène est négligeable et que nous n'avons donc pas à modifier l'intensité optique pour polymériser, quelque soit la hauteur pour $0 \mu\text{m} < z < 500\mu\text{m}$.

5.6 Création de pièces 2D, 2.5, 3D et multimatériaux

À ce stade du manuscrit, nous pouvons enfin nous plonger dans la description des objets imprimés. Après un long développement méthodologique, une analyse théorique et expérimentale de l'impact des paramètres fluidiques et optiques sur la polymérisation, et une identification des paramètres d'impression, notre ambition est de réaliser plusieurs preuves de concept d'impressions depuis des structures simples tels que des réseaux de lignes isolées, des objets étendus dans des configurations 2D dont à forts rapports d'aspect puis des structures multicouches 3D. Nous concluons enfin sur la capacité du système à réaliser des impressions multimatériaux. La majorité de ces expériences ont été réalisées en PEGDA. La partie 5.6.1 s'intéressera à la transposition des méthodes d'impression au GelMA.

5.6.1 Objets 2D en PEGDA et GELMA et caractérisation de la résolution d'impression

Dans cette partie, nous décrivons des objets planaires en PEGDA et en GelMA. Nous prouvons le contrôle expérimental jusqu'à la polymérisation de ligne de 10 μm ou d'objets de 2 mm de large.

Réseaux de lignes en PEGDA et haute résolution Les résultats de l'image 5.12 sont formés de solutions de PEGDA, imagés principalement avec des nanoparticules fluorescentes. Les objets les plus simples sont des réseaux de lignes, comme ceux du schéma d'introduction (voir Fig. 2.3) et 5.10 et ceux utilisés pour l'analyse de la dose dans la partie 5.3.

Sur la figure 5.12.A, les structures ont été observées en microscopie confocale. Nous pouvons apprécier la faible rugosité de lignes, à la fois sur les parois latérales, mais aussi sur la surface supérieure des lignes. L'aspect granulaire provient la présence des nanoparticules fluorescentes en dispersion dans le matériau (concentrées à 0,01% en volume).

Les figures B et C montrent des réseaux de lignes avec une période (hatching) variable de 100 à 30 μm (B) et de 150 à 40 μm (C). Nous pouvons apprécier la résolution d'impression à la fois concernant

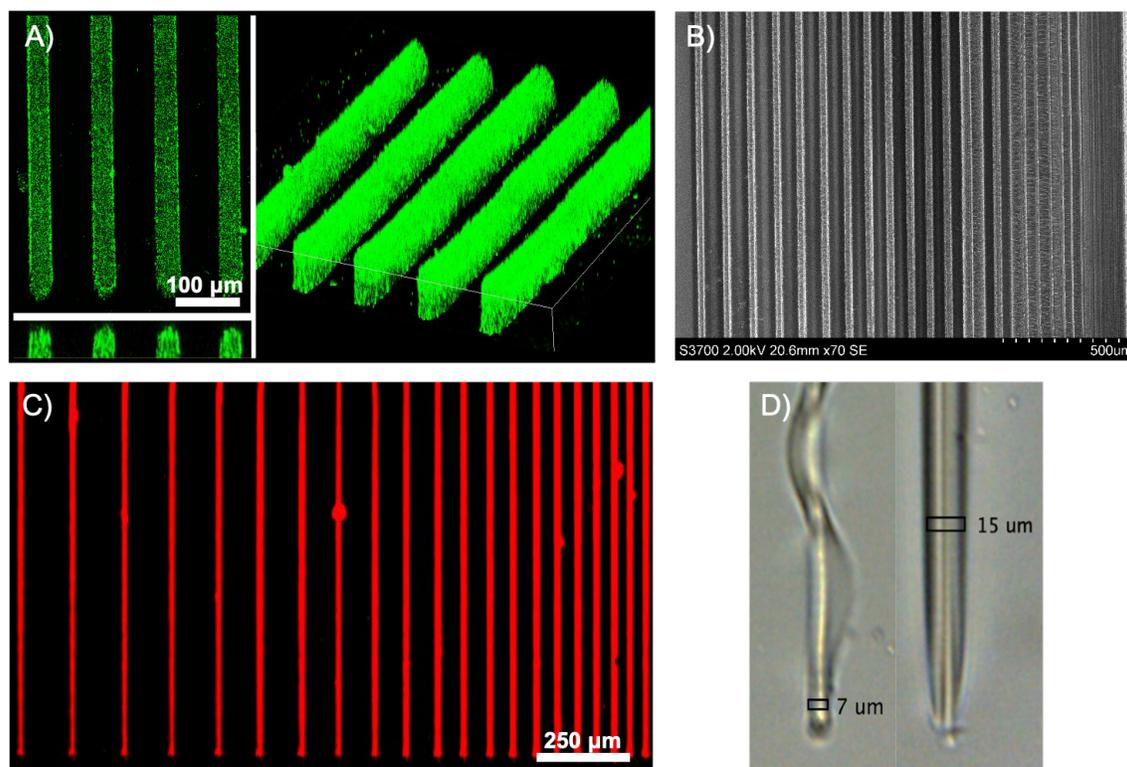


FIGURE 5.12 – Images d'impressions 2D simples en PEGDA. A) Réseau de lignes en PEGDA chargées en nanoparticules vertes. Imagés en confocal. Vue de haut, coupe et 3D. B-C) Deux réseaux de lignes en PEGDA avec distance interligne (hatching) décroissante. Images MEB et fluorescente. D) Images optiques de deux lignes en PEGDA en haute résolution, haute de 50 µm. La plus fine gondole, car son rapport de forme est très grand ($\simeq 7$ µm)

la largeur des lignes (30 et 25 µm) ainsi que dans les intervalles entre lignes. Aucun chevauchement n'est observé jusqu'à une période de l'ordre de la largeur des lignes.

L'image D démontre la capacité à imprimer des lignes en dessous de 10 µm. Avec une fibre réglée à cet effet, nous avons pu atteindre une largeur de ligne de 7 µm pour une hauteur de 50 µm. Nous démontrons ici l'un des deux objectifs de la plateforme, c'est-à-dire l'impression à 10 µm de résolution. Le second objectif étant l'impression multimatériaux.

A cette échelle, le rapport de forme (hauteur divisé par largeur) vaut environ 7, ce qui ne permet pas de maintenir la forme de l'objet. C'est pourquoi nous le voyons gondoler. En augmentant légèrement la puissance, nous obtenons une ligne large de 15 µm qui elle est stable (rapport de forme de 3.3). Nous estimons que si le besoin se présente, nous pourrions utiliser une fibre avec une lentille plus focalisante pour obtenir par exemple un spot de 1 µm. En diminuant la hauteur de la tête, nous pensons être capables d'imprimer des lignes jusqu'au micromètre de largeur à des hauteurs inférieures à 10 µm. De manière générale, nous n'avons pas cherché une résolution si basse, car nos objectifs en biologie ne le demandaient pas.

Nous pouvons voir sur la figure 5.12.B qu'en réduisant la valeur de hatching, c.a.d. en réduisant la distance entre lignes, jusqu'à environ 90% de la valeur de la largeur d'une ligne, nous sommes capables d'imprimer des surfaces continues. Il s'agit de la stratégie usuelle en SLA pour la création d'objets surfaciques puis volumiques (par l'impression de couches successives).

Impression de motifs étendus en PEGDA La figure suivante (5.13) présente toujours des structures en 2D, mais plus complexes. De réseaux de lignes dans un seul axe, nous passons à des impressions dans le plan XY, suivant plusieurs directions et formant des structures sous différentes orientations d'écriture. Ces objets sont réalisés en PEGDA, imagés principalement avec des nanoparticules fluorescentes.

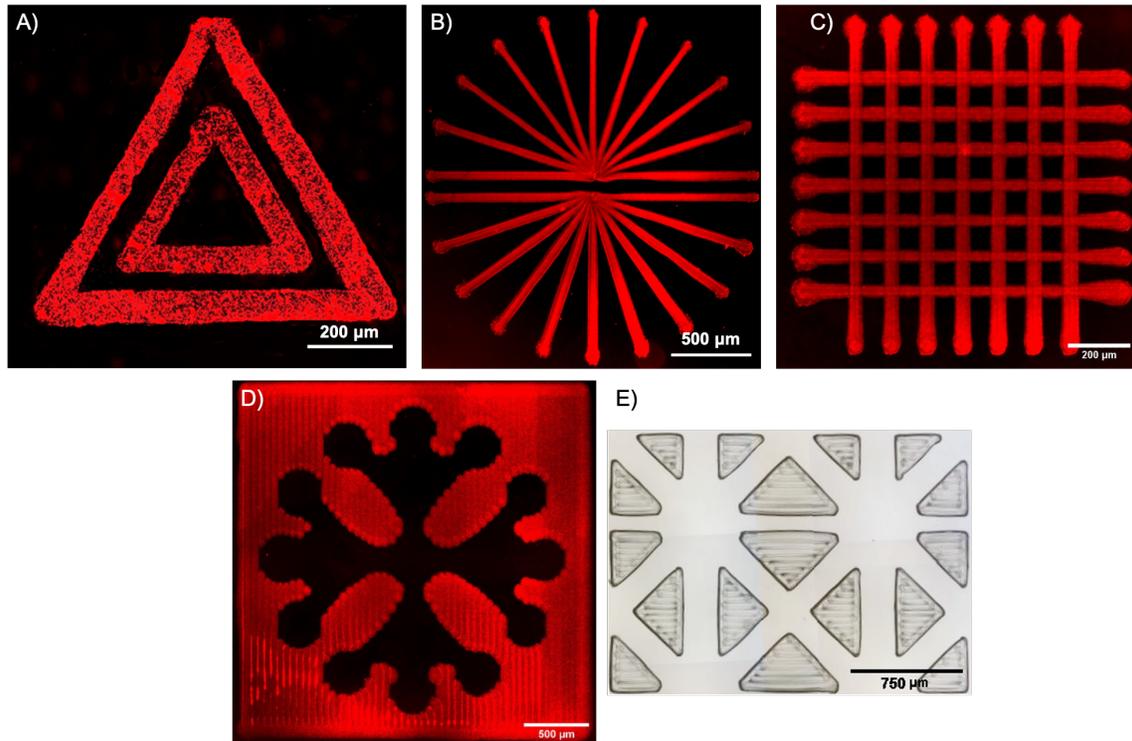


FIGURE 5.13 – Images d'impressions 2D complexes en PEGDA, imagées en fluorescence avec micro-particules rouges (A-D) ou en image optique (E). A) Deux triangles imbriqués en PEGDA. Lignes larges de $70\ \mu\text{m}$ et longues de $750\ \mu\text{m}$. B) Éventail en PEGDA prouvant la capacité à imprimer à 360° . Lignes larges de $70\ \mu\text{m}$, longues de $1\ \text{mm}$ avec un angle interlignes de 18° . C) Quadrillage en PEGDA prouvant la capacité à imprimer malgré la présence des lignes orthogonales. Lignes larges de $40\ \mu\text{m}$ et longues de $1\ \text{mm}$. D) Croix occitane prouvant notre attachement à notre région natale et notre capacité à imprimer des objets millimétriques en deux dimensions. Objet large de $3\ \text{mm} \cdot 3\ \text{mm}$. E) Objet pour la structuration de surface et le guidage du développement de sphéroïdes (voir partie 6.1.3). Objet large de $2.5\ \text{mm} \cdot 1.75\ \text{mm}$.

Les figures 5.13.A-B montrent deux structures dont les impressions ne se sont pas faites dans l'axe habituel aspiration \rightarrow injection. Nous démontrons ici la capacité de la tête d'impression à garantir un approvisionnement de matériaux et des conditions de réticulation dans toutes les directions du plan. La figure C prouve la capacité à imprimer des structures dans les deux axes et que la présence de structures orthogonales pré-existantes ne perturbe pas la réticulation. Nous observons un élargissement sur les figures B et C (de l'ordre de 25%) par la sur-polymérisation en fin de lignes due à un léger décalage de temps entre l'arrêt de la platine et l'arrêt du laser. La figure A démontre aussi qu'il est possible d'écrire des structures fermées sans perturbation de l'approvisionnement, ce qui est détaillé dans la partie 5.6.5.

Les figures D et E sont des objets plus étendus, de tailles millimétriques, toujours en deux dimensions, de $3\ \text{mm} \cdot 3\ \text{mm}$ et $2.5\ \text{mm} \cdot 1.75\ \text{mm}$. Ces images démontrent la capacité à imprimer des structures étendues avec un bon contrôle du démarrage et de l'arrêt de la polymérisation. Sur la figure D, nous pouvons apercevoir la discrétisation due à l'impression ligne par ligne dans la partie centrale. Il est possible de réaliser un contournage pour améliorer cette rugosité de bord comme sur la figure E. La figure E a servi à guider le développement et l'étalement de sphéroïdes, comme développé dans la partie 6.1.3.

Ces structures 2D nous ont permis de réaliser une première preuve de concept, de valider les paramètres instrumentaux et la stabilité de l'impression. Il s'agit d'une étape intermédiaire avant la transposition du procédé vers l'impression de structures multicouches et vers la structuration 3D. Néanmoins, comme nous le montrerons plus loin dans le manuscrit, la structuration de surface a des applications en elle-même. Celles que nous avons choisies sont les études du développement de cultures cellulaires ou d'étalement de sphéroïdes en environnement contraint (Voir partie 6.1).

Impression de structures en GelMA Nous souhaitons aussi présenter des structures en GelMA. En comparaison du PEGDA, le GelMA présente une rigidité réduite et donc une stabilité mécanique plus faible. Il est aussi plus compliqué à imager. Nous ne présenterons donc que des structures 2D du GelMA ainsi que quelques objets multimatériaux dans les paragraphes suivants.

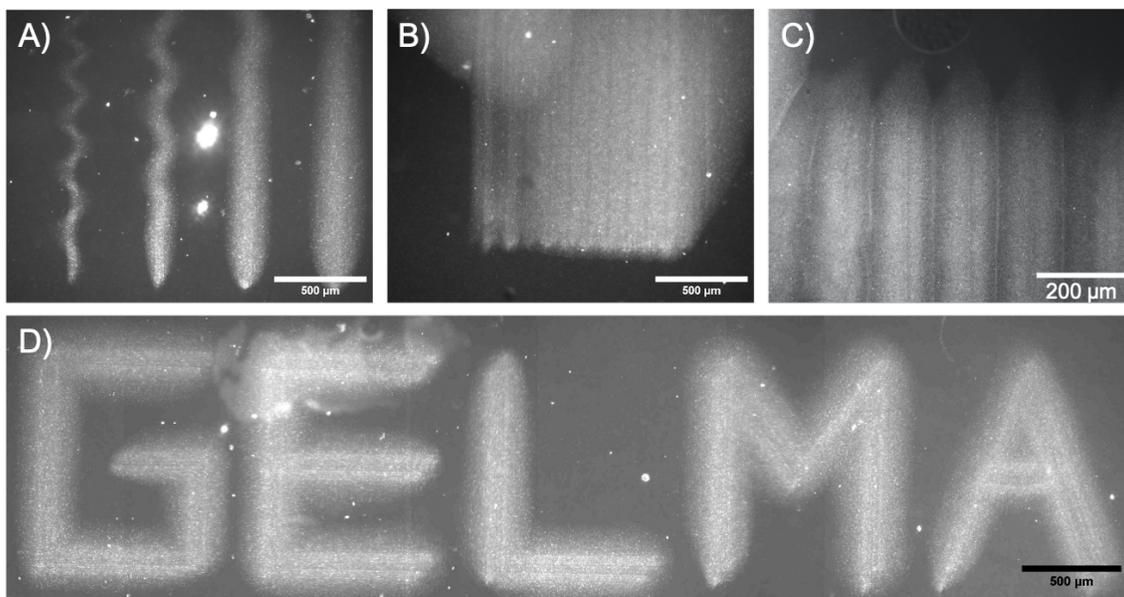


FIGURE 5.14 – Structures en GelMA, imprimées à travers une bulle d’air, observées en fluorescence. Solution : 20% de GelMA, 0.05% de LAP, 0.01% de nanoparticules. A) Réseau de lignes avec augmentation progressive de la dose. B-C) Impression de lignes unies pour créer des surfaces. D) Impression du mot *GelMA*, une métonymie en impression.

La figure 5.14 illustre une séquence d’impression du GelMA imprimée à travers une tête d’impression avec bulle d’air de quatrième génération. La figure A est un exemple de calibration de la puissance en début d’impression avec augmentation progressive de la dose de 5000 à 40000 mJ/cm². Les lignes trois et quatre sont bien imprimées avec une largeur de 200 et 250 µm. Nous avons donc décidé de travailler à 15000 et 20000 mJ/cm².

Nous avons pu constater un gonflement important (un facteur 2 a été déterminée par analyse dimensionnelle) des lignes de GelMA au moment du rinçage par de l’eau déionisée. Malgré ce biais, nous n’avons pas été capables de reproduire les résolutions obtenues avec le PEGDA.

Les figures 5.14.B-C montrent des lignes jointes. Ces tests permettent de caractériser la distance interligne nécessaire (B : 100 µm, C : 150 µm) pour une dose donnée (respectivement 15000 et 20000 mJ/cm²) afin d’obtenir une surface unie. L’idée étant ensuite de créer un objet plus complexe en deux ou trois dimensions.

Pour finir, la figure E est une projection 3D de la métonymie. L’objet est sa matière. Le GelMA imprime *GelMA*. C’est avant tout une figure à but de démonstration plutôt qu’utile.

5.6.2 Impression de structures 2.5 D monocouche

Nous avons maintenant caractérisé l’impression dans le plan XY. Maintenant, nous devons donc caractériser les impressions dans l’axe Z. Nous avons imprimé des structures 2.5D en PEGDA. Nous entendons par 2.5D une structure dans laquelle tous les éléments n’ont pas la même hauteur, mais où le laser n’est passé qu’une fois en chaque point du plan.

Nous avons imprimé des réseaux avec des hauteurs croissantes présentés sur la figure 5.15. Pour un réseau donné, chaque ligne est imprimée en un seul passage avec les mêmes caractéristiques, excepté la hauteur. Nous profitons de la capacité de polymérisation sur toute la hauteur entre la tête et le substrat, et de la faible absorbance de la solution (voir partie 5.5), pour ne pas avoir à imprimer en plusieurs passages des lignes hautes (jusqu’à 400 µm). Profitant d’une précision de placement à l’échelle

du micromètre sur la position verticale de la tête, nous pouvons créer des motifs avec une résolution en Z inférieure à 10 μm .

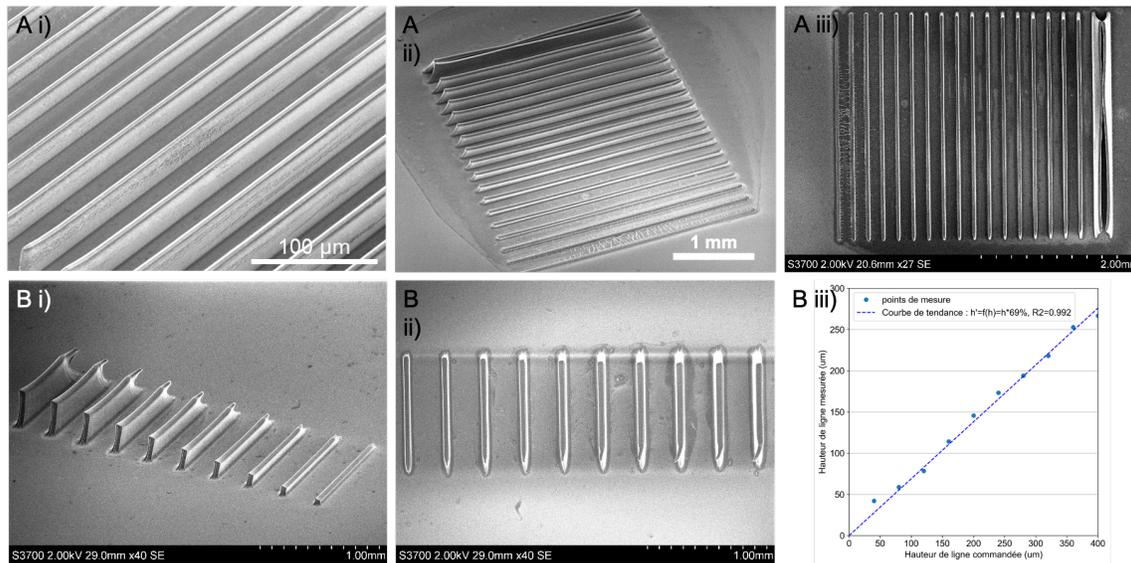


FIGURE 5.15 – Réseaux de lignes en PEGDA pour contrôle de la hauteur des lignes. Imagés par MEB. A) Réseaux de lignes avec altitudes croissantes de 0 à 400 μm par pas de 20 μm . Lignes larges de 47 μm avec des rapports d’aspect (hauteur / largeur) compris entre 0 et 5.5. B) Réseaux de lignes avec altitudes croissantes de 0 à 400 μm par pas de 40 μm . Lignes larges de 58 μm avec des rapports d’aspect (hauteur / largeur) compris entre 0 et 4.5. Images MEB (i, ii) et graphique des hauteurs mesurées versus hauteurs commandées (iii).

Les figures 5.15.A-B montrent des réseaux de 10 et 20 lignes, hautes de 0 à 400 μm par pas de 20 ou 40 μm . Nous pouvons observer la faible rugosité de la surface supérieure des lignes, par exemple sur la figure B.i.

Le séchage dû à l’observation sous vide au MEB conduit à une rétraction des objets en hydrogel. Ce phénomène est particulièrement visible en début et fin de ligne, car la contraction s’accumule dans l’axe de la ligne. Le graphique en figure C.i montre l’écart entre la mesure de la hauteur et la commande de hauteur. Nous observons une bonne régularité des points et nous trouvons une courbe de régression de la forme $h_{mesuree} = h_{commandee} \cdot 69\%$ avec un $R^2 = 99.2\%$.

La figure 5.16.A montre une échelle en PEGDA dont les barreaux ont une hauteur croissante. Les barreaux mesurent 120 μm de large avec une variabilité inférieure à 5% en fonction des lignes. Cela démontre qu’il est possible d’imprimer des lignes de largeurs constantes entre environ 100 et 300 μm de haut, pour des rapports d’aspect de 0.75 à 2.4. Nous pouvons voir que les deux grandes lignes orthogonales, imprimées en premières, ne gênent pas la polymérisation des suivantes.

De manière équivalente à la figure 5.16.A, la figure 5.16.B montre des réseaux de lignes entrecroisées à plusieurs hauteurs. Là non plus, les lignes à 60 μm n’ont pas empêché l’impression de celles à 120 μm ni à 180 μm . Enfin, l’image C montre cinq carrés imbriqués. Nous pouvons voir leur contraction, vraisemblablement due au séchage pour accomplir des images MEB.

5.6.3 Impression de structures 3D multicouches

Dans cette partie nous avons souhaité démontrer les capacités d’impression 3D de la plateforme en exploitant un processus d’impression multicouches. Les premières preuves de concept réalisées sont données dans la figure 5.17. Les objets sont de taille millimétrique et ont demandé plusieurs heures d’impression (entre une et quatre heures).

La première structure (Fig. 5.17.A) met en avant la capacité à imprimer des objets à hauts rapports de forme (ici, 3.5). Grâce à un contour autour de chaque couche, l’aspect de la structure est lisse. Le contour fait le tour des lignes parallèles d’une couche et lisse la discrétisation de ces lignes. Les interfaces entre les couches sont peu ou pas visibles ce qui témoigne d’une bonne cohésion entre ces dernières. La

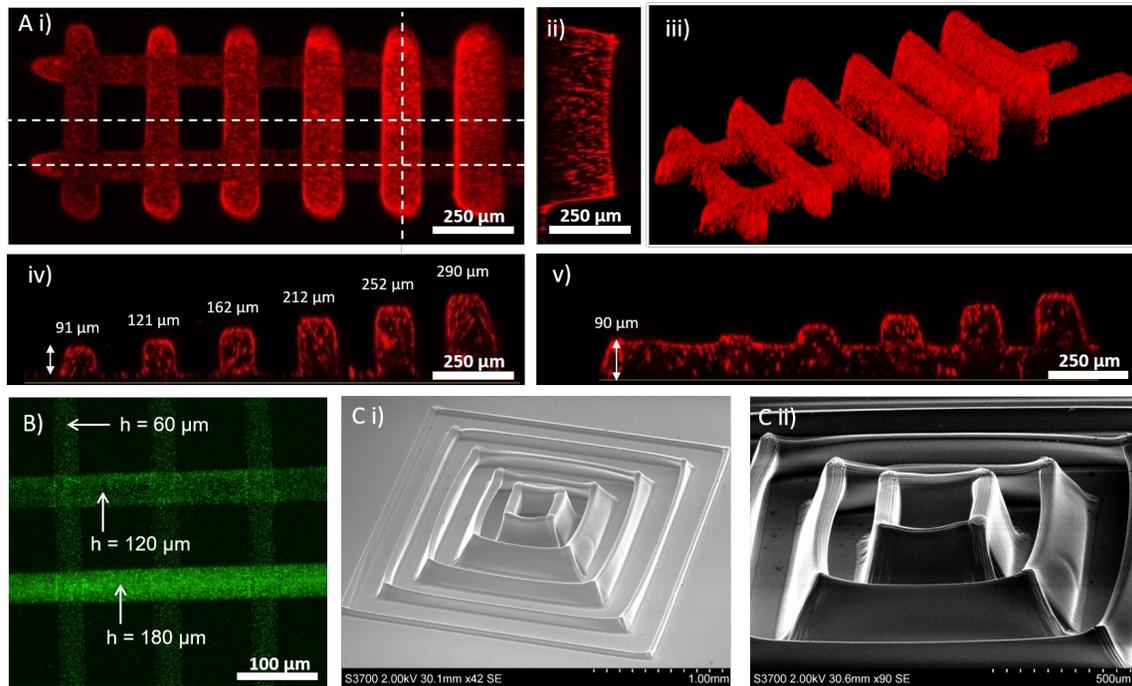


FIGURE 5.16 – Structures 2.5D en PEGDA et caractérisation en Z. A) Réseaux de lignes croisées observés en microscopie fluorescente. Largeur de ligne : $120\ \mu\text{m}$ rapport d'aspect maximal = 2.4. i) vue du plan XY. ii) coupe dans le plan YZ. iii) vue 3D. iv) coupe dans le plan XZ en dehors de l'axe d'une grande ligne. v) coupe dans le plan XZ sur l'axe d'une grande ligne. B) Réseaux de lignes croisées observés en microscopie fluorescente. Lignes à $60\ \mu\text{m}$ de haut imprimées en premier et lignes à $120\ \mu\text{m}$ et $180\ \mu\text{m}$ imprimées ensuite. Largeur de ligne : $45\ \mu\text{m}$ rapport d'aspect maximal = 4. C) Carrés imbriqués imprimés avec hauteurs croissantes vers le centre. Hauteurs : $50, 100, 150, 200, 250\ \mu\text{m}$. Largeur de ligne : $50\ \mu\text{m}$ rapport d'aspect maximum : 5. Observés en MEB. i) vue large. ii) vue proche.

stabilité mécanique de la structure associée à son rapport de forme montre également que les forces d'adhésion entre couches sont suffisantes pour réaliser des structures de hautes dimensions ($3\ \text{mm}$ de haut ici).

La seconde structure (Fig 5.17.B) est inspirée du temple mexicain Chichen Itza. Nous observons une rugosité importante à la périphérie de la structure qui témoigne de l'impression des lignes successives. Il est aussi possible de voir la différence majeure entre les deux axes du plan XY. La face droite de l'objet est colinéaire à l'axe d'impression alors que la face gauche correspond au début des lignes.

La troisième structure (Fig 5.17.C) est inspirée d'une structure Yin-Yang et est constituée de trois parties. La première constitue le socle rond comprenant à la fois le Yin et le Yang. La deuxième ne comprend qu'un seul des deux éléments. La troisième est formée par les deux cercles. La déshydratation imposée par l'observation au MEB a créé des défauts visibles sur la figure 5.17.C.i. Malgré ces défauts, nous observons que les trajectoires correspondant aux formes arrondies (les contours) sont respectées et témoignent de la capacité de la plateforme à réaliser des trajectoires complexes. Il est également intéressant de noter que le remplissage des zones centrales offre une faible rugosité ce qui témoigne de la stabilité du positionnement en Z de la tête d'impression lors de l'impression d'une couche.

La figure suivante (Fig. 5.18) est une première tentative de réalisation de structure intestinale composée de villosités (en relief) et de cryptes (invaginations). Justine Creff, précédemment doctorante au sein de l'équipe, a prouvé que la structuration 3D était vitale pour le bon développement de cultures de tissus intestinaux.⁵² Nous avons souhaité créer un objet de $2.25\ \text{mm} \cdot 2.25\ \text{mm}$ de large et haut de $800\ \mu\text{m}$ formé en 8 couches. La largeur des lignes est de $50\ \mu\text{m}$. Les villis mesurent $500\ \mu\text{m}$ de haut avec une largeur de $500\ \mu\text{m}$. Les cryptes ont une profondeur de $200\ \mu\text{m}$ et une largeur de $100\ \mu\text{m}$. Les dimensions réelles sont légèrement différentes. L'objet a été imprimé en sept heures.

Nous pouvons voir sur l'image optique que l'objet respecte de manière générale la géométrie sou-

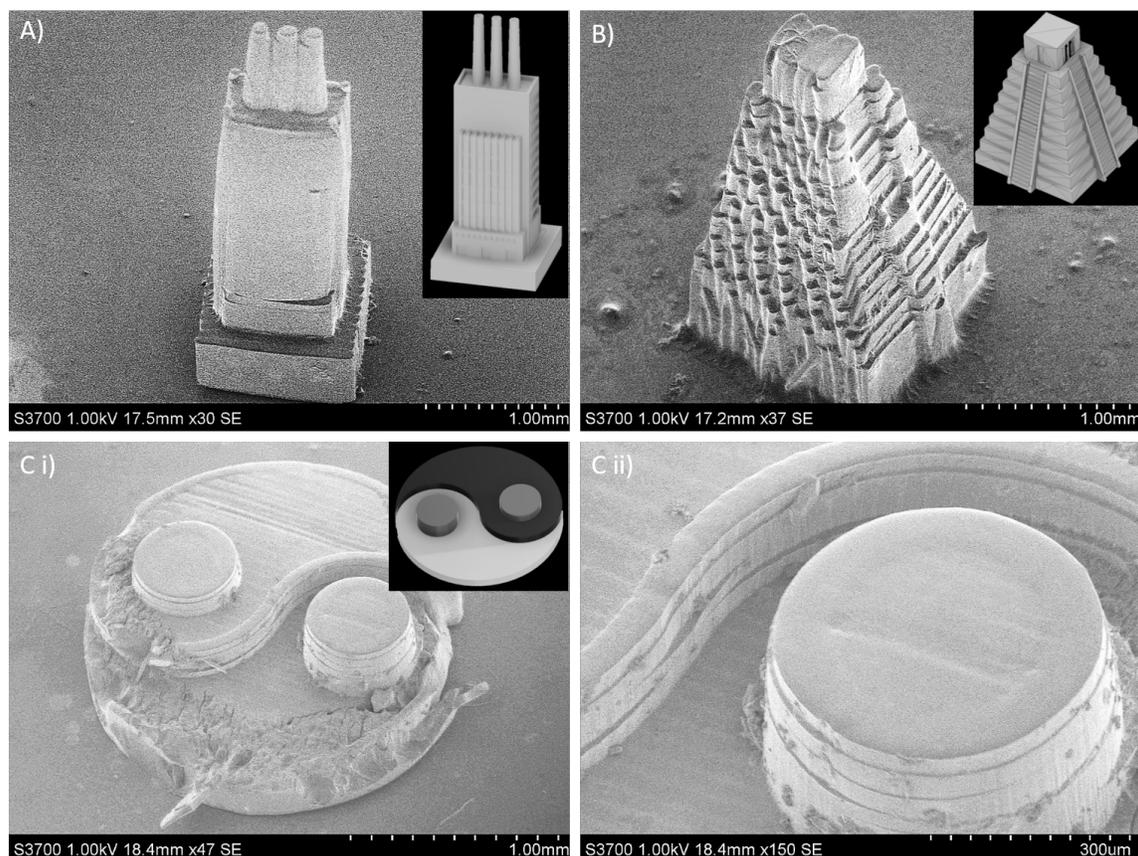


FIGURE 5.17 – Images MEB de structures millimétriques en PEGDA. Images des structures CAO en haut à droite. A) Objet de type usine à trois cheminées avec grand rapport de forme, et imprimé avec des contours autour de chaque couche. 3 mm de haut (15 couches) pour 0.85 mm de large, soit un rapport d'aspect de 3.5. B) Pyramide maya Chichen Itza sans contour. Imprimé en 23 couches de 75 μm de haut pour une hauteur totale de 1.72 mm et une largeur de 1.4 mm C) Yin-Yang avec parties arrondies. Dégradé par le séchage pour le MEB. 1.8 mm de large pour 350 μm de haut, imprimé en 9 couches. Vue large (i) et proche (ii). Imprimé avec des contours autour de chaque couche, bien visible sur la figure (ii).

haitée. L'analyse dimensionnelle est fournie dans la légende de l'image. Après le séchage pour le MEB, nous voyons que les cryptes ont leurs invaginations bien dessinées, bien que dans l'axe orthogonal à l'impression les cryptes se resserrent. Ces structures ont servi à la culture de cellules cancéreuses d'intestin Caco-2 (développé dans la partie 6.2).

5.6.4 Impression multimatériaux

Les deux objectifs majeurs de la plateforme étaient d'évaluer la résolution d'impression dans des structures 2D et 3D. Dans cette partie, nous souhaitons atteindre le deuxième objectif de notre projet et démontrer la possibilité de réaliser des impressions multimatériaux grâce au capacité d'injection microfluidique de la plateforme.

5.6.4.1 Structures hétérogènes en PEGDA

Dans cette sous partie, nous avons utilisé des solutions de PEGDA pour réaliser nos preuves de concept. La figure 5.19 montre six objets imprimés en changeant de solutions. Nous avons utilisé des solutions de PEGDA chargées en nanoparticules fluorescentes rouges ou vertes (0.01% v/v) ou sans nanoparticule. Nous avons utilisé la vanne M-switch (voir partie 2.1.2.3) qui nous permet d'alterner entre les solutions photo-polymérisables et la solution de rinçage avec du milieu.

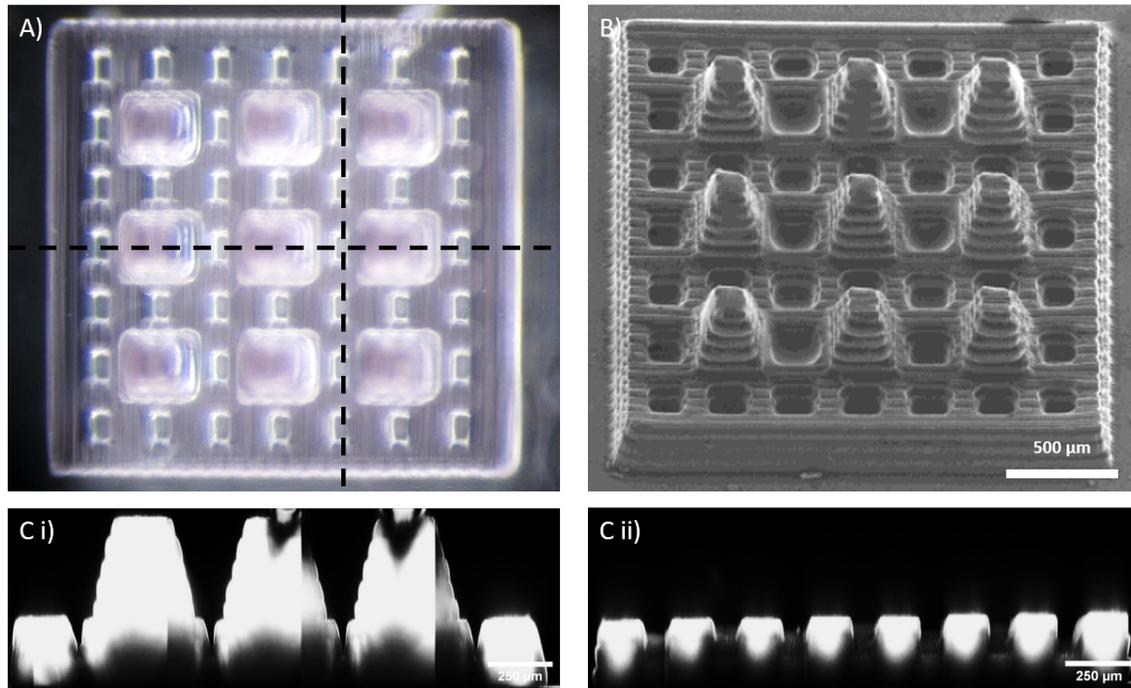


FIGURE 5.18 – Objet en PEGDA mimant la structure intestinale avec des excroissances (villi) et invaginations (cryptes). Sur la géométrie CAO, la pièce mesure 2.25 mm large et 800 μm de haut, les villis mesurent 500 μm de haut et 375 μm de large et les cryptes mesurent 200 μm de haut et 100 μm de large. La pièce a été imprimée en 8 couches de 100 μm . Pour la pièce imprimée, les dimensions totales sont 2.25 mm de large et 685 μm de haut (contraction de 14% en hauteur), les villis mesurent 350 μm · 400 μm de large et 430 μm de haut et les cryptes mesurent 90 μm · 65 μm de large et 160 μm de haut. Les cryptes se resserrent sur le plan de coupe XZ ce qui n'est pas le cas sur le plan de coupe YZ. A) image optique observée du dessus. B) Image MEB avec vue 3D. C) Images confocales biphoton de l'objet immergé dans de l'eau. Vues de coupe correspondantes aux traits pointillés sur l'image (A).

La vanne M-switch nous permet de changer de solutions mais aussi de nettoyer et rincer la tête, les tubes et les appareils fluidiques avec les solutions adaptées avant et après l'impression. Cette stratégie nous permet d'augmenter la robustesse de la plateforme en limitant les effets de colmatage dans les différents éléments microfluidiques. Grâce à cela, nous avons pu imprimer des pièces pendant plusieurs heures, ce qui était difficilement réalisable avant d'intégrer cette méthode.

Les figures 5.19.A-B montrent des lignes avec ou sans contact. Nous pouvons voir sur la figure A la faible contamination croisée entre les différentes lignes. La figure B montre un réseau de lignes parallèles au sein desquelles nous observons une légère contamination croisée avec la présence de nanoparticules non spécifiques sur la surface des lignes. La figure C est une pyramide multimatériaux. Un changement de solution a dû être opéré entre chaque couche, au contraire des figures A et B où un seul changement a été nécessaire.

La figure D permet d'observer plus en détail une couche à travers cette croix surfacique. Nous pouvons voir qu'il n'y a pas de contamination croisée. En revanche on observe clairement les multiples passages laser qui montrent bien les effets de rugosité en bords de ligne. Ces effets pourraient disparaître en réduisant le hatching et réalisant des contours.

La figure E montre un ensemble de carrés imbriqués. Les carrés ont été imprimés du plus grand au plus petit, sans contamination croisée et sans problème de changement de la solution. La technique utilisée est détaillée dans la partie suivante sur l'*injection locale*.

Enfin, la double hélice présentée en figure 5.19.F combine une large partie des capacités de la plateforme. Cet objet est millimétrique ($D = 1.85 \text{ mm}$, $h = 0.5 \text{ mm}$) et multimatériaux. Il a demandé environ 3h30 d'impression. Pour chaque couche, la vanne a changé deux fois de positions pour utiliser les trois solutions. Cet objet prouve que nous sommes capables d'imprimer des structures complexes avec des géométries internes particulières.

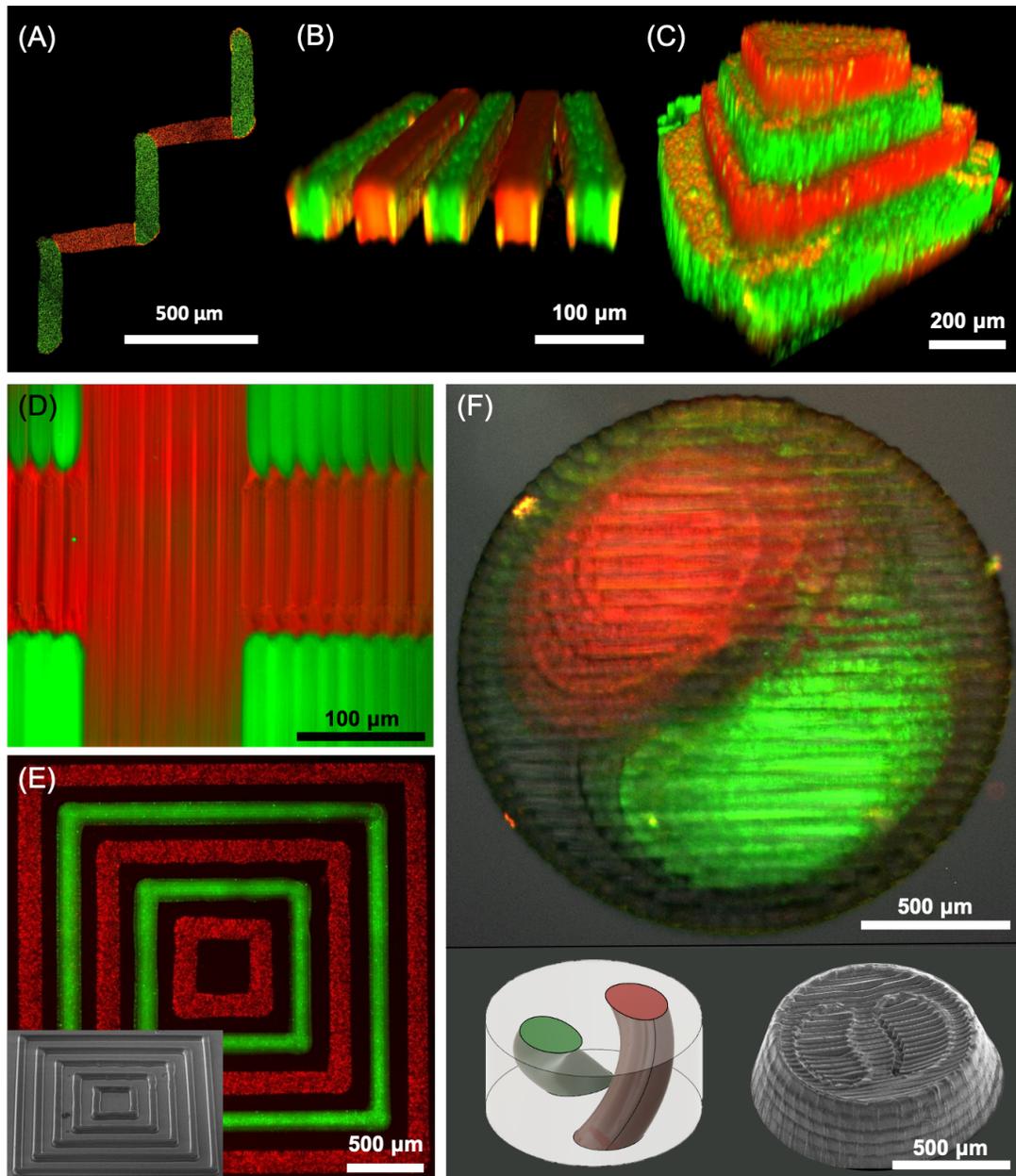


FIGURE 5.19 – Images d’objets multimatériaux en PEGDA de plusieurs couleurs. A) Lignes en zigzag, avec alternance de couleurs, observées par microscopie à fluorescence avec peu de contamination croisée. Lignes larges de $90\ \mu\text{m}$ et longues de $375\ \mu\text{m}$. B) Réseaux multimatériaux de lignes interdigitées, observés en microscopie confocale. Lignes larges de $45\ \mu\text{m}$ longue de $500\ \mu\text{m}$ et période de $70\ \mu\text{m}$. C) Pyramide 3D multimatériaux par succession de couches vertes et rouges, observée en microscopie confocale. Structure large de $850\ \mu\text{m}$ et haute de $500\ \mu\text{m}$. Une contamination en surface des couches précédentes par les nanoparticules des nouvelles couches est visible (B-C). D) Croix planaire multimatériaux sans espace entre chaque vecteur montrant une faible contamination croisée, mais un bon chevauchement entre vecteurs. Observée en fluorescence. Période entre les lignes de $28\ \mu\text{m}$. E) Carrés imbriqués multimatériaux, observés en fluorescence. Imprimés du plus grand vers le plus petit. Largeurs des carrés : 2500 , 2000 , 1500 , 1000 et $500\ \mu\text{m}$. F) Double hélice 3D multimatériaux de trois couleurs : avec nanoparticules rouges, avec nanoparticules vertes, et sans nanoparticule (gris). Observée en fluorescence, image CAO et MEB. Sur l’image en fluorescence, nous pouvons voir le décalage des ovoïdes rouges et verts au fur et à mesure des couches. Objet large de $1850\ \mu\text{m}$ et haut de $500\ \mu\text{m}$. Les hélices ont un diamètre de $570\ \mu\text{m}$.

Les différents objets présentés sur l'image 5.19 démontrent la capacité d'impression multimatériau de la plateforme 3D-FlowPrint. Il s'agit du deuxième objectif à atteindre, avec la haute résolution atteinte dans la partie 5.6.1. Nous avons montré la capacité d'imprimer des structures proches et collées sans contamination.

5.6.4.2 Réalisation de structures hétérogènes en PEGDA et GelMA

Au-delà de l'impression de PEGDA de plusieurs couleurs, nous nous sommes intéressés à l'impression de structures réellement hétérogènes. Dans cette partie, nous montrons des résultats de co-impression de motifs dans deux matériaux hydrogels : le PEGDA et le GelMA. Comme abordé dans la section 5.2, ces deux matériaux présentent un fort intérêt pour l'ingénierie tissulaire. Alors que le PEGDA présente des capacités résolutive importantes et des propriétés non-adhésives pour les cellules, le GelMA est un matériau dégradable, adapté à l'ensemencement et la prolifération cellulaire.

Nous avons utilisé les têtes de quatrième génération, avec l'impression à travers une bulle d'air, nécessaire pour l'impression du GelMA. Afin de préserver les différentes vanes et débitmètres de dépôt de GelMA sur leurs parois internes, nous avons réalisé les impressions de GelMA dans un système simplifié sans régulation par les débitmètres et sans vanne. Le changement de solution a été effectué manuellement.

Pour le PEGDA, nous avons commandé en pression avec $P_{in} = 10 \mu\text{l}/\text{min}$ pour l'injection et $P_{out} = -65 \mu\text{l}/\text{min}$ pour l'aspiration. Pour le GelMA nous avons commandé en pression avec $P_{in} = 30 \mu\text{l}/\text{min}$ et $P_{out} = -200 \mu\text{l}/\text{min}$. Nous avons travaillé à 37°C pour que le GelMA soit liquide. La hauteur entre la bulle et le substrat est de $100 \mu\text{m}$. La vitesse de déplacement de la tête est de 0.1 mm/s . La puissance optique est (après soustraction des pertes, voir partie 5.1) 0.3 mW pour le PEGDA et 1.2 mW pour le GelMA.

La figure 5.20 présente les impressions réalisées lors d'une expérience PEGDA-GelMA. Le GelMA est chargé en nanoparticules fluorescentes vertes à $0.01\% \text{ v/v}$ et le PEGDA est chargé en nanoparticules fluorescentes rouges à $0.01\% \text{ v/v}$. Les images A et B sont mono-couches alors que les images C sont des superpositions de 4 couches.

Nous pouvons voir que les lignes du motif de PEGDA, du fait du contraste du matériau, sont clairement visibles et permettent de distinguer les trajectoires laser. Au contraire, les motifs de GelMA montrent une structure continue homogène, sans fluctuation apparente des propriétés du matériaux (voir Fig. 5.20.C.i). Nous avons ici démontré la capacité d'impression multimatériau entre deux matériaux hétérogènes.

5.6.5 Impression de zones creuses

La question de l'impact des structures en cours d'impression sur la distribution des flux et sur l'approvisionnement de la zone de polymérisation est une question centrale. Dans le cas d'une impression monomatériau, cet aspect peut être négligé car l'ensemble de la zone d'impression est occupée par la solution photopolymérisable tout au long de l'impression (voir partie 4.4). Dans le cas d'une impression multimatériau, cet aspect revêt une importance critique car il est nécessaire de pouvoir approvisionner la zone d'impression par un nouveau matériau ou par une solution de lavage.

La figure 5.19.E montre un cas de figure typique de l'impression de structures creuses, où l'approvisionnement au centre peut être complexe. Nous avons alterné entre deux solutions de PEGDA, l'une chargée en nanoparticules rouges et l'autre chargée en nanoparticules vertes. Il s'agit d'une structure composée d'une série de carrés imbriqués, imprimés du plus grand au plus petit.

La figure 5.21.A illustre la séquence de l'impression classique des deux premiers carrés de cette figure. Sur ces figure, la tête a deux canaux optiques. Celui utilisé est celui du bas. Le plus grand carré est imprimé en premier en vert. Il mesure 2.5 mm de large, soit $1250 \mu\text{m}$ entre le centre et le haut (coté injection). Le carré est imprimé depuis l'angle en bas à gauche en tournant dans le sens horaire. La séquence imprime le premier carré, puis la tête d'impression se place dans l'angle en bas à gauche du second carré et la vanne change de position afin d'approvisionner en nouveau matériau (rouge). Cependant, le canal d'injection est situé en dehors du carré et les flux contournent ce carré. Le second carré est donc imprimé avec la première solution, toujours en place dans la zone de polymérisation. Ainsi, l'approvisionnement de la solution dans une zone creuse (plus petite que la distance entre le

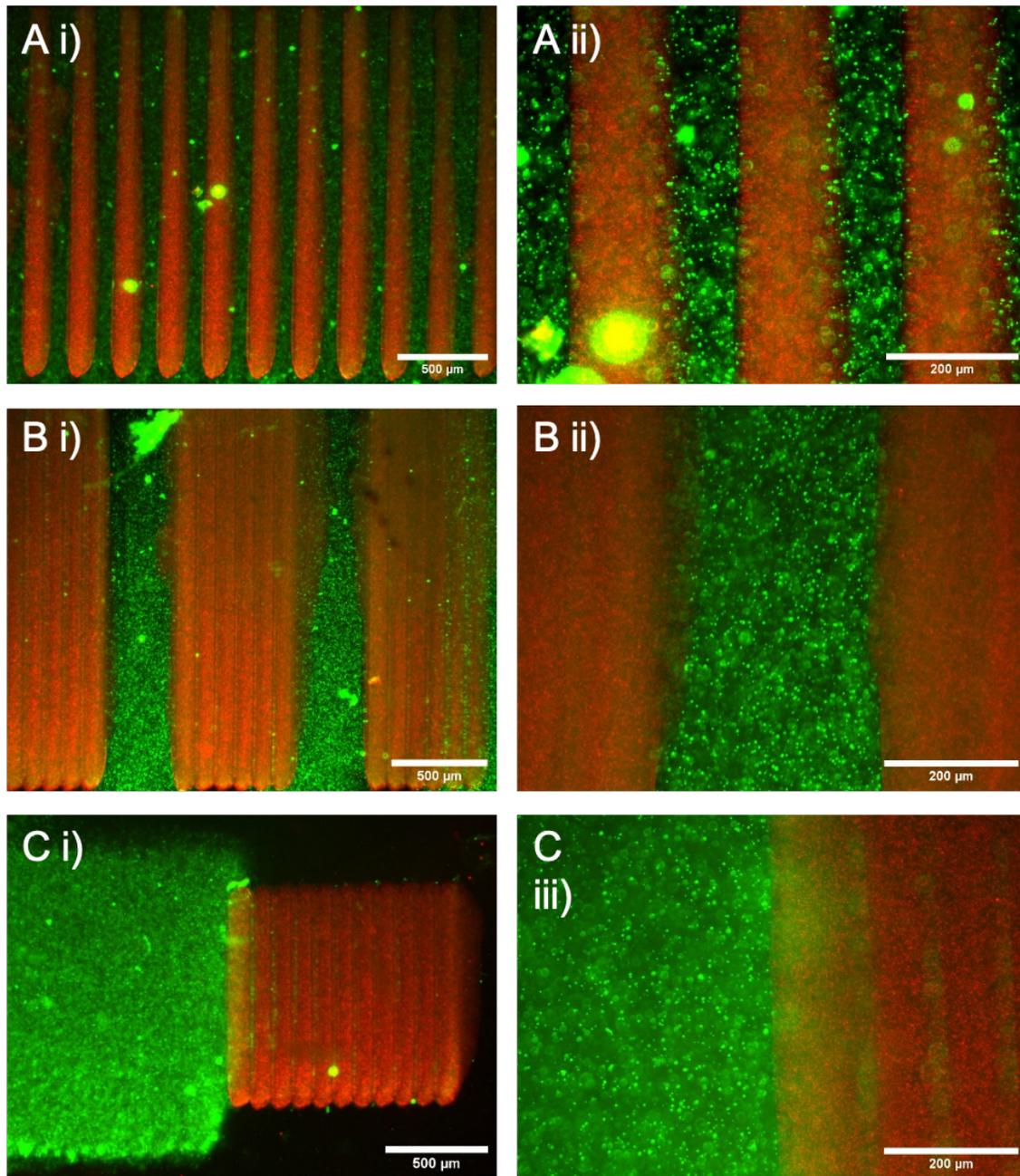
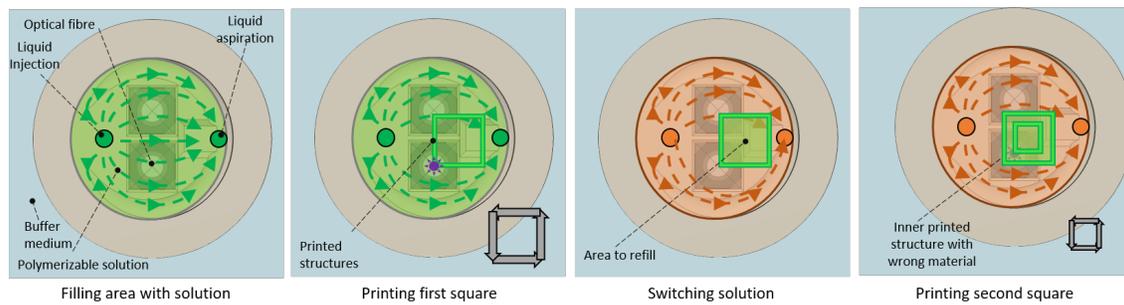


FIGURE 5.20 – Impressions multimatériaux GelMA-PEGDA, observées en fluorescence. GelMA chargé en nanoparticules vertes, PEGDA chargé en nanoparticules rouges. Impression du PEGDA puis du GelMA, excepté pour les cubes où les deux matériaux étaient alternés au fur et à mesure des couches. Vues larges (i) et vues proches (ii). A) Réseaux interdigités de PEGDA et GelMA. B) Surfaces intercalées de PEGDA et de GelMA. C) Deux cubes fabriqués en plusieurs couches de PEGDA et GelMA

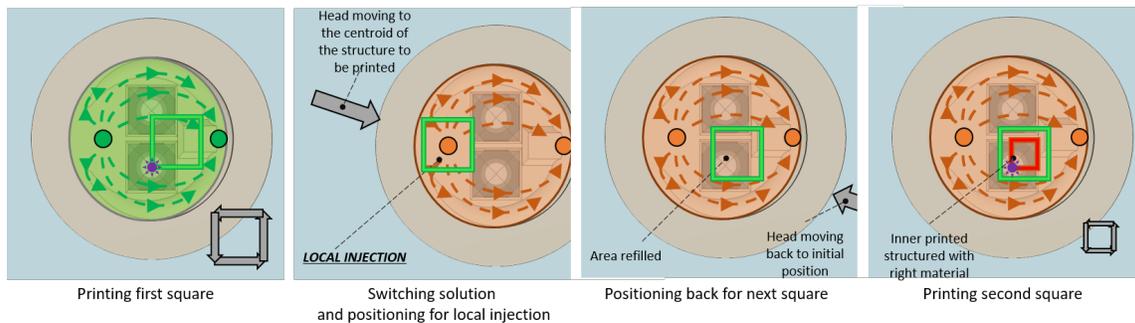
canal d'injection et le centre de la tête) pose problème pour l'impression de structures multimatériaux.

Nous avons mis en place un système d'*injection locale* présenté sur la figure 5.21.B. Dans ce cas, au changement de solution, le canal d'injection est positionné au-dessus du centre de l'objet. Ainsi le nouveau matériau (rouge) renouvelle la zone creuse. Le second carré est donc imprimé avec le bon matériau. Ce mécanisme est opéré par une sous-fonction du programme de commande instrumental LabVIEW.

La figure 5.19.E prouve la réussite de cette méthode. La figure 5.19.F a aussi été imprimée avec cette technique. En effet, en imprimant en premier le matériau gris, les matériaux rouges et verts devaient



(a) Protocoles pour l'impression sans injection locale et problème pour les objets multimatériaux dans des zones isolées. Lors du changement de matériau, le canal d'injection est situé en dehors du carré. La nouvelle solution ne remplace pas l'ancienne. Le second carré est donc constitué du premier matériau.



(b) Protocoles pour l'impression avec injection locale et capacité d'impression d'objets multimatériaux dans des zones creuses. Lors du changement de matériau, le canal d'injection est positionné au dessus du carré. La nouvelle solution remplace l'ancienne. Le second carré est donc constitué du second matériau.

FIGURE 5.21 – Schémas pour l'utilisation ou non du protocole d'injection locale pour l'impression multimatériaux dans des zones creuses. Vue du dessous. Sur ces figure, la tête a deux canaux optiques. Celui utilisé est celui du bas.

être imprimées dans les deux trous de la double hélice. Lors du premier changement de matériau (gris vers rouge), le canal d'injection était placé au-dessus du trou de la première hélice. Puis lors du second changement de matériau (rouge vers vert), le canal d'injection était placé au-dessus du trou de la seconde hélice.

Conclusion et perspectives sur la photopolymérisation sous écoulement

Conclusion Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord caractérisé le faisceau laser permettant de photopolymériser les hydrogels-acrylate. Nous avons proposé une méthode de mesure de l'intensité totale et de la distribution spatiale d'énergie. Nous avons aussi décrit le concept de tête d'impression avec deux fibres optiques afin de pouvoir imprimer avec deux tailles de spot optique pour gagner en vitesse d'impression et également à des résolutions différentes.

Nous avons ensuite approfondi les aspects chimiques. Nous avons décrit les deux matériaux hydrogels que nous avons utilisés, le PEGDA et le GelMA, ainsi que le photo-initiateur activant la photoréticulation. Nous avons caractérisé les doses seuil d'insolation (avec une source homogène) pour les deux hydrogels avec plusieurs concentrations en polymère et en photo-initiateur. Nous avons aussi détaillé le traitement de surface sur le substrat qui sert d'accroche covalente au polymère réticulé ainsi que l'interaction entre les hydrogels et le PDMS à la surface de la tête. Cette réflexion a mis en avant le problème d'adhésion entre le PDMS et le GelMA que nous avons résolu avec les têtes d'impression de quatrième génération, avec une bulle d'air.

Par la suite, nous avons transféré nos connaissances à la plateforme 3D-FlowPrint pour caractériser

la dose seuil de photo-polymérisation en flux. Nous avons étudié l'influence de la vitesse de déplacement de la tête d'impression et de la puissance optique sur la largeur des lignes imprimées. Nous avons proposé plusieurs modèles, théoriques et expérimentaux, pour corrélérer la dose seuil aux paramètres expérimentaux et pour déterminer la vitesse d'impression volumétrique.

Nous avons pu décrire le fonctionnement de la photo-polymérisation en flux et réaliser plusieurs preuves de concept d'impression de structures 2D et 3D en conditions de flux microfluidiques. Nous avons réalisé des analyses dimensionnelles sur des réseaux de lignes dans les plans XY et dans l'axe Z. Nous avons étudié la capacité d'impression multimatériaux et la contamination croisée, soit avec plusieurs solutions de PEGDA, soit avec du PEGDA et du GelMA. Nous avons évalué la robustesse du procédé en démontrant des longues impressions (jusqu'à 7h) et montré que le processus n'était pas impacté ni par la complexité de structures ni par la présence des structures en cours d'impression.

En résumé ce chapitre nous a permis d'établir une preuve de concept de la fonctionnalité de la technologie 3D-FlowPrint afin d'imprimer de manière reproductible des objets 3D avec une résolution jusqu'à 10 μm et permettre des impressions multimatériaux. Un travail important de caractérisation des paramètres opérationnels et de développement logiciel nous a permis également de proposer une plateforme fonctionnelle.

Perspectives En perspectives, d'autres matériaux pourraient être testés. D'autres types de PEGDA pourraient être utilisés, comme du PEGDA 4000 où les chaînes sont assez longues pour permettre un développement biologique. Du PEGDA RGD (Arg-Gly-Asp) fournirait directement des ancrages pour des cellules.²⁸¹ Il serait intéressant de travailler avec différentes concentrations de GelMA ou de PEGDA pour obtenir des objets aux propriétés mécaniques adaptables. Ensuite, il serait possible de travailler avec de nouveaux matériaux, tout en gardant la polymérisation via les acrylates, comme l'acide hyaluronique méthacrylate (HAMA),²⁸² le collagène méthacrylate (ColMA),²⁸³ l'alginate méthacrylate (AlgMA),²⁸⁴ ou encore le chitosan méthacrylate (ChiMA).²⁸⁵⁻²⁸⁷

Dans ce travail, nous avons considéré un seul photo-initiateur, le LAP. D'autres photo-initiateurs seraient envisageables, comme l'éosine qui s'active dans le vert.^{269,288} En augmentant la longueur d'onde, l'albumine serait polymérisable avec de la lumière infrarouge.¹⁵² Ces perspectives soulignent la variété de matériaux disponibles en bioimpression 3D et le potentiel qui en résulte.

L'utilisation d'un Air-Flow Meter permettrait de réguler les flux de GelMA. Jusqu'ici, nous avons utilisé des débitmètres où les solutions traversaient le capteur. Pour l'impression de GelMA, nous ne nous en sommes pas servi par peur de les boucher. Un Air-Flow Meter mesure le débit induit par un contrôleur de pression par le biais de l'air déplacé. Le capteur est placé sur le canal pneumatique qui pousse l'air dans le tube de solution. Par ce biais, nous pourrions contrôler les flux de GelMA et diminuer les volumes morts.

Chapitre 6

Études biologiques avec la plateforme d'impression 3D

6.1	Réalisation de structures en PEGDA pour le guidage de cellules et de sphéroïdes .	147
6.1.1	Description du protocole expérimental	147
6.1.2	Prolifération de cellules dans un environnement contraint	148
6.1.3	Culture de sphéroïdes dans des environnements contraints	149
6.2	Réalisation de structures support en 3D pour la culture cellulaire	152
6.3	Étude de la viabilité des cellules dans un procédé de bioimpression	152

Dans ce chapitre, nous présentons les perspectives d'application de la plateforme 3D-FlowPrint dans le domaine de la biologie sous trois aspects : tout d'abord, la structuration de surfaces en PEGDA pour la croissance de cellules dans des environnements 2D contraints, puis la croissance de sphéroïdes dans des environnements 3D et enfin l'impression de cellules encapsulées dans un hydrogel.

6.1 Réalisation de structures en PEGDA pour le guidage de cellules et de sphéroïdes

Dans cette partie, nous montrons des résultats d'expériences où nous avons souhaité utiliser les propriétés anti-adhésives du PEGDA pour réaliser des structures de guidage de la migration ou de la prolifération des cellules.

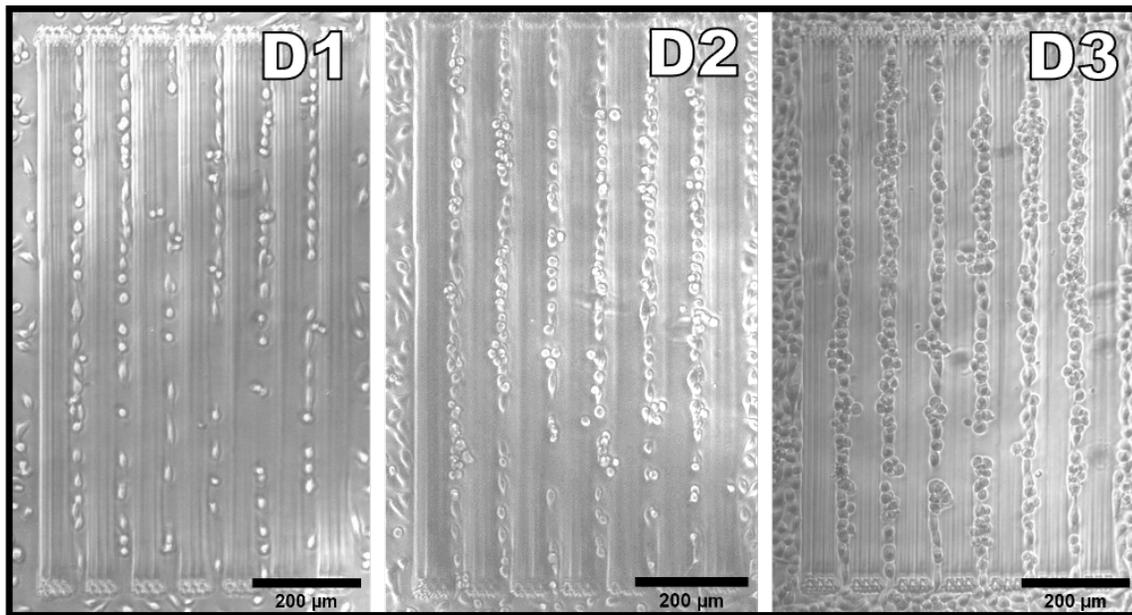
6.1.1 Description du protocole expérimental

Dans la perspective de son utilisation pour des applications biologiques, nous avons établi des procédures et protocoles (dont n°18, p.186 en annexe) pour atteindre un niveau de stérilité et de compatibilité biologique adapté à la culture cellulaire. Bien que l'imprimante ne soit pas sous PSM, ces protocoles nous ont permis de réaliser plusieurs preuves de concepts qui seront décrites dans les paragraphes 6.1.2, 6.1.3 et 6.2. Ces travaux ont été réalisés en collaboration étroite avec Marie-Charline Blatché et Bastien Venzac, travaillant au LAAS.

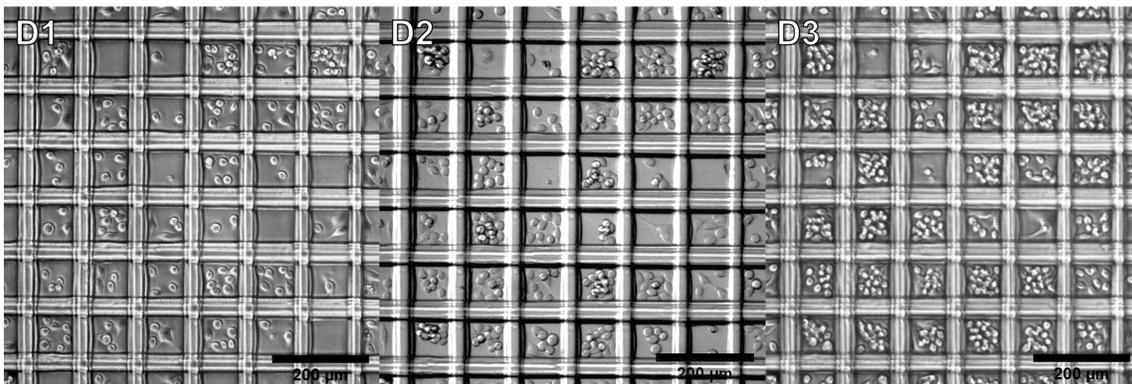
6.1.2 Prolifération de cellules dans un environnement contraint

Nous avons utilisé les propriétés du PEGDA pour guider la croissance de cellules dans des environnements contraints d'un point de vue topologique. Pour cela nous avons imprimé des structures en PEGDA (qui est non adhérent) sur des surfaces de verre.

Nous avons réalisé des structures de guidage sous forme de réseaux de lignes périodiques, de réseaux de lignes de périodes variables ou convergentes et des quadrillages. Ces motifs sont hauts de 50 μm . La structure de l'image 6.1.A est formée d'un réseau de blocs de trois lignes qui se touchent. La période inter-lignes est de 11 μm et inter-blocs de 50 μm . Ces blocs ont un rapport d'aspect de 1. La structure de l'image 6.1.B est un quadrillage de lignes larges de 40 μm et espacées de 110 μm . La structure de l'image 6.2.A est similaire à l'image 6.1.A. Les blocs sont formés de trois lignes avec une période inter-lignes de 20 μm et une période inter-blocs de 0, 20, 40, 60 μm . La structure de l'image 6.2.B est formée d'un réseau de lignes larges de 15 μm (rapport de forme de 3.3) avec une période décroissante de 125 à 50 μm . Les structures des images 6.2.C-D sont décrites dans la partie 5.6.1.



(a) Évolution de la prolifération de cellules dans un réseau de lignes. A J1, quelques cellules se sont positionnées entre les lignes. A J2, les cellules prolifèrent le long de l'espace libre. A J3, les cellules émergent de l'espace inter-lignes. Hauteurs des structures = 50 μm .



(b) Évolution de la prolifération de cellules ensemencées au dessus d'un quadrillage en PEGDA. Hauteurs des structures = 50 μm .

FIGURE 6.1 – Images de l'évolution de culture de cellules PC3 en environnement contraint par des structures de PEGDA. Imagées à J1, J2, J3.

Pour ces motifs, le concept 3D-FlowPrint nous permet d'atteindre des résolutions de l'ordre de la

cellule eucaryote puisqu'il permet d'imprimer des lignes avec des intervalles inter-lignes atteignant 10 μm (voir partie 5.6.1) ou 15 μm pour la figure 6.2.B.

Nous avons utilisé des cellules de lignées cancéreuses de prostate PC3-transfectées pour exprimer la GFP comme modèle de culture. Les cellules ont étéensemencées à 10 000 cellules/ cm^2 dans du RPMI avec 10% de SVF, 1% de pénicilline - streptomycine - G418. Elles ont été incubées à 37°C avec 5% de CO_2 pendant trois jours.

La figure 6.1 montre l'évolution de la prolifération cellulaire à J1, 2 et 3 après ensemencement dans le cas de réseaux de lignes et de quadrillages. Dans les deux cas, nous voyons une augmentation claire de la densité cellulaire dans les motifs (quadrillage) ou entre les lignes de PEGDA, sans atteindre la confluence. Nous voyons que la sélectivité d'adhésion entre le verre et le PEGDA est maintenue tout au long de la culture, car les cellules adhère à l'un et pas à l'autre. Nous voyons aussi que l'adhésion des structures sur la surface est maintenue tout au long de la culture ce qui permet de conserver l'effet de confinement géométrique.

Nous avons aussi imagé des cellules aux jours 1, 2 et 3 en lumière blanche en transmission, puis au jour 3 au microscope à fluorescence. Nous avons pu observer l'augmentation de la densité au fur et à mesure de la culture. Sur l'image 6.1, les cellules occupent l'espace aux jours 1 et 2. Au jour 3, elles ont rempli l'espace disponible. Certaines sont visibles en dehors du plan basal de la lamelle verre. Sur la figure 6.1A, il est possible de distinguer des cellules émergeant de l'espace inter-lignes haut de 50 μm .

Au jour 3, nous avons observé les échantillons avec un microscope en épifluorescence (voir Fig. 6.2). Les structures en PEGDA sont visibles grâce aux nanoparticules (rouge), les noyaux sont marqués au DAPI (bleu) et les membranes sont visibles, car les cellules expriment la GFP (vert). L'effet anti-adhérent du PEGDA est effectif et bien visible. L'effet de confinement cellulaire est également démontré de J1 à J3, pour une hauteur de 50 μm et des rapports d'aspect de 0.8, 3.3 et 0.8 (respectivement pour les figures 6.2.A-B-D).

Nous observons également une très bonne stabilité des structures sur la surface de verre en condition de culture. De nouveau, une sélectivité dans la position des cellules qui confirme l'effet anti-adhérent du PEGDA sur des cultures jusqu'à J+3 sur des réseaux de lignes, mais aussi sur des motifs étendus comme ceux de la figure 6.2.C. Sur l'image A où les lignes sont jointes, quelques cellules PC3 sont tout de même visibles, positionnées dans l'espace fin ($< 10 \mu\text{m}$) entre deux lignes.

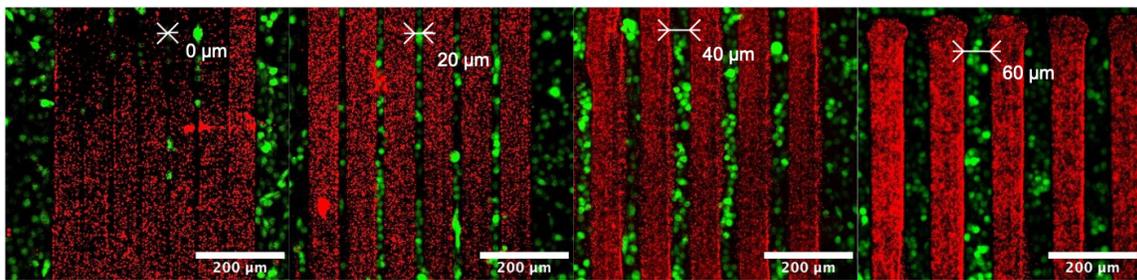
Sur la figure B, obtenue sur un réseau de lignes de période décroissante, il est possible d'observer les cellules proliférer depuis l'extérieur de la structure vers l'espace intérieur entre les lignes. L'effet de confinement est efficace malgré la finesse des lignes de 15 μm avec un rapport d'aspect de 3.3. Nous ne pouvons pas conclure sur l'influence de la distance inter-lignes sur la progression cellulaire, car des cellules et des espaces sont visibles autant pour des espaces de 100 μm ou de 30 μm .

D'autres points peuvent être notés : les cellules prolifèrent indifféremment sur la surface du verre loin ou proche du PEGDA sur la figure C. Il est possible de noter des cellules ayant migré jusqu'à un espace restreint de 10 μm entre deux lignes convergentes sur la figure D. La technologie 3D-FlowPrint nous a permis d'explorer le développement cellulaire dans des conditions géométriques spécifiques et ajustées.

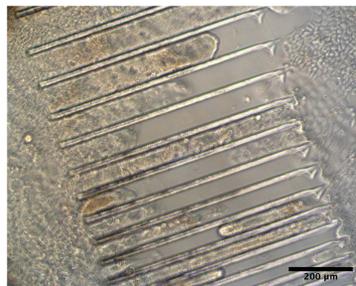
6.1.3 Culture de sphéroïdes dans des environnements contraints

Nous avons souhaité étudier la possibilité d'utiliser une stratégie similaire à celle présentée précédemment pour contrôler le comportement cellulaire à des échelles de dimensions supérieures. La capacité de notre plateforme à créer des structures multi-échelles ouvre des perspectives pour contrôler le développement d'assemblages multicellulaires et envisager la formation de modèles de tissus. Nous avons transposé l'approche présentée au paragraphe précédent à la manipulation de sphéroïdes. Nous avons étudié comment la migration cellulaire de sphéroïdes ASC humains pouvait être contrôlée dans l'espace à l'aide de structures de guidage basées sur leurs propriétés anti-adhésives. Notre objectif est de montrer que ce type de structure permet d'analyser les interactions potentielles entre les zones de confinement et d'étudier l'impact de la dimension des canaux sur la prolifération cellulaire.

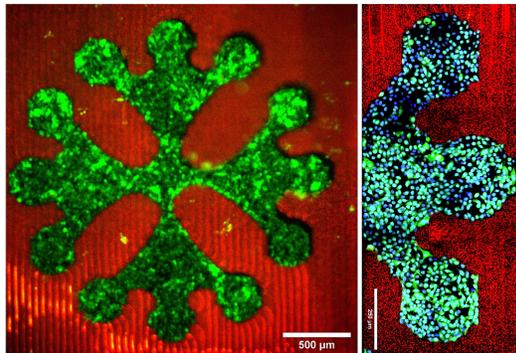
Nous avons imprimé des structures en PEGDA constituées d'un réseau de cavités interconnectées par des canaux. La hauteur des structures est de 500 μm . La taille des cavités a été ajustée à la dimension des sphéroïdes de l'expérience, soit 475 μm de diamètre. Nous avons choisi de créer des canaux de différentes tailles (100, 150, 200 μm). La lamelle substrat est traitée après l'impression avec de la



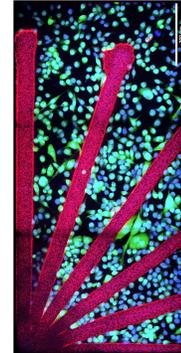
(a) Comparaison de la prolifération des cellules en fonction de l'écart entre les réseaux de lignes. De gauche à droite, l'espace inter-lignes est large de 0 μm , 20 μm , 40 μm et 60 μm . Rapport d'aspect de 0.8.



(b) Réseaux de lignes avec période décroissante de 125 μm à 50 μm . Observés à J3. Rapport d'aspect de 3.3.



(c) Croix occitane ensemencée observée à J3. Image vue large (cytoplasme marqué en vert par les cellules exprimant la GFP) et image vue proche (cytoplasme marqué en vert par les cellules exprimant la GFP et noyaux marqués en bleu au DAPI)



(d) Éventail ensemencé. Les cellules prolifèrent jusqu'au bout de lignes jusqu'à des espaces de 10 μm .

FIGURE 6.2 – Images à J3 de la prolifération de cellules PC3 en environnement contraint par des structures de PEGDA. PEGDA visible avec nanoparticules rouges (0.01% v/v), cytoplasme en vert par les cellules exprimant la GFP, noyaux marqués en bleu (DAPI)

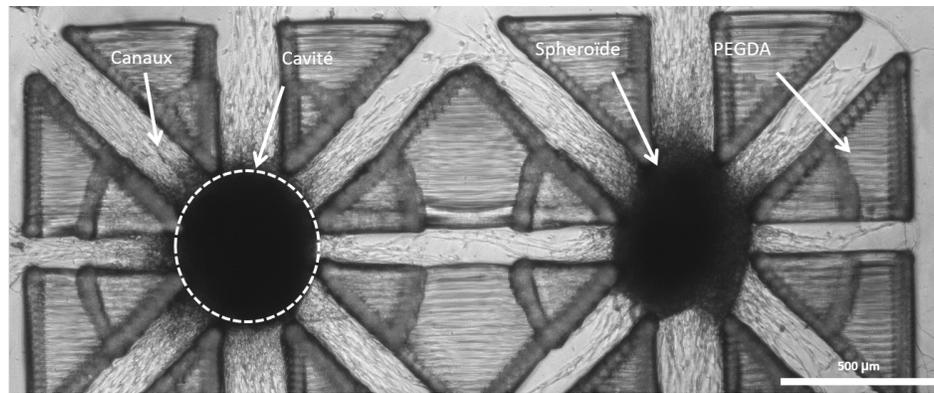
fibronectine (solution à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fibronectine, 37°C pendant une nuit et lamelle rincée avec du PBS 1x).

Ces travaux ont été réalisés grâce à une collaboration avec le laboratoire toulousain Restore. Une biologiste partenaire, Mélanie Escudero, a préparé les sphéroïdes, à isoler des cellules souches adipeuses humaines (hASC) à partir de cellules primaires.^{289,290} Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique institutionnel du ministère français de la Recherche (N° : DC-2015-23-49) et le consentement éclairé a été obtenu de tous les sujets conformément aux directives institutionnelles sur la manipulation et l'utilisation des tissus humains. Les hASC ont été amplifiées dans un milieu de croissance de cellules endothéliales puis des sphéroïdes ont été générés en ensemencant 50 000 cellules dans les puits de plaques à fond rond à 96 puits à attachement ultra-faible (ULA, Corning Incorporated Life Sciences).

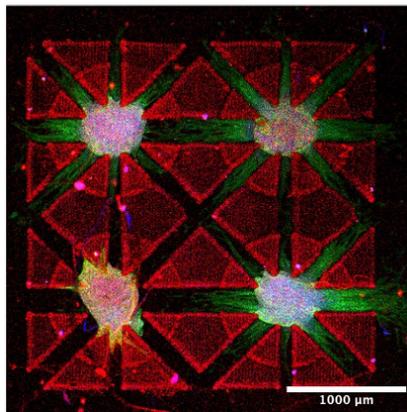
Les sphéroïdes ont été manipulés individuellement et déposés avec une pipette dans chaque cavité de la structure en PEGDA dans un volume minimal de milieu pour couvrir l'ensemble de la structure imprimée. Un excès de milieu permettait aux sphéroïdes de surnager et diminuait la capacité de blocage des sphéroïdes dans les cavités. Du milieu est rajouté après quelques heures, puis les sphéroïdes ont été maintenus pendant 3 ou 6 jours.

Les sphéroïdes ont été observés au microscope confocal, après un marquage de l'actine et de l'ADN (voir Fig. 6.3). La coloration de l'actine a révélé qu'en fin d'expérience, la prolifération des sphéroïdes était limitée aux canaux adhésifs et contraint par les structures en PEGDA sur toute la hauteur.

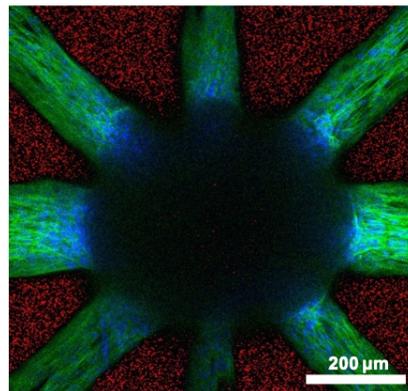
La colonisation cellulaire n'était limitée que par la géométrie du PEGDA indépendamment de la taille des canaux (200 μm , 150 μm et 100 μm). Nous avons proposé une analyse qualitative à partir des figures 6.3.D-E. Sur l'image D, nous pouvons voir que le sphéroïde est positionné au centre de la cavité ce qui exclut la possibilité d'un positionnement asymétrique influençant la migration d'un côté de la



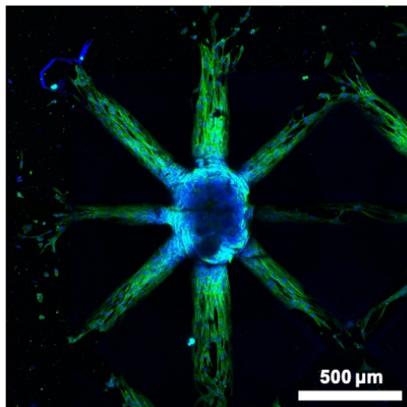
(a) Image de deux sphéroïdes. Observation à J3 imagés en lumière blanche avec un microscope droit.



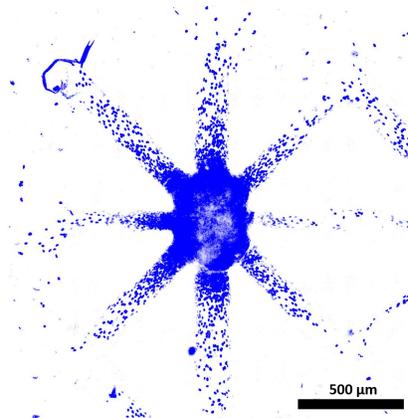
(b) Image de quatre sphéroïdes se projetant dans les canaux. Observation à J7 en fluorescence. Projection suivant l'axe Z.



(c) Image d'un sphéroïde en vue proche. Observation à J7 en fluorescence. Projection suivant l'axe Z.



(d) Image d'un sphéroïde en microscopie par épifluorescence. L'absence de cellules sur la structure en PEGDA démontre leur prolifération dans les canaux. Observation à J7 en fluorescence. Projection suivant l'axe Z.



(e) Image issue de l'image D avec seulement les noyaux visibles en bleu. Observation à J7 en fluorescence et exaltée avec ImageJ. Projection suivant l'axe Z.

FIGURE 6.3 – Images de culture de sphéroïdes en environnement contraint. En fonction des images, les structures en PEGDA qui ne présentent pas d'adhérence pour les cellules sont visibles grâce aux nanoparticules rouge (0.01% v/v). En vert, l'actine est marquée en GFP. En bleu, les noyaux sont marqués au DAPI.

structure. Sur l'image E, nous pouvons voir une forte migration et prolifération dans les canaux de gauche par rapport aux canaux de droite. Pour une même taille de canal, l'écart du nombre de cellules détectables est notable. Cela laisse supposer que la taille des canaux dans cette gamme de dimension n'influe pas la migration, mais plutôt que la migration est due à des effets locaux.

Cette technologie d'impression nous a permis de générer des motifs de PEGDA non adhérents, avec des structures hautes de 500 μm délimitant des cavités entourées de canaux de guidage de différentes largeurs. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que cette approche d'impression pourrait être adaptée pour une caractérisation plus poussée du confinement cellulaire et des effets de structuration sur les processus biologiques. Cette conception peut être particulièrement utile pour étudier les mécanismes de migration confinée, connus pour favoriser l'invasion des cellules cancéreuses.²⁹¹ De plus, être capable de piloter la fusion de sphéroïdes^{290,292} ou l'interconnectivité^{293,294} dans les biomatériaux est actuellement d'un intérêt majeur dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.

Avec ces expériences, nous avons prouvé la capacité de la plateforme à imprimer des motifs à différentes échelles de dimensions pour la structuration de surface. Les cellules réagissent à cet environnement. Il est possible d'imaginer des géométries de guidage de cellules dans des canaux, ou d'étudier des processus biologiques en environnement contraint.

6.2 Réalisation de structures support en 3D pour la culture cellulaire

Dans cette partie, nous avons souhaité évaluer les capacités de la plateforme à réaliser des structures 3D pour supporter une culture cellulaire en surface (*scaffold* en anglais). L'équipe a montré par le passé⁵² la possibilité de modifier la formulation de notre hydrogel à base de PEGDA avec de l'acide acrylique et de la fibronectine afin d'incorporer dans l'hydrogel des sites d'adhésion pour les cellules (voir protocole n°2, p.174). Cette approche permet, même si la porosité du gel ne permet pas une migration ni un ensemencement cellulaire en 3D, de promouvoir l'adhésion des cellules à la surface des motifs imprimés.

Nous avons créé une structure modélisant l'épithélium intestinal composée avec des cryptes et des villi (voir figure 5.18 dans la partie sur la polymérisation d'objets 3D). Nous avons utilisé la solution suivante : 40% de PEGDA 700, 30% acide acrylique, 30% PBS, 1% fibronectine, 0.01% LAP.

Nous avonsensemencé des Caco2 (lignée cellulaire associées au cancer colorectal) et mis en culture notre échantillon pendant 21 jours. L'image 6.4 présente la structure observée au MEB avant ensemencement et au microscope confocal après 21 jours de culture.

Nous avons validé que les cellules adhèrent au PEGDA fonctionnalisé. Nous avons observé que les cellules arrivent à confluence et forment un tissu cohésif. Elles sont capables de proliférer jusqu'à recouvrir la surface de l'objet en hydrogel polymérisé. Un film vert et bleu signale un tissu autour du villi, au niveau basal et au fond des cryptes.

Il est donc possible d'utiliser la plateforme pour imprimer des structures pour, soit contraindre les cellules à l'extérieur, soit leur permettre de recouvrir l'objet. Nous souhaiterions reproduire des motifs similaires avec plusieurs matériaux afin d'induire ou d'observer des comportements cellulaires modérés. Dans la partie suivante, nous étudions dans quelles conditions nous pourrions imprimer des hydrogels contenant des cellules dans leur formulation.

6.3 Étude de la viabilité des cellules dans un procédé de bioimpression

Un des objectifs possibles de la plateforme est l'impression de cellules en suspension dans un hydrogel. Le terme de bioimpression fait référence à cette méthode. Les différentes étapes du processus

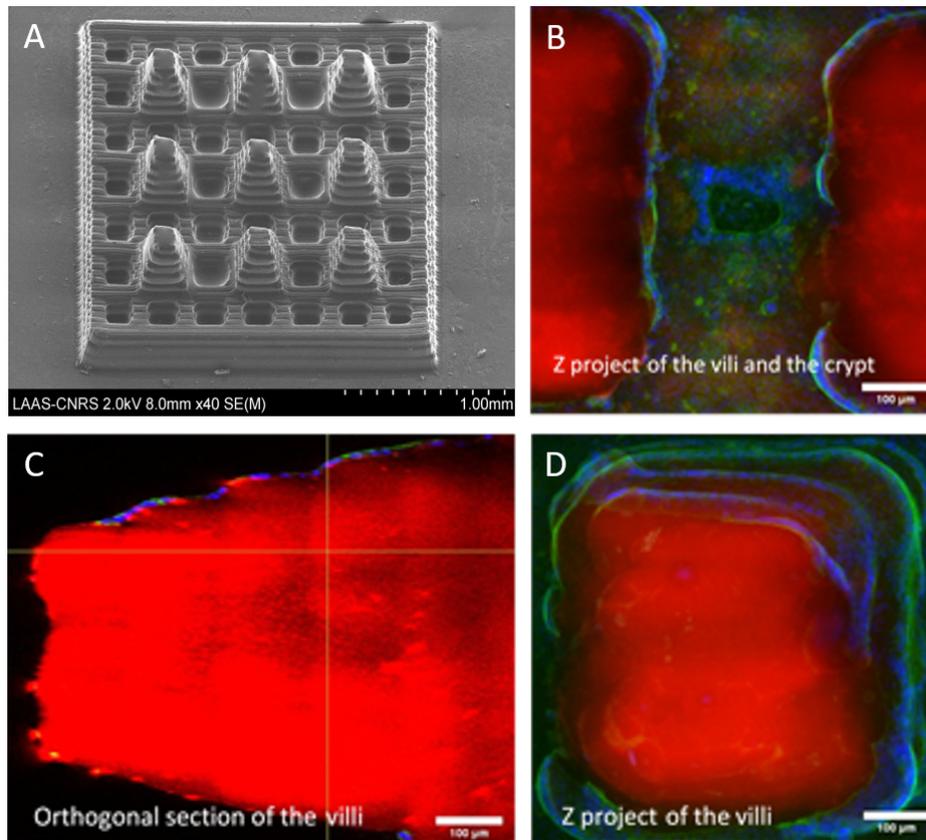


FIGURE 6.4 – Images de tissu de cancer colorectal (Caco2) sur une structure support (*scaffold*) en PEGDA reproduisant l'intestin en 3D. A) Image MEB de la structure en PEGDA avant culture cellulaire. B-C-D) Images d'un tapis de cellules Caco2 sur une structure support reproduisant l'intestin en 3D. Image à 21j. Cellules fixées avec du paraformaldéhyde. Actine marquée en vert avec de la GFP, noyaux marqués en bleu avec du DAPI, structures en PEGDA visibles grâce à des nanoparticules (0.01% v/v) marquées en rouge. Observation au microscope confocal. échelle : 100 µm. B) Somme d'images en Z de l'espace entre deux villi avec une crypte. C) Vue en coupe d'un villi. D) Somme d'images en Z d'un villi complet.

de l'impression peuvent induire un stress sur les cellules, voire conduire à l'apoptose. Dans le cadre de notre plateforme, les origines de ce stress sont multiples et comprennent : lyse sous flux microfluidiques, dommages dus à l'insolation par la lumière à 405 nm, cytotoxicité du photo-initiateur dans sa forme initiale et cytotoxicité du photo-initiateur dans sa forme radicalaire. Dans le but d'évaluer l'impact de chacun de ces paramètres, nous avons mis en place un plan d'expérience qui permet de décorrélérer chaque variable afin de pouvoir mesurer son influence seule (voir Fig. 6.5).

6.3.0.1 Description du plan d'expérience

Le plan d'expérience est décrit sur la figure 6.5. En premier lieu, nous mesurons le temps de réticulation du GelMA en fonction de la concentration en GelMA et en photo-initiateur (Exp. 1). Nous mesurons ensuite l'impact de cette dose sur des cellules dans du milieu de culture classique (Exp. 2). L'insolation de cellules peut conduire à des dommages cellulaires.^{72,73} Nous mesurons ensuite l'impact du photo-initiateur en solution dans le milieu de culture pour mesurer la cytotoxicité de cette molécule dans sa forme initiale (Exp. 3).⁸⁴ Nous combinons les deux expériences précédentes pour mesurer l'impact croisé de la dose avec le photo-initiateur dans sa forme radicalaire (Exp. 4). Comme présenté dans la partie 5.2, le photo-initiateur génère des radicaux libres qui peuvent endommager ou tuer les cellules.⁸¹⁻⁸⁴ Nous réalisons de nouveau cette expérience avec un changement du milieu à sept heures afin d'extraire le photo-initiateur, pour mimer un développement après une impression (Exp.

5). La molécule potentiellement photo-toxique du photo-initiateur dans sa forme radicalaire est donc retirée, ce qui pourrait être favorable aux cellules après l'impression. Ces expériences précédentes nous amènent enfin à considérer la photo-réticulation du GelMA avec des cellules en suspension (Exp. 6). Le GelMA, pour réticuler, consomme les radicaux libres, ce qui devrait diminuer la toxicité du processus de bioimpression pour les cellules. Enfin, nous estimons la viabilité des cellules lors de leur passage dans des tubes fluidiques (Exp. 7). Dans les tubes fluidiques, le profil de vitesse n'est pas uniforme ce qui induit un stress non homogène sur les cellules qui peut conduire à des lyses, des nécroses ou leur apoptose.⁷⁴⁻⁷⁸ Ces expériences ont été menées en collaboration avec Alexis Arcas dans le cadre de son projet de Master et Marie-Charline Blatché, travaillant au LAAS.

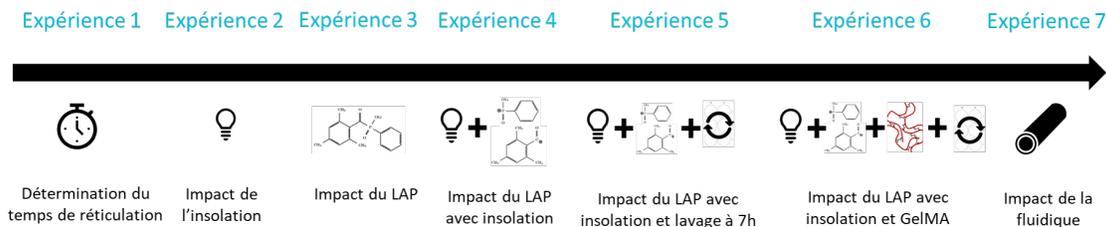


FIGURE 6.5 – Description du plan d'expérience pour caractériser la viabilité du processus de bioimpression. Exp. 1 : Mesure du temps de réticulation du GelMA en fonction de la concentration en GelMA et en photo-initiateur. Exp. 2 : Mesure de l'impact de la dose optique à 405 nm sur des cellules dans du milieu de culture classique. Exp. 3 : Mesure de l'impact du photo-initiateur en solution dans le milieu de culture. Exp. 4 : Mesure de l'impact croisé de la dose avec le photo-initiateur dans sa forme radicalaire. Exp. 5 : Mesure de l'impact croisé de la dose et du photo-initiateur avec un changement du milieu à 7h afin d'extraire le photo-initiateur, pour mimer un développement après une impression. Exp. 6 : Mesure de l'impact de l'encapsulation des cellules dans du GelMA par photo-réticulation. Exp. 7 : Mesure de la viabilité des cellules lors de leur passage dans des tubes fluidiques.

6.3.0.2 Protocole expérimental

Dans les expériences 2 à 6, nous avons étudié l'impact des composants de la solution photopolymérisable dans laquelle les cellules sont en suspension (LAP dans sa forme initiale, LAP dans sa forme radicalaire, GelMA) et l'impact de la lumière. Toutes les concentrations sont données en %m/v. Ces études ont été menées sur des temps de culture de 72 heures. Le protocole utilisé pour l'ensemble des expériences est détaillé ci-dessous.

Nous avonsensemencé des PC3-GFP (15 000 cellules par mL) dans des puits de plaque de culture à 96 puits. Le milieu de culture est du RPMI avec 10% de SVF et 1% de pénicilline - streptomycine, 1% de G418 et 1% de L-Glutamine. Si l'expérience requiert une insolation, la solution est retirée, puis remplacée par une solution sans SVF ni rouge de phénol, puis l'insolation est réalisée, puis la quantité de SVF et de rouge de phénol est rajoutée dans chaque puits. En effet, le SVF et le rouge de phénol absorbant à 405 nm, ils auraient potentiellement induit des variations de la dose d'insolation.

Pour l'insolation, nous avons utilisé une lampe *Formcure* de la marque *Formalab* utilisant une source LED à 405 nm. Nous avons réduit le flux lumineux en utilisant des plaques opaques afin d'atteindre une puissance surfacique de 0.66 mW/cm². Nous avons mesuré cette puissance avec une sonde S170C (photodiode en silicium) et un module PM200 de Thorlabs disposé à l'emplacement de la plaque à puits. L'habitacle de la lampe était maintenue à 37°C.

Dans l'incubateur, les plaques de culture étaient imagées par un module *Cellcytes* permettant une observation régulière (1-2h) sans sortie de l'incubateur. Cet appareil réalise aussi les mesures de confluence et compte le nombre de cellules mortes. Il est à signaler que la mesure de confluence est réalisée par mesure de la surface occupée par des cellules, mais que ce processus ne permet pas de distinguer les cellules mortes des cellules vivantes. Le compte de cellules mortes est réalisé grâce à l'ajout dans la solution de culture d'iodure de propidium (2,5 µg/ml) dès le début de la culture. Quatre puits ont étéensemencés pour chaque condition et quatre images ont été prises par puits. Chaque condition expérimentale est donc représentée par l'acquisition et le moyennage de 16 images. Nous avons analysé la confluence et la mortalité, mais nous n'avons pas évalué la capacité proliférative des cellules

(accessible par exemple via un marqueur CMTMR). Nous postulons que la capacité de la culture à proliférer est un marqueur de viabilité cellulaire.

6.3.0.3 Détermination de la dose seuil de réticulation

L'expérience 1 de caractérisation de la dose seuil du GelMA en fonction de la concentration en GelMA et en LAP a été présentée dans la partie 5.2.4. Le tableau 6.1 détaille les doses nécessaires en mJ/cm^2 pour atteindre le seuil de polymérisation en fonction de la concentration en photo-initiateur et en polymère. Plus la concentration dans ces deux éléments est élevée, plus la dose seuil est faible. Nous voyons que la même dose peut permettre la réticulation de plusieurs solutions différentes.

(mJ/cm^2)	$C_{\text{LAP}}=0.05\%$	$C_{\text{LAP}}=0.1\%$	$C_{\text{LAP}}=0.2\%$
$C_{\text{GelMA}}=5\%$	230	180	180
$C_{\text{GelMA}}=10\%$	60	40	30
$C_{\text{GelMA}}=15\%$	60	30	30
$C_{\text{GelMA}}=20\%$	40	30	25

TABLE 6.1 – Tableau présentant les doses de polymérisation étudiées pour la viabilité lors de bioimpression

Avec trois doses de 30, 40, 60 mJ/cm^2 , nous couvrons huit conditions. Ces conditions permettent de réticuler du GelMA à 10%, 15% et 20%. Il s'agit des trois doses que nous utiliserons au cours du plan d'expériences. La caractérisation de la viabilité cellulaire pour les cas restant ($C_{\text{GelMA}} = 5\% - C^{\text{LAP}} = [0.05, 0.1, 0.2]\%$ et $C_{\text{GelMA}} = 20\% - C^{\text{LAP}} = 0.2\%$) demanderait trois doses supplémentaires (25, 180 et 230 mJ/cm^2) pour seulement quatre conditions. Nous nous sommes donc limités à trois doses, plus le témoin à 0 mJ/cm^2 , ce qui correspond à quatre plaques de puits de culture (16 puits sont utilisés par plaque : avec 4 conditions et un duplicata en 4).

Pour l'expérience 5, nous testerons trois concentrations de LAP (plus le témoin). Chaque condition sera répétée quatre fois et chaque puits sera imagé en quatre points. La machine Cellcytes prendra une image toutes les heures pendant trois jours et sur trois canaux (lumière blanche, propidium imagé en rouge et GFP imagé en vert). Cette expérience générera donc environ 55 000 images. Malgré une automatisation de la détermination de la confluence avec la machine Cellcytes, et des codes développés en interne (imageJ et python) pour compter le nombre de cellules mortes, cette masse de données sera complexe à stocker et à traiter. Cela explique que nous nous soyons limités à quatre doses plutôt que les sept nécessaires pour couvrir l'ensemble des conditions du tableau 6.1.

6.3.0.4 Étude de l'impact du photo-initiateur en solution sur les cellules

Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact du photo-initiateur seul sur la viabilité cellulaire. Nous avons incubé les cellules en suspension avec plusieurs concentrations de LAP. Le photo-initiateur n'est pas exposé à la lumière et est donc dans son état que nous appellerons initiale.

La figure 6.6.A représente les analyses de confluence et de mortalité cellulaire jusqu'à 72 heures. Un impact significatif de la concentration en LAP est visible. De 0 à 0.2% m/v , l'évolution de la confluence diminue passant à J3 de 75% à 45%. Nous observons une augmentation notoire de la mortalité cellulaire à 0.2% m/v de LAP. Cette augmentation de la mortalité est corrélée avec une diminution de l'évolution de la confluence ce qui suggère que le photo-initiateur a un impact sur la viabilité cellulaire. Pour les autres conditions, le photo-initiateur n'induit pas de mortalité (par rapport au témoin), mais diminue la confluence. Cette expérience suggère qu'une minimisation de la concentration en LAP est requise avec une concentration critique à 0,2%.

6.3.0.5 Étude de l'impact de l'exposition des cellules à la lumière à 405 nm, sans photo-initiateur ni hydrogel

Nous avons souhaité caractériser l'impact de l'insolation des cellules, sans hydrogel ni photo-initiateur en solution. Il a été reporté dans la littérature différents processus pouvant impacter la viabilité cellulaire à court et moyen terme,^{70–73} notamment en induisant des effets d'échauffements ou

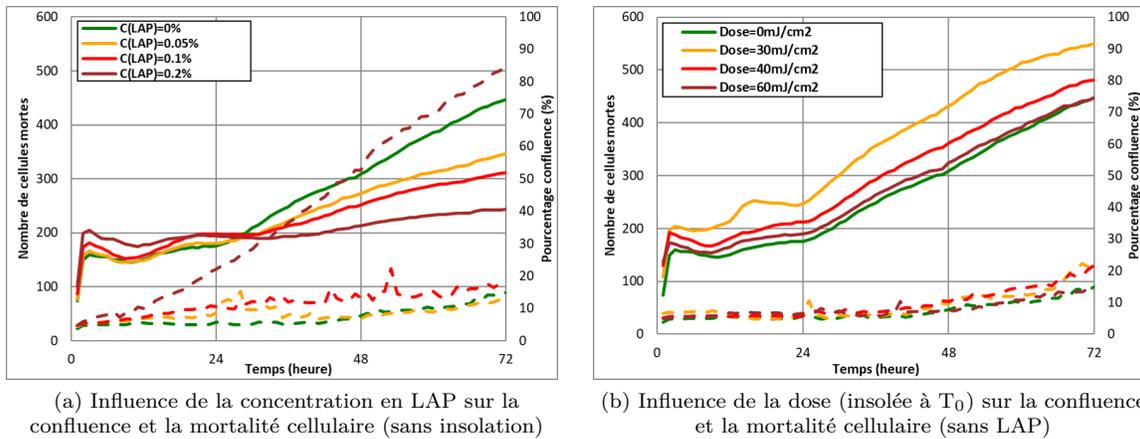


FIGURE 6.6 – Étude de la viabilité cellulaire de PC3 en contact avec le photo-initiateur LAP ou après insolation. La confluence est représentée en traits continus (échelle de droite) et le nombre de cellules mortes en traits pointillés (échelle de gauche). Étude sur 72 heures.

de dommages à l'ADN. Nous avons souhaité évaluer l'impact de l'exposition des cellules à une source lumineuse monochromatique à 405 nm.

Dans cette expérience, les plaques de culture ont été exposées après ensemencement, à des expositions lumineuses de 45 à 90 s au sein du système *Formcure*, soit des doses de 30 à 60 mJ/cm² (température de la lampe : 37°C). Puis, les plaques étaient repositionnées dans l'incubateur. La figure 6.6.B présente la mesure de la confluence et de la mortalité jusqu'à 72h.

L'étude montre une faible différence d'évolution entre les quatre conditions d'insolation. Nous observons un décalage entre les courbes, mais aucune différence notable dans les pentes de ces dernières pendant les 72h. Les écarts observés peuvent être associés à des différences dans les conditions initiales d'ensemencement, mais ne témoignent pas d'une différence de comportement significative vis-à-vis de la dose. L'exposition à une source de lumière seule à 405 nm n'a donc pas d'impact significatif sur les cellules pour ces conditions de puissance et de temps (Dose *leq* 60 mJ/cm² à P = 0.66 mW/cm²).

6.3.0.6 Étude de l'impact du photo-initiateur combiné à l'insolation, sans hydrogel

Étude sans changement de milieu Sous une illumination à 405 nm, le LAP est photo-clivé et génère des radicaux libres (voir partie 5.2) qui peuvent induire des effets de cytotoxicité ou de photosensibilisation.^{81–84} Nous avons donc mis en place deux types d'expériences. Dans la première, les cellules sont insolées en présence de LAP et incubées pendant 72h. Dans la seconde, les cellules sont exposées à la source lumineuse en présence de LAP, puis le milieu est renouvelé afin de retirer le LAP. Cette dernière expérience nous permet d'évaluer l'impact du temps de mise en présence du photo-initiateur et de reproduire les conditions d'impression dans lesquelles un renouvellement permanent du milieu est permis par la tête d'impression.

La figure 6.7 présente la viabilité en fonction de la dose et de la concentration en LAP. Le graphique A montre quatre conditions de concentration de LAP pour une dose particulière (dose = 30 mJ/cm²). Nous observons une prolifération cellulaire excepté pour la condition $C_{LAP} = 0.2\%$. Dans ce cas, la mortalité augmente drastiquement, et l'ensemble des cellules sont mortes à 72h. Le graphique montre aussi que la présence de LAP à une moindre concentration ($C_{LAP} = [0.1, 0.2]\%$) engendre une diminution des capacités de prolifération sans pour autant augmenter la mortalité.⁸⁴

Le graphique 6.7.B montre les résultats globaux (dose = {0; 30; 40; 60} mJ/cm²). Les tendances observées avec la dose à 30 mJ/cm² sont transposables à la gamme 0 - 60 mJ/cm². Nous notons que bien que la lumière seule n'est pas d'impact sur la viabilité (développé précédemment dans la partie 6.3.0.5 et barres vertes sur le graphique), la combinaison avec le photo-initiateur est toxique. Par exemple, le LAP à 0.1% avec une insolation de 30 mJ/cm² permet de maintenir la viabilité cellulaire (62% de confluence à J3), alors que la culture est morte pour la même concentration avec une insolation de 60 mJ/cm² (26% de confluence à J3). De la même façon, pour une insolation fixe, l'augmentation

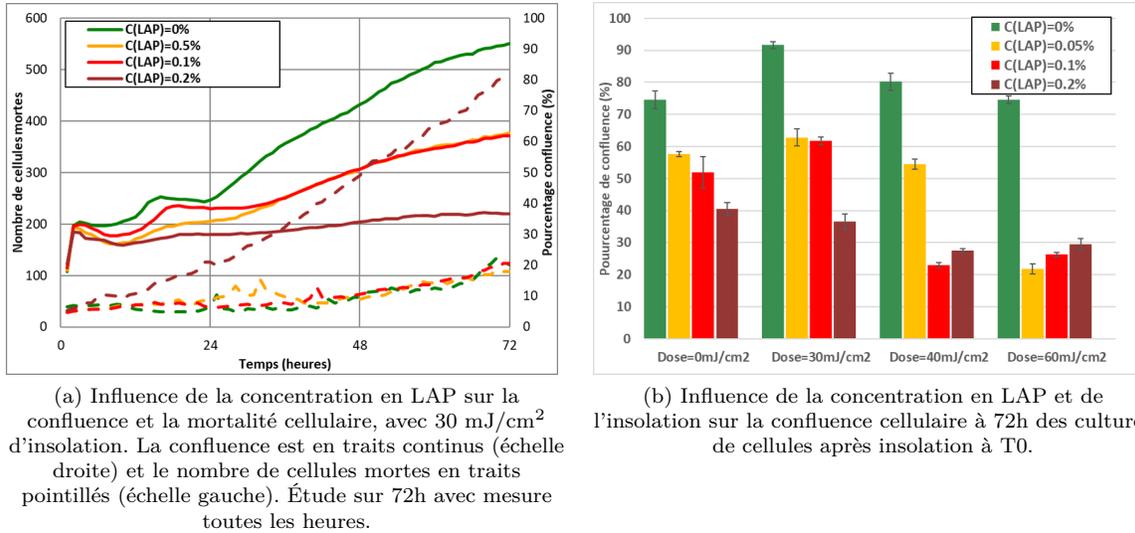


FIGURE 6.7 – Étude de la viabilité cellulaire de PC3 en contact après insolation avec le photo-initiateur LAP réagit. La graphique A montre l'évolution sur 72h à la dose de 30 mJ/cm² et l'histogramme récapitulent les quatre doses à 72h (B).

de la concentration diminue la viabilité cellulaire. C'est donc bien la forme activée du photo-initiateur qui est toxique pour les cellules.

Le tableau 6.2 synthétise les résultats du graphique 6.7.B pour les combinaisons *dose* - C_{LAP} permettant la réticulation du GelMA (issu du tableau 6.1). En effet, l'étude décrite ci-dessus présente des combinaisons *dose* - C_{LAP} qui ne conduisent pas à la réticulation du GelMA, mais participent à la compréhension des phénomènes en jeu. Le tableau 6.2 présente les conditions viables (à 72h) qui permettraient d'encapsuler des cellules dans du GelMA.

[Viabilité (%)]	$C_{LAP}=0.05\%$	$C_{LAP}=0.1\%$	$C_{LAP}=0.2\%$
$C_{GelMA}=10\%$	mort cellulaire	mort cellulaire	mort cellulaire
$C_{GelMA}=15\%$	mort cellulaire	63%	mort cellulaire
$C_{GelMA}=20\%$	56%	63%	/

TABLE 6.2 – Tableau présentant le pourcentage confluence à 72h, en fonction de l'insolation et de la concentration en LAP.

Parmi toutes les conditions, les cas [$C_{LAP}=0.1\%$; $C_{GelMA}=15\%$], [$C_{LAP}=0.1\%$; $C_{GelMA}=20\%$] et [$C_{LAP}=0.05\%$; $C_{GelMA}=20\%$] permettent une culture viable, à partir d'insolation respectivement à 30 mJ/cm², 30 mJ/cm² et 40 mJ/cm². Les autres conditions conduisent à une mortalité cellulaire totale. Au contraire du résultat de l'étude avec le LAP sans insolation, ce ne sont pas forcément les conditions avec le minimum de LAP qui sont à privilégier.

Nous notons aussi qu'à partir de cette étude, nous ne pourrions donc pas polymériser du GelMA à 10% et maintenir une viabilité, car les trois conditions de concentration de LAP ont mené à une mortalité cellulaire totale. Il est important de rappeler que cela correspond à la situation sans GelMA, et donc que les radicaux libres ne sont pas consommés. Une meilleure viabilité peut être attendue lors de l'ajout de GelMA dans la solution.

Étude avec changement du milieu post-insolation La plateforme 3D-FlowPrint réalise une circulation des hydrogels en continu par le biais des canaux d'injection et d'aspiration. Si la tête d'impression est restée dans la région d'une structure déjà imprimée, un effet de lavage est en place sur cette structure. Ce lavage permettrait éventuellement d'éliminer une part significative des radicaux libres, non consommés par la polymérisation de l'hydrogel, générés dans la zone de polymérisation. Ce lavage pourrait donc préserver les cellules. Enfin, suite à une impression (durant entre 0.5 et 7h),

l'objet est développé avec du milieu, ce qui retire l'ensemble des molécules de LAP restantes.

Nous avons donc étudié la viabilité cellulaire entre une culture témoin et une culture avec changement de la solution. Dans le premier cas, il s'agit d'une expérience similaire à celles précédentes : les cellules sont en suspension dans du milieu de culture contenant entre 0% et 0.2% de LAP, puis insolées et incubées pendant 72h. Nous avons réalisé cette étude avec une seule dose d'insolation de 40 mJ/cm². Dans le second cas, les cellules sont en suspension dans des solutions équivalentes, insolées avec la même dose, puis à 7h le milieu est remplacé par un milieu exempt de LAP. Enfin, les cellules sont incubées et mises en culture pendant 72h. Nous attendons 7h après l'insolation pour mimer le temps d'une expérience de bioimpression et pour attendre que les cellules aient adhéré au fond des puits afin qu'elles ne soient pas aspirées lors du changement de milieu.

La figure 6.8.A présente les résultats de cette étude. Nous pouvons voir que pour des concentrations de LAP de 0.05% et 0.1%, la confluence à 72h est plus importante lorsqu'un changement de milieu est effectué. Par exemple, pour une concentration $C_{LAP}=0.1\%$ et pas de changement de milieu, la confluence n'a pas augmenté en 72h (30%) alors que la confluence atteint 52% avec un lavage à $t=7h$.

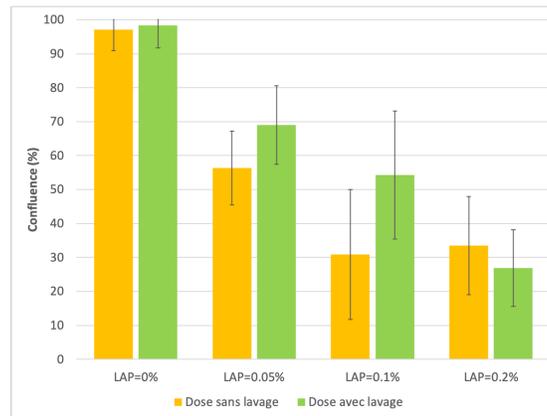


FIGURE 6.8 – Étude de l'impact du changement du milieu à $t=7h$ sur la viabilité cellulaire de PC3 après insolation de la solution contenant du LAP et les cellules en suspension. Insolation à 40 mJ/cm² à t_0 , changement du milieu à 7h, mesures à 79h.

Ces résultats confirment aussi l'impossibilité de réaliser des cultures viables pour des concentrations de LAP de 0,2%. La toxicité du LAP à 0.2% après insolation est trop importante sur l'espace de 7h. Il est possible qu'un changement de milieu plus rapide (par exemple, à 1h) puisse permettre de garder une telle culture viable.

Cette étude montre l'intérêt de l'impression en flux. Elle met aussi en avant la nécessité d'un changement du milieu au plus tôt après l'insolation. Cette observation confirme l'hypothèse de privilégier des protocoles qui favorisent une faible exposition temporelle à la solution photopolymérisable après insolation.

6.3.0.7 Étude de l'impact du procédé complet de réticulation du GelMA

Nous avons vu que l'insolation lumineuse seule à 405 nm n'impactait pas la viabilité cellulaire, mais que la présence de LAP, surtout dans sa forme photo-actionnée, est nocif pour les cellules. L'élément manquant dans ce processus de photo-réticulation est le polymère, l'élément central. Après avoir caractérisé l'impact des différents éléments isolés de la bioimpression, il faut les rassembler. Dans cette partie, nous étudions la viabilité du processus de photopolymérisation de la solution complète de photo-initiateur et d'hydrogel. Les cellules subiront donc :

- L'impact de l'exposition à une source lumineuse. Celui-ci n'a pas d'effets significatifs sur la prolifération à 405 nm pour une dose $leq 90 \text{ mJ/cm}^2$ à $P = 0.66 \text{ mW/cm}^2$. Pour des cellules en suspension dans du GelMA, aucun nouvel effet ne devrait prendre place à ce niveau.
- La forme initiale du photo-initiateur qui les impacte partiellement. À 72h, nous avons vu que le LAP dans sa forme initiale avait presque intégralement stoppé la prolifération pour une concentration de 0.2%.

- La forme radicalaire du photo-initiateur qui les impacte fortement. À 72h, nous avons vu que le LAP dans sa forme radicalaire avait presque intégralement stoppé la totalité des expériences. Nous vérifions ainsi que les radicaux libres générés sont cytotoxiques pour les cellules.
- L'hydrogel réticulé, pourrait potentiellement protéger en absorbant la forme radicalaire des photo-initiateurs. En effet, le photo-initiateur est intégré dans la solution afin de fournir des radicaux libres pour la réticulation du GelMA. La polymérisation de l'hydrogel consomme ainsi ces radicaux libres.

Dans l'expérience suivante, nous avons réalisé des études de viabilité pour toutes les combinaisons (solution - dose) permettant la réticulation du GelMA comme décrit dans le tableau 6.1 pour la dose 30 mJ/cm². Les solutions ont été préparées avec du GelMA entre 10 et 20%*m/v* et du LAP entre 0.1 et 0.2%*m/v*, en accord avec le tableau 6.1 (Sans SVF et sans rouge de phénol). Les cellules ont été mises en suspension dans ces solutions, puis pipettées dans les puits d'une plaque. La plaque a été insolée à 30 mJ/cm². Le surnageant a été changé à 1h et du milieu (contenant du SVF et de l'iodure de propidium) a été ajouté afin de recouvrir les structures réticulées. Nous n'avons pas eu besoin d'attendre 7h comme dans l'expérience précédente, où il était nécessaire d'attendre que les cellules adhèrent au fond du puits, puisque ici les cellules sont encapsulées. L'objet polymérisé est un cylindre qui correspond aux puits de la plaque, sans motif 3D.

À 24h, nous avons observé au microscope confocal en rouge (cellules mortes marquées à l'iodure de propidium) et en vert (PC3 transfectées GFP). Nous avons compté le nombre total de cellules et compté le pourcentage de cellules vivantes (voir tableau 6.3). L'acquisition étant plus longue en 3D, nous n'avons réalisé qu'une seule image 3D pour chaque condition.

[Nombre de cellules Viabilité (%)]	C _{LAP} =0.05%	C _{LAP} =0.1%	C _{LAP} =0.2%
C _{GelMA} =10%	/	/	179 cellules 75%
C _{GelMA} =15%	/	107 cellules 75%	143 cellules 67%
C _{GelMA} =20%	/	284 cellules 80%	/

TABLE 6.3 – Tableau présentant le nombre total de cellules (au-dessus) et le pourcentage de cellules vivantes (en-dessous) lors de la réticulation de solutions de GelMA contenant des cellules en suspension et du LAP. Cellules et hydrogel se situent dans une plaque à puits, sans motif 3D. Expérience avec une insolation à 30 mJ/cm² à t₀ et un changement du milieu à t=1h. Cellules comptées en 3D grâce à des images confocales sur des cellules PC3-GFP marquées à l'iodure de propidium.

La méthode d'encapsulation a conduit à un taux de viabilité de plus de 67% pour l'ensemble des conditions étudiées. Ces valeurs sont très supérieures à celles obtenues dans l'expérience sans GelMA (voir partie 6.3.0.6 et tableau 6.2), alors même qu'elles ont été mesurées à 24h et pas à 72h. Alors que plusieurs conditions ne permettaient pas de maintenir la survie des cellules dans l'expérience précédente, toutes les conditions étudiées ici permettent de conserver une viabilité supérieure d'au moins deux tiers. La viabilité est maximale pour la condition [C_{LAP} = 0.1%, C_{GelMA} = 20%, dose = 30 mJ/cm²] avec 80% de viabilité sur 234 cellules.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Fedorovich et al portant sur des travaux d'insolation de cellules en présence d'un photo-initiateur (Irgacure 2959).²⁹⁵ L'équipe a montré l'effet toxique de la combinaison insolation - photo-initiateur, mettant en avant le rôle protecteur de l'hydrogel. Ce dernier consomme les radicaux créés par le photo-initiateur et diminue ainsi la toxicité.

La figure 6.9 montre la projection en Z et en Y de l'échantillon [C_{LAP} = 0.2%, C_{GelMA} = 10%, dose = 30 mJ/cm²]. L'échantillon mesurait deux millimètres de haut et l'acquisition s'est faite sur un millimètre. Il est possible de voir que les cellules sont réparties uniformément dans l'hydrogel même si un léger effet de sédimentation avant la réticulation est observé.

Avec cette expérience, nous avons prouvé la faisabilité de la photo-réticulation de solution de GelMA contenant des cellules, par le biais d'une lampe *Formcure* avec une puissance de 0.66 mW/cm². La viabilité cellulaire des PC3-GFP à 24h est comprise entre 67% et 80% pour les conditions que nous avons testées.

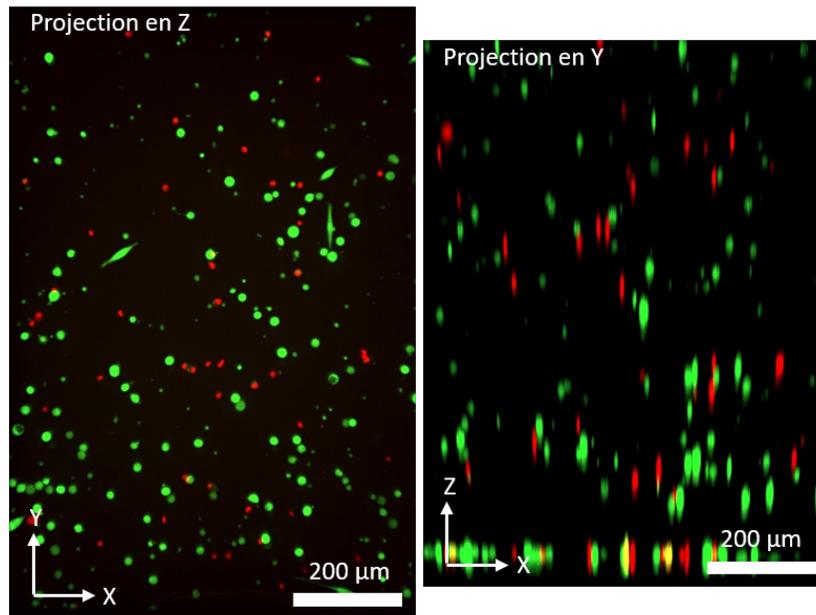


FIGURE 6.9 – Étude de la viabilité cellulaire de PC3 encapsulées dans du GelMA par lumière collimatée. L'objet total, composé de cellules et hydrogel, correspond au cylindre d'un puits d'une plaque 48 puits, sans motif 3D, avec insolation *via* une lampe *Formcure* à LED. Projection en Z et en Y. Changement du milieu à 1h. Observation par microscopie confocale à $t=24h$. $C_{LAP} = 0.2\%$, $C_{GelMA} = 10\%$, dose = 30 mJ/cm^2 . Cellules PC3-GFP marquées en vert et cellules mortes marquées en rouge à l'iodure de propidium.

6.3.0.8 Étude de l'impact du flux sur les cellules

En plus des aspects optiques et photochimiques, nous avons souhaité étudier l'impact des paramètres rhéologiques et microfluidiques sur la viabilité des cellules. Le profil microfluidique dans les tubes est de type Poiseuille, avec un minimum de vitesse aux parois et un maximum au centre. Lors de l'écoulement dans des géométries confinées, la longueur, le débit, le diamètre des tubes et la viscosité de la solution peuvent agir sur les forces de cisaillement induites sur les cellules pendant l'écoulement et donc sur leur viabilité.⁷⁴⁻⁷⁸

Nous avons mis des cellules en suspension dans du milieu RPMI à 30 000 cellules par mL. Nous n'ajoutons pas de SVF ni de rouge de phénol, car les cellules ne seront pas mises en culture et que l'expérience dure moins de 3h. Ensuite, nous prélevons une petite partie pour re-mesurer la densité, et nous mettons dans une seringue environ 200 μl . Un tube est inséré jusque dans la seringue jusqu'au volume de liquide central pour que les cellules ne subissent qu'une seule section de tube et aucun raccord (pas de pointe de seringue vissé sur la seringue et inséré dans un tube). Ce montage mime notre propre méthode d'injection avec la plateforme 3D-FlowPrint (un tube inséré dans un falcon). La seringue est positionnée sur un pousse-seringue. Nous mettons en marche le pousse seringue à un débit déterminé. Les 100 premiers μl sont jetés, ce qui correspond au volume mort du tube (avec de la marge), et les 50 μl suivants sont dirigés vers un eppendorf. Ces dernières cellules ont donc eu un débit constant dans le tube, au contraire des 100 premiers μl qui étaient arrêtés dans le tube puis qui ont subi le régime transitoire à la mise en marche.

Les cellules à la sortie du tube sont comptées et la densité est comparée au comptage initial. Nous mesurons donc seulement les cellules vivantes qui ont pu traverser le système. Notre hypothèse de travail repose sur la corrélation de la viabilité cellulaire au nombre de cellules collectées. Cette méthode de mesure ne prend pas en compte les cellules qui restent bloquées dans le tube, en sédimentant ou en adhérant sur les parois. Dans la réalité de la plateforme 3D-FlowPrint, ces cellules n'arriveront pas non plus jusqu'à la zone de photo-polymérisation. Cette méthode ne compte pas seulement la viabilité des cellules, mais bien la portion de cellules ayant maintenu leur intégrité physique qui sont parvenues à traverser le tube. De plus, cette méthode ne mesure pas l'état des cellules, car les cellules apoptotiques

et nécrotiques sont comptées parmi les cellules vivantes. Lemarié *et al.*⁷⁸ ont montré que la mesure du nombre de cellules vivantes donne une estimation pertinente du nombre de cellules viables. Dans leurs mesures, la lyse représentait jusqu'à 57% avec seulement une moyenne de 5% de cellules nécrotiques et apoptotiques. Enfin, comparer seulement la densité en entrée et en sortie du tube microfluidique permet de simplifier l'expérience par rapport à la mise en culture avec des marquages spécifiques de l'état cellulaire ou à l'utilisation de cytométrie en flux.

Nous avons fait circuler les cellules dans des tubes de longueurs 200 ou 400 mm, de diamètre 250 ou 500 μm et à des débits de 25 ou 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, dans du milieu de culture. Les résultats sont présentés sur la figure 6.10. Le pourcentage de cellules détectées est plus important ($\simeq 90\%$) lorsque le débit est grand ($\phi = 100 \mu\text{l}/\text{min}$) et lorsque le diamètre est grand ($D = 0.5 \text{ mm}$) avec environ 90% des cellules détectées après le passage fluïdique.

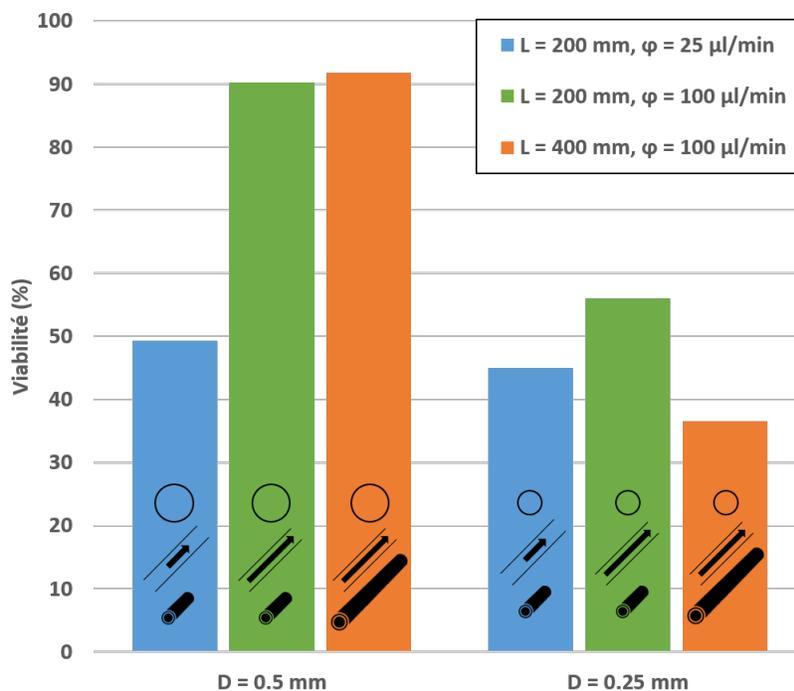


FIGURE 6.10 – Diagramme de la viabilité de cellules PC3 au passage dans des tubes fluidiques. Comparaison de la densité de cellules collectées en sortie du tube d'injection microfluidique par rapport à l'entrée. Comparaison en fonction des diamètres de tubes, longueurs de tubes et débits.

Il n'est pas intuitif qu'un débit plus important permette une meilleure viabilité, car il implique un cisaillement plus grand. Cependant, un débit plus important ($\phi = 100 \mu\text{l}/\text{min}$) conduit à un temps de résidence dans les tubes plus faibles. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Lemarié *et al.*⁷⁸ qui suggèrent que le temps de résidence impacte directement la viabilité. L'augmentation du cisaillement causée par une diminution du diamètre peut être contrebalancée par le plus faible temps de résidence du fait du débit accru.

Cette analyse est à pondérer, car le diamètre aurait pu influencer la viabilité de la même façon : à débit fixe, un diamètre plus faible conduit à une vitesse fluïdique plus importante et donc à un temps de résidence plus faible. Or, nous mesurons une meilleure viabilité pour les plus grands diamètres ($D = 0.5 \text{ mm}$). Dans ce cas, la viabilité est plus importante pour un cisaillement plus faible et un temps de résidence plus long. L'impression 3D des têtes d'impression permet d'adapter les canaux fluidiques internes afin de s'adapter à ces diamètres.

Enfin, une longueur de tube plus courte implique un temps de résidence plus court, et donc une meilleure viabilité. Ce résultat était attendu, mais peut s'avérer difficile à mettre en place. La plateforme actuelle sert de développement expérimental et n'est donc pas optimisée. Il s'agit d'une perspective de rapprocher l'ensemble des éléments microfluidiques de la tête d'impression. Nous pourrions aussi utiliser les capteurs de débits sous leur forme réduite (sans le conditionnement de la carte électronique) afin de réduire les volumes morts.

En conclusion de cette partie, nous avons étudié les processus à l'œuvre lors d'un procédé de bioimpression avec notre plateforme. Nous avons pu estimer l'influence de chaque élément seul (fluidique, insolation, photo-initiateur) ainsi que l'influence croisée de l'insolation avec le photo-initiateur. Pour la photo-polymérisation, nous avons mis en évidence une mortalité élevée et peu de conditions favorables lors de la caractérisation de l'influence croisée de la lumière et du photo-initiateur sans polymère. En revanche, lors de tests de polymérisation de GelMA avec des cellules en suspension, nous avons pu montrer une viabilité de l'ordre de 67% à 80% (à $C_{LAP} = 0.1\%$, $C_{GelMA} = 20\%$, dose = 30 mJ/cm²). Nous avons finalement étudié l'influence du passage des cellules dans des tubes microfluidiques et mis en avant une configuration ($\phi = 100 \mu\text{l}/\text{min}$, $D = 0.5 \text{ mm}$, $L = 200 \text{ mm}$) permettant d'obtenir 90% de cellules vivantes à la sortie microfluidique.

Perspectives pour des études biologiques avec la plateforme 3D-FlowPrint

Structuration de surface et tests systématiques De nombreux tests pourraient être envisagés avec une structuration de surface. Nous pourrions positionner des paires de sphéroïdes à des distances variables et reliées par des canaux de largeurs variables. Cela fournirait des informations sur la capacité de jonction de deux sphéroïdes. Dans le cas de sphéroïdes d'hASC contenant des progéniteurs endothéliaux, ces informations sont tout à fait pertinentes.²⁹⁰ La croissance de cellules individuelles sur des environnements contraints est aussi un domaine de recherche prometteur.²⁹¹ Certains types cellulaires sont affectés dans leurs déplacements et leur devenir en fonction de la topologie de leur environnement.^{296, 297}

Cette plateforme permettrait aussi de réaliser des tests biologiques systématiques.^{139, 298, 299} Plusieurs matériaux seraient imprimés sur une surface, puis des cellules ou des sphéroïdes seraient ajoutés. En une seule expérience, il serait possible de comparer la réaction d'un type cellulaire à plusieurs matériaux ou protéines.

Poursuivre l'impression de cellules encapsulées Une perspective à court terme de la plateforme est d'améliorer le processus de bioimpression de cellules encapsulées. Il est nécessaire de transférer les informations apprises sur les conditions favorisant la viabilité à la plateforme 3D-FlowPrint. Nous sommes confiants sur notre capacité à imprimer des cellules en 3D avec une mortalité faible. Une fois incubées en culture, les cellules reprendront le contrôle de l'hydrogel, généreront leur propre matrice extracellulaire et créeront des fonctions biologiques. Il serait alors possible d'étudier certains processus biologiques comme l'influence de la géométrie sur le développement de certaines cultures cellulaires biologiques.⁵²

Impression de structures multimatériaux - multitypes cellulaires Une fois l'étape de bioimpression bien maîtrisée, il sera intéressant d'implémenter différents matériaux et différents types cellulaires. Un système biologique est toujours formé de plusieurs zones, dont les matériaux ont des propriétés mécaniques et chimiques différentes. Au minimum, les systèmes sont quasiment toujours plus pertinents et plus durables s'ils intègrent des canaux mimant la circulation sanguine. L'impression d'un système particulier gagnerait donc à la coimpression des cellules qui lui sont spécifiques avec des cellules endothéliales dans les zones adaptées.⁴¹⁻⁴³ De même que les cellules endothéliales, les organes ont généralement des réservoirs de cellules souches responsables du renouvellement des cellules du système. Pouvoir imprimer une solution tierce contenant ces cellules souches et les déposer aux endroits voulus de l'objet 3D serait une réussite importante.⁴⁵⁻⁴⁸ Ainsi, l'impression de plusieurs types cellulaires (cellules actives, cellules souches, cellules endothéliales) et de plusieurs matériaux permettrait d'obtenir des systèmes de plus en plus pertinents.

Co-impression d'hydrogel, de suspension cellulaire et de sphéroïdes La quatrième perspective pour le système est la coimpression d'hydrogel, de cellules encapsulées et de sphéroïdes. Nous avons développé une plateforme secondaire qui permet de positionner des sphéroïdes dans une impression 3D depuis une plaque à puits où ils ont été cultivés. Cette plateforme peut être combinée à l'imprimante

3D-FlowPrint. La plateforme imprime en premier des couches d'hydrogel, en créant des cavités aux endroits voulus. Ensuite, le programme d'impression s'arrête pour laisser la place au programme de placement de sphéroïdes. Avec la même tête d'impression, ou avec une seringue accolée, la plateforme attrape un sphéroïde par aspiration au bout de la seringue, depuis une plaque à puits par exemple. Le système utilise un module de pression négative Fluigent (présenté dans la partie 2.1.2.3) pour contrôler précisément l'aspiration du sphéroïde. Pour repérer et aspirer automatiquement le sphéroïde, une caméra *Dino* est utilisée. Ensuite, le sphéroïde est positionné aux coordonnées de la cavité prévue. Le contrôleur de pression coupe l'aspiration et le sphéroïde se détache de la seringue pour se positionner dans la cavité d'hydrogel. L'opération est répétée s'il y a d'autres sphéroïdes à positionner. Puis l'impression d'hydrogel reprend en recouvrant les cavités et en imprimant les couches suivantes. D'autres cavités sont créées et d'autres sphéroïdes sont positionnés.

Cela permettrait d'imprimer des motifs d'hydrogel, puis de positionner des sphéroïdes, puis de reprendre l'impression en recouvrant les sphéroïdes d'hydrogel et en continuant de créer l'objet 3D. Les sphéroïdes étant par nature des objets biologiques aux propriétés plus avancées que des cellules individuelles, ils pourraient prendre possession de l'objet 3D plus rapidement avant de faire apparaître les fonctions biologiques visées.⁴⁹⁻⁵¹ Il serait possible d'imprimer des cellules encapsulées dans l'hydrogel pour permettre une meilleure prolifération globale plutôt qu'attendre la seule prolifération des sphéroïdes. Une telle méthode demande un haut degré de maîtrise en biophysique : il faut maîtriser la création des sphéroïdes, cultiver les cellules du type désiré, imprimer du GelMA avec les têtes de quatrième génération avec bulle d'air et réaliser une séquence d'impression alternant impression d'hydrogel et positionnement de sphéroïdes. Cependant, la création d'un microenvironnement par ce biais permettrait, nous estimons, l'obtention de systèmes d'étude pertinents.

Dans ce dernier chapitre, nous avons donc proposé des applications pour la plateforme 3D-FlowPrint, à la fois par la structuration de surface, de structures support et par la bioimpression de cellules encapsulées. Des développements restent à réaliser pour permettre la création de microenvironnements biologiques utilisables pour des tests systématiques. De nombreuses applications seraient possibles une fois la plateforme optimisée.

Conclusion

Durant cette thèse, nous avons développé un nouveau concept d'impression 3D appliqué à la biologie. La plateforme 3D-FlowPrint a pour objectif de réaliser des architectures 3D multimatériaux avec une résolution micrométrique. Notre analyse de la littérature nous a amené à considérer que les technologies actuelles ne permettent pas de répondre à ces objectifs de façon satisfaisante. La micro-extrusion a la capacité d'imprimer en multimatériaux mais est limitée en résolution et rapports de forme. La stéréolithographie a une excellente résolution, mais beaucoup de difficulté à changer de matériaux. Les sondes microfluidiques permettent une manipulation multiplexée de fluides, mais ne permettent pas leur mise en forme en 3D.

La plateforme 3D-FlowPrint emprunte à chacun de ses concepts en délivrant des fluides via un système microfluidique jusqu'à une tête d'impression immergée, où la solution injectée peut être photopolymérisée. En découplant l'apport du matériau de sa polymérisation, cette plateforme peut fournir à la fois de la haute résolution et du multimatériaux.

La partie centrale de la plateforme est la tête d'impression. Elle doit permettre l'apport et la récupération du fluide injectée afin de ne pas contaminer l'environnement, et fournir une interface optimale pour la transmission d'un laser à travers une fibre optique injectée dans la tête. Nous avons développé quatre générations successives de têtes pour atteindre ces objectifs. La première était usinée et moulée avec du silicone et elle a permis d'apporter une preuve de concept, mais restait limitée dans ses capacités d'amélioration. La seconde était entièrement construite en 3D ce qui permettait une haute résolution de la géométrie et un prototypage rapide, mais l'interface optique n'était pas satisfaisante. La troisième combinait l'impression 3D avec un assemblage d'une lamelle de verre et d'un dôme de PDMS, permettant à la fois une géométrie précise et une interface optique validée. Cette troisième génération a permis le développement et la caractérisation de la plateforme pour la grande majorité des aspects, mais elle ne permettait pas d'imprimer du GelMA pour des questions chimiques. La quatrième génération a comblé le fossé en rajoutant une bulle d'air sous la tête permettant la non-adhérence du GelMA à la tête d'impression et résolvant donc le problème de la troisième génération.

Le développement des têtes d'impression s'est fait en parallèle de la caractérisation microfluidique du système. Les têtes d'impression travaillent en immersion, afin de pouvoir imprimer dans des puits de culture par exemple. Elles contiennent un canal d'injection et un canal d'aspiration, ainsi que des reliefs de surface afin que la solution injectée soit entièrement collectée et ne contamine pas le milieu. À travers des simulations numériques par éléments finis, nous avons défini des diagrammes de phase sur la capacité de collecte du matériau injecté pour la hauteur de travail, la vitesse de déplacement, le rapport des débits et la viscosité. Nous avons utilisé ce système de simulation pour optimiser les reliefs de surface et pour améliorer les têtes d'impression. Finalement, nous avons caractérisé le temps de changement entre deux fluides dans l'idée d'une séquence de matériaux pour une impression hétérogène.

Par l'ajout d'une fibre optique entre les deux canaux microfluidiques, il est possible de photopolymériser la solution injectée dans l'espace entre la tête d'impression et le substrat. Nous avons créé des têtes d'impression avec deux fibres optiques qui permettent l'obtention de deux tailles de faisceau optique et ainsi de bénéficier de deux vitesses d'impression pour imprimer des objets volumineux tout en gardant une capacité de haute résolution. Nous avons pu étudier les seuils de photopolymérisation du PEGDA et du GelMA ainsi que vérifier que le système microfluidique ne gênait pas la polymérisation. Ces analyses ont permis l'impression de structures 2D et 2.5D en haute résolution jusqu'à une largeur de ligne de 7 μm . La capacité d'impression multimatériaux a été prouvée par des objets complexes en 2D et en 3D. La plateforme 3D-FlowPrint a permis d'imprimer de manière robuste et reproductible des objets millimétriques d'inspiration biologique.

La plateforme a fourni des preuves de concept pour une utilisation en biologie. Nous avons créé des objets en PEGDA sur lesquels des cellules ou sphéroïdes n'avaient aucune adhérence afin de contraindre leur développement et étudier leur devenir. Au contraire, nous avons imprimé des structures support pour la réalisation de tissus en 3D. Nous avons caractérisé les paramètres de bioimpression de cellules en suspension afin d'optimiser la viabilité et réaliser une preuve de concept d'encapsulation de cellules. Ce projet a mené au brevet de la plateforme et de la tête d'impression²²² ainsi qu'à une publication dans *Additive Manufacturing* d'Elsevier.²²³

Cette thèse a ainsi porté sur de vastes domaines, à savoir l'instrumentation, le contrôle logiciel, la microfluidique, la photopolymérisation, l'impression 3D et la culture de microenvironnements. Elle m'a personnellement permis de m'enrichir de chacun de ces domaines. Elle m'a donné accès au monde de la biophysique où chaque projet apporte une pierre à l'édifice d'une meilleure compréhension du monde biologique et une meilleure santé pour tous. Je suis entièrement satisfait de l'avoir réalisée.

Pour la plateforme, nous sommes confiants dans ses capacités à être appliquée à différentes applications de systèmes biologiques. Pour des actions biologiques en milieu ouvert, l'aspect sonde microfluidique pourrait être extrêmement pertinent, là où une bioimprimante 3D classique est limitée à un module donné. La plateforme 3D-FlowPrint est aussi intéressante par son approche versatile : plusieurs matériaux imprimables, plusieurs vitesses d'impression, milieu ouvert, plusieurs longueurs d'onde possibles, plusieurs approches biologiques (surfaces non adhésives, support, cellules encapsulées, sphéroïdes) et co-impression d'hydrogel - placement de sphéroïdes. Cet outil trouverait donc parfaitement sa place dans des équipes de recherche, comme celle où la thèse s'est inscrite.

Pendant, il semble que plusieurs couches technologiques soient nécessaires (optique, fluide, pneumatique, 3D, matériaux, biologie) pour atteindre les objectifs de création de microenvironnements. Cette technologie est donc peut être trop complexe pour une utilisation popularisée dans ce domaine. Sur des projets spécifiques d'objets hétérogènes à haute résolution, elle permettrait de créer des objets précis que d'autres technologies ne pourraient pas réaliser. Pour une utilisation à plus grande échelle, les techniques de microextrusion permettent la création de microenvironnements, même si les inconvénients présentés dans l'état de l'art restent présents. D'autres techniques atteignent des objectifs similaires à ceux de la plateforme 3D-FlowPrint, à savoir haute résolution et multimatériaux, comme l'impression en puce microfluidique par photolithographie avec des procédés tout aussi complexes que celui présenté dans ce manuscrit. En conclusion, il semble qu'il n'existe aucune technologie universelle et totalement polyvalente et que chaque projet de recherche ou de santé devra trouver l'outil le plus pertinent pour l'application donnée.

La collaboration industrielle avec l'entreprise Fluigent a permis de disposer des technologies les plus avancées pour le contrôle des paramètres microfluidiques d'impression. Cette plateforme pourrait s'intégrer à travers sa tête d'impression dans des bioimprimantes 3D déjà présentes industriellement. Face à une concurrence particulièrement forte, un transfert de la technologie vers l'industrie est envisagé même si la démonstration de l'impression directe de cellules nécessite encore d'être consolidée.

Liste de protocoles

1	Protocole de création et vectorisation d'une pièce	172
2	Protocole de préparation des solutions polymérisables	174
3	Protocole de préparation du substrat dont traitement de surface	175
4	Protocole de mise en marche de la plateforme	175
5	Protocole de calibration de l'horizontalité de la tête	176
6	Protocole de calibration de l'horizontalité du support	176
7	Protocole de calibration de l'altitude entre la tête et le substrat	177
8	Protocole de vérification du spot optique	177
9	Protocole de début d'impression	178
10	Protocole de calibration de la dose d'impression en fonction de la largeur de ligne	179
11	Protocole de lancement de l'impression	180
12	Protocole de nettoyage de fin d'impression	180
13	Protocole de caractérisation de la bulle d'air pour impression de GelMA	181
14	Protocole d'impression 3D avec l'imprimante de stéréolithographie DWS	181
15	Protocole d'assemblage des têtes de troisième génération	183
16	Protocole de caractérisation du faisceau optique	183
17	Protocole caractérisation de la dose seuil avec lumière collimatée	185
18	Protocole de structuration de surface pour croissance biologique contrainte	186

Annexes

Description du fonctionnement du vectoriseur

Cette annexe décrit le fonctionnement du code Python du vectoriseur imagé dans la figure ci-dessous. Il est conseillé de regarder cette image sur un fichier numérique pdf, car l'image pourra être agrandie. Le schéma se lit du haut vers le bas. Chaque cadre représente une fonction, la fonction principale *Slicer entier multimatériaux* que l'utilisateur appelle étant le cadre bleu clair le plus large. En premier lieu, l'utilisateur donne le chemin vers les objets STL qu'il souhaite vectoriser. Les STL doivent être codés en ASCII et non en binaire. L'utilisateur choisit aussi la valeur des variables de vectorisation (hatching, slicing, etc.). Finalement, l'utilisateur choisit les graphiques qu'il souhaite afficher pour vérifier la vectorisation et exécute le programme.

La fonction principale appelle successivement les fonctions majeures de vectorisation :

- La lecture des fichiers STL et leurs mises en forme se fait dans *Extract data* et *Mise en forme*. Les STL sont des ensembles de triangles qui pavent les surfaces des objets. La fonction récupère l'ensemble des coordonnées des triangles dans l'espace tridimensionnel. Ensuite, les objets sont recentrés et les minimums relatifs sont mis à zéro dans l'axe Z. La liste de l'altitude de chaque lamelle est créée. L'aspect multimatériaux est sauvegardé par des listes de triangles différentes. La fonction d'affichage *Afficher STL* permet de vérifier que les bonnes pièces ont été chargées et que leur agencement respectif est correct. Le programme est très fiable à ce niveau.
- La fonction *Section contours multimat tous z* prend en entrée la liste des triangles de chaque matériau et la liste des altitudes Z des lamelles. Elle réalise une boucle sur tous les matériaux et appelle la fonction *Section contours tous z* qui elle réalise une boucle sur toutes les altitudes Z. Pour un matériau et une altitude Z, la fonction *Section contour* renvoie la coupe du matériau en cours à l'altitude Z. Pour cela, la fonction *Extract contours raw* sectionne l'ensemble des triangles présents à cette altitude et renvoie les segments de l'intersection entre le plan XY et chaque triangle tridimensionnel. La fonction *Section contours* a pour tâche de clarifier cette liste de segments en une seule suite de coordonnées XY. La fonction d'affichage *Afficher contours* permet de vérifier la lamellisation.
- La fonction *Vectoriser une couche multimatériaux* est la fonction centrale du vectoriseur. Elle prend en entrée une liste de contours pour chaque altitude Z et pour chaque matériau. Elle transforme ces contours en polygones grâce à la sacro-sainte bibliothèque *Shapely* (fonction *Creer Poly*). L'objet peut avoir plusieurs parties et des sections creuses. Il est important de déterminer les surfaces intérieures et extérieures et de séparer chaque partie distincte (la fonction *Hierarchie contours*). La bibliothèque *Shapely* permet maintenant de manipuler ces polygones avec une grande simplicité.

La sous-fonction *Creer zone bi-résolution* est appelée pour séparer les deux résolutions d'impression (si demandé). Pour cela, elle isole la partie centrale de chaque polygone, dans laquelle nous imprimerons en basse résolution. La partie restante correspond aux contours de la pièce et donc aux parties en haute-résolution. Ensuite, le périmètre de chaque polygone est utilisé pour constituer des murs (ou contours) de la pièce afin de lisser l'objet (fonction *Creer murs*). La partie à remplir par vecteurs parallèles est réduite d'autant. Puis, un réseau de lignes parallèles espacées de la valeur *hatching* est créé *via Shapely* sur tout le plan XY (fonction *Creer vecteurs*). Nous réalisons une intersection avec les polygones, et nous obtenons le remplissage des lamelles par un réseau de lignes juxtaposées parallèles. Cette action est répétée dans les deux résolutions. Les vecteurs sont ensuite triés en fonction du choix de l'utilisateur dans la fonction *Optimiser vecteurs* : impression de gauche à droite en allers-retours, impression de gauche à droite en allers seulement, impression par vecteur le plus proche ou sans tri. En perspectives, nous considérons d'implémenter une fonction dite du *voyageur* ou en anglais du *travelling salesman* qui optimise le temps de parcours entre plusieurs points (compliqué ici par la présence de vecteurs, et non de points). Cependant, nous préférons majoritairement imprimer en enchainant les vecteurs parallèles, cas dont l'option est déjà présente.
- Grâce à la fonction *Garder vecteurs allumés*, il est possible de faire en sorte que l'impression ne s'arrête pas entre deux vecteurs successifs si le déplacement entre ces deux vecteurs est au-dessus du polygone en cours. Cela veut dire que la tête d'impression reste dans la zone à remplir et arrive souvent entre deux vecteurs parallèles juxtaposés. Enfin, la fonction *Creer polygones des vecteurs* permet de recréer la forme exacte qui sera impri-

mée *via* de nouveaux polygones. Cela permet de vérifier la vectorisation de la pièce *via* la fonction d'affichage *Afficher zones* en comparant la coupe de l'objet STL et le polygone d'impression. Il peut arriver en effet que certaines pièces ne soient pas vectorisées (trop petites surfaces) ou que la multirésolution ne soit pas satisfaisante. La fonction d'affichage *Afficher vecteurs* permet elle de vérifier le tri des vecteurs.

- La fonction *Ecrire fichier Gcode multimat* conclut le programme en écrivant le fichier Gcode, qui sera interprétable par l'imprimante. Il écrit en premier les méta-datas relatives au fichier (variables d'impression, date, fichiers STL utilisés, temps d'impression calculé grâce à la fonction *Calcul temps d'impression*, etc.). Ensuite, pour chaque vecteur, il écrit une ligne dans un fichier texte selon la syntaxe Gcode. En plus des paramètres habituels comme le déplacement en X, en Y ou l'activation de la polymérisation, nous avons rajouté une série de paramètres spécifiques comme le fait qu'un vecteur soit en haute ou basse résolution, qu'il soit un mur sur le périmètre de l'objet, son matériau, etc. Entre chaque vecteur imprimant, calculé par la fonction *Vectoriser une couche multimatériaux*, il faut rajouter un vecteur de déplacement sans polymérisation pour se positionner à l'origine du vecteur suivant.

La fonction d'écriture du Gcode détecte aussi les changements d'altitude et les changements de matériaux qu'elle spécifie dans le fichier texte. Lors de l'interprétation du Gcode par le logiciel de commande de l'imprimante, ces séquences pourront impliquer des temps d'attente ou de relevage de la tête pour faciliter les flux. À ces moments, la fonction inscrit aussi le centroïde du polygone en cours d'impression, qui représente le centre d'un objet non rond. Ce centroïde pourra être utilisé pour positionner le canal d'injection de la tête au-dessus afin de réalimenter en matériau une pièce alambiquée 5.21. Le fichier Gcode est finalement généré et prêt à être chargé dans le logiciel LabVIEW commandant l'imprimante.

- Il est à préciser que nous avons aussi créé une fonction *modifier STL* qui permet de modifier les dimensions globales des STL avant de vectoriser les pièces. Il arrive souvent que l'on veuille imprimer la même pièce à une résolution différente, ou avec un rapport d'aspect XY sur Z différent. Plutôt que de repartir sur le logiciel de CAO, cette fonction permet rapidement de charger les STL, de les modifier et de recréer de nouveaux fichiers STL modifiés.

Protocole de création et vectorisation d'une pièce

Protocole n°1 : Protocole de création et vectorisation d'une pièce.

- Il faut tout d'abord concevoir la pièce sous Fusion 360 et y accéder *via Jupyter* :
 - Dans Fusion 360, concevoir la pièce voulue. En cas d'impression d'un objet en plusieurs parties (multimatériaux), il est possible de concevoir plusieurs corps et de les assembler afin de vérifier l'objet total.
 - Dans l'arborescence de Fusion 360, faire un clic-droit sur le projet principal (ou sur le corps choisi en cas d'assemblage) et choisir "enregistrer en tant que maillage". Il faut enregistrer autant de STL que de matériaux pour une impression multimatériaux. Par exemple la pièce *YinYang* peut être vectorisée en *YinYang_1.stl* et *YinYang_2.stl*
 - Une fenêtre s'ouvre et choisir le format "STL (ASCII)". Ce format de fichier est ouvrable par un éditeur de texte et enregistre les données dans un format lisible par des humains, au contraire du format "STL (binaire)" dans lequel les données sont codées.
 - Ouvrir l'interface *Python* en ligne *Jupyter*. Il est possible de l'installer *via Anaconda*.
 - Accéder au dossier *vectoriseur*. Ce dossier doit contenir la dernière version du vectoriseur (par exemple *vectoriseur_3_16.ipynb*). Il doit aussi contenir un dossier *pieces* avec les fichiers STL, un dossier *librairie* avec les librairies développées pour le vectoriseur et un dossier *gcode* dans lequel le gcode sera écrit. Ouvrir la dernière version du vectoriseur.
 - Exécuter la première fenêtre (Maj+Entrée suffit), qui appelle les librairies. La seconde fenêtre n'a besoin d'être exécutée que si la librairie du vectoriseur a besoin d'être rechargée après une modification.
- La troisième fenêtre doit être complétée avec les variables utilisateurs. Tout d'abord les paramètres globaux :
 - La liste *Files* doit être complétée par les fichiers STL et leur chemin depuis le dossier *vectoriseur*. Par exemple, pour vectoriser un yin-yang en deux matériaux, il faut mettre `[':/pieces/YinYang_1.stl', '/pieces/YinYang_2.stl']`
 - La variable *slicing* correspond à la hauteur d'une couche, typiquement 50 μm . Toutes les unités sont en μm par défaut.
 - La variable *arrangement* permet de choisir l'enchaînement des vecteurs d'une même couche. -1 : pas d'arrangement. 0 : impression dans 1 seule direction, vecteurs classés. 1 : impression par vecteur le plus proche. L'arrangement 0 permet de bonnes impressions.
 - La variable *vitesse* ne change pas la vectorisation, mais influe sur le temps total d'impression. Ce résultat est affiché pour l'utilisateur et à prendre en compte lors de la vectorisation d'une pièce.
 - La variable *attente* marque dans le gcode une attente entre deux vecteurs lors d'un changement de matériaux ou de hauteur.
 - La variable *ecrire_gcode* permet de n'écrire le gcode seulement que si l'utilisateur est satisfait de la vectorisation.
 - La variable *garder_laser_allume* permet de garder le laser allumé lors du déplacement entre deux vecteurs parallèles successifs.
 - La variable *alterner* peut être utile pour des impressions multimatériaux. Cela permet de remonter la tête d'une distance $slicing/N_{matériaux}$ afin de favoriser l'impression des matériaux successifs.
 - La variable *overlap* permet d'insoler de la distance spécifiée en dehors de la forme. Cela est utile pour joindre un objet multimatériaux.
 - La variable *surinsolation* permet de repasser le laser au-dessus d'une zone déjà polymérisée. Il est possible d'avoir préalablement changé la solution injectée vers du milieu afin de ne pas augmenter la résolution, mais simplement de surpolymériser le matériau.
 - La variable *dist_min_2_pts* détermine la longueur minimale d'un vecteur à imprimer. Cette variable est particulièrement importante lors de la vectorisation de pièce arrondie pour éviter de générer un grand nombre de petits vecteurs successifs qui créeraient une impression saccadée.

- La variable *angle_min_3_pts*
- La variable *ordre_materiaux*
- La variable *contours_interieurs*
- Puis les paramètres spécifiques à chaque matériau :
 - La variable *deux_res* permet d'activer la vectorisation avec deux résolutions. Lors de la vectorisation d'une couche, si le programme détecte une zone assez large, la double résolution prend place. Le centre sera vectorisé avec des lignes larges et le reste avec une meilleure résolution afin de garder la précision de l'objet sur les faces externes.
 - La variable *nb_mur* permet de choisir le nombre de contours que fera le laser à chaque couche. Cela permet de lisser l'objet sur les surfaces et de diminuer l'effet discret des lignes parallèles.
 - La variable *hatching1* est la distance entre deux lignes successives. Cela correspond au hatching des lignes haute résolution en cas d'impression avec deux résolutions.
 - La variable *hatching2* est la distance entre deux lignes successives basse résolution en cas d'impression avec deux résolutions.
 - La variable *L_haute_res* est la distance, depuis le périmètre, qui sera remplie par la haute résolution.
 - La variable *distance_min_hatching2* est la distance minimale que de pouvoir remplir la basse résolution. Si la zone en cours est plus petite, le programme vectorisera en haute résolution.
 - La variable *L_chevauche* est la distance du chevauchement entre les deux résolutions.
 - Si ces paramètres sont identiques pour chaque matériau, il est par exemple possible d'écrire *param_mat2=param_mat1*.
- Il faut ensuite valider l'exécution :
 - Puis les paramètres de visualisation de la vectorisation *voir_stl*, *voir_contours*, *voir_zones*, *voir_vecteurs* qui permettent de voir respectivement le STL, la lamellisation, les zones imprimées hautes et basses résolutions et l'agencement des vecteurs.
 - Exécuter cette fenêtre. Le vectoriseur affiche la vectorisation des couches successives.
 - L'utilisateur est invité à vérifier la vectorisation, à la modifier si besoin. Lorsque l'utilisateur est satisfait, il peut modifier la variable *ecrire_gcode* en *True* afin d'écrire le gcode.
 - La quatrième fenêtre permet de modifier les dimensions de l'objets dans les axes XYZ.

Protocole de préparation des solutions polymérisables

Protocole n°2 : Protocole de préparation des solutions polymérisables

- La solution qui a servi à caractériser la plateforme est basée sur du PEGDA :
 - Le PEGDA étant stocké à 4°C, il est nécessaire de ramener la solution à température ambiante afin de pouvoir le prélever (une heure environ suivant le volume de stockage).
 - Préparer la solution mère de LAP à 0.2% (m/v). Mélanger le LAP et la quantité requise de milieu (eau - RPMI - DMEM - PBS en fonction de la solution finale). Agiter pendant deux heures. Si un précipité est observable au fond du tube, le mélanger (vortex) puis le positionner dans une cuve à ultrasons pendant 5 minutes et l'agiter à nouveau pendant deux heures.
 - Pour obtenir 3 ml de solution constituée de 40% PEGDA 700, 60% eau et contenant 0.01% (m/v) de LAP, nous prélevons 1.2 ml de PEGDA. Aspirer doucement, car la viscosité du PEGDA le rend difficile à prélever. Changer de cône de pipette si besoin de prélever en plusieurs fois.
 - 150 µl de LAP est ajouté à partir de la solution mère à 0,2% (m/v).
 - Rajouter le milieu nécessaire en n'oubliant pas le volume déjà ajouté *via* la solution mère de LAP. (Il faut pipetter) 1.65 ml d'eau - RPMI - DMEM - PBS).
 - Afin d'imager, des micro- ou nano-particules fluorescentes ont parfois été ajoutées à une concentration de 0.01% (m/v), à partir de solutions mères à 1% (m/v).
 - Envelopper de papier aluminium afin d'empêcher la polymérisation.
 - Agiter pendant deux heures
 - Note : Il est possible de réaliser les solutions dans des eppendorfs de 1 ml pour réduire les consommables.
- Pour réaliser des structures supportrices d'épithéliums, nous avons rajouté de l'acide acétique et de la fibronectine pour favoriser l'adhérence de cellules de cancer d'intestin Caco2⁵² :
 - De l'acide acrylique fait partie de la solution à 30%.
 - De la fibronectine fait aussi partie de la solution à 1% de la solution totale.
 - Le PEGDA est toujours à 40%.
 - les solvants sont 20% de PBS et 9% d'eau-DI.
- Pour réaliser des structures chargées en cellules (cell-laden en anglais), nous avons utilisé une solution à base de GelMA :
 - Nous avons utilisé cette solution : 20% GelMA, 80% eau, 0.05% LAP.
 - Le GelMA est un solide poreux très aéré. Il est mesuré en masse. Il doit être tassé pour rentrer dans l'eppendorf ou le falcon.
 - Pour le GelMA, nous ajoutons 0.05% de LAP. Il peut être prélevé depuis une solution mère à 1% afin de diminuer le volume à pipetter.
 - Pour les cellules PC3, nous ajoutons 80% de DMEM avec 5% de SVF.
 - À 20% dans du milieu de culture, le GelMA est liquide à 37°C et la solution est donc agitée deux heures à cette température.

Protocole de préparation du substrat dont traitement de surface

Protocole n°3 : Protocole de préparation du substrat dont traitement de surface

- Préparer une solution de MAPTMS : 96% d'éthanol, 3% d'acide acétique dilué à 10%, 1% de MAPTMS.
- Agiter pendant 20 minutes.
- Nettoyer les lamelles (24 mm · 32 mm · 150µm) à l'acétone, puis rincer à l'eau, puis nettoyer avec de l'éthanol et sécher à l'azote.
- Effectuer un plasma d'air (Puissance = 200 W, f = 40 kHz, Pression = 0.45 mBar) sur les lamelles pour les activer
- Recouvrir les lamelles à fonctionnaliser avec la solution de MAPTMS.
- Incuber pendant cinq minutes.
- Éliminer la solution de MAPTMS.
- Rincer les lamelles fonctionnalisées avec des fonctions métacrylate avec de l'éthanol.
- Stocker sous vide les lamelles fonctionnalisées.
- Laver la lame de verre (75 · 50 mm²) sur laquelle est fixé le cadre de PMMA. Laver avec acétone, eau, éthanol, et sécher à l'azote.
- Fixer une lamelle traitée MAPTMS sur la lame avec du scotch double-face (Tesa tape de RadioSpare).
- Positionner la lame sur la platine XY pour l'impression.

Protocole de mise en marche de la plateforme

Protocole n°4 : Protocole de mise en marche de la plateforme

- Allumer l'ordinateur de la plateforme, le boîtier de commande laser, le GBF, le boîtier de commande de l'actionneur en Z, le boîtier de commande de la plateforme XY et de la focale, le régulateur de température et le contrôleur de la lampe au mercure
- Se connecter sur l'ordinateur
- Après avoir attendu que l'ordinateur soit totalement connecté depuis quelques minutes, allumer le contrôleur de la caméra
- Si l'expérience en cours requiert une impression Air-Assisted Printing (3.5), allumer le contrôleur de pression 25 mBar et le logiciel *A-i-O*
- Une fois que le logiciel *A-i-O* est ouvert et fonctionnel pour le contrôleur de pression 25 mBar, allumer le module Line-Up Fluigent. Si l'expérience ne requiert pas la bulle d'air, il est possible d'allumer le module Fluigent dès le début.
- Ouvrir le dossier *Bioprint* puis le projet LabVIEW *bioprint.lvproj*.
- Dans le projet, ouvrir le fichier *Main* et l'exécuter (flèche blanche en haut à gauche).
- Le programme LabVIEW affichera un message si un des appareils n'a pas été allumé. Cela sera visible aussi *via* l'indicateur *Prêt* qui sera rouge. Si tout est correct, l'indicateur sera vert, signalant que les calibrations ou une impression peuvent démarrer.

Protocole de calibration de l'horizontalité de la tête

Protocole n°5 : Protocole de calibration de l'horizontalité de la tête

- La tête est positionnée au-dessus de l'objectif du microscope grâce à une plateforme manuelle deux axes actionnable avec des vis de précision. Cela permet de placer la zone de polymérisation au centre de l'image pour étudier le phénomène en direct. Ici, nous voulons vérifier l'horizontalité de la tête, donc nous allons avoir besoin de la déplacer
- Déplacer la tête grâce aux vis de précision pour positionner le point d'observation du microscope sur le périmètre de la tête au niveau d'un des points cardinaux (haut, bas, gauche, droite).
- Focaliser sur ce point
- Sur le logiciel LabVIEW, dans le cadre *horizontalité de la tête* de l'onglet *calibration*, appuyer sur le bouton *OK* associé au point cardinal afin d'enregistrer l'altitude de ce point.
- Refaire cette manipulation pour les trois autres points cardinaux.
- Le logiciel a enregistré les quatre altitudes relatives des quatre points cardinaux de la tête par le biais de la focale. Le logiciel calcule alors l'inclinaison de la tête d'impression.
- Ensuite régler manuellement l'horizontalité grâce au goniomètre à vis deux axes qui soutient le portoir de la tête. Ce goniomètre permet de corriger les défauts d'horizontalité du microscope, du portoir ou de la tête.
- Refaire la procédure précédente pour vérifier l'horizontalité après avoir modifié le goniomètre.
- Focaliser sur le dôme de PDMS au niveau de la zone de polymérisation.
- Le logiciel donne la marge entre cette zone (la zone de polymérisation : ce doit être le point le plus bas de la tête) et le périmètre.

Protocole de calibration de l'horizontalité du support

Protocole n°6 : Protocole de calibration de l'horizontalité du support

- Le processus est similaire à la calibration de l'horizontalité de la tête.
- Faire des croix avec un marqueur sur les quatre angles de la lamelle.
- Focaliser sur trois des angles en déplaçant la platine XY.
- Appuyer à chaque fois sur *Ok* dans le cadre sur *l'horizontalité du substrat* de l'onglet *calibration* du programme LabVIEW.
- Le programme enregistre les valeurs de la position XY et de l'altitude Z
- Une fois les trois points effectués, le programme calcule l'équation du plan du substrat, et en déduit l'angle dans l'axe X et dans l'axe Y.
- Utiliser les quatre vis présentes sur le porte-échantillon afin de régler l'horizontalité du substrat.
- Re-vérifier l'horizontalité

Protocole de calibration de l'altitude entre la tête et le substrat

Protocole n°7 : Protocole de calibration de l'altitude entre la tête et le substrat

- Le but est de déterminer la droite de régression entre les valeurs de la focale et de l'actionneur.
- Cette droite de régression permet de calculer l'altitude du substrat sur l'échelle de l'actionneur.
- Focaliser avec le microscope sur le substrat et appuyer sur *Substrat Ok* de l'onglet *calibration* du programme LabVIEW. Le programme enregistre la valeur de la focale pour le substrat. C'est à partir de cette valeur que la régression déterminera l'altitude sur l'échelle de l'actionneur.
- Positionner la tête à quelques millimètres du substrat avec l'actionneur.
- Focaliser avec le microscope sur la tête et appuyer *Enregistrer point focale / actionneur* pour enregistrer à la fois la valeur de la focale et de l'actionneur.
- Modifier l'altitude de la tête *via* l'actionneur.
- Re-enregistrer un couple focale — actionneur.
- Effectuer cette action à différentes hauteurs.
- Le programme calcule la droite de régression entre l'échelle de la focale et de l'actionneur, sous la forme d'une fonction affine. La pente vaut normalement 1 si la mesure a été faite dans l'air, environ 0.7 si la mesure a été faite dans l'eau.
- Le programme calcule par régression la hauteur du substrat sur l'axe de l'actionneur, grâce à la valeur de la focale.
- Appuyer sur *Calib Z Ok*. Le programme enregistre cette calibration dans un fichier texte accessible pour d'ultérieures impressions. Sur l'onglet principal, le programme affiche l'altitude de la tête relativement au substrat et un schéma récapitulatif des informations du placement de la tête et du substrat pour pouvoir manipuler efficacement. Il est maintenant possible de déplacer la tête sur l'axe de deux manières : soit *via* le déplacement absolu sur l'échelle de l'actionneur, soit *via* l'échelle relative par rapport à l'altitude relative au substrat.
- Facultatif : Diminuer précautionneusement la hauteur de la tête, relative au substrat, jusqu'à zéro pour voir le PDMS de la tête légèrement s'écraser sur la lamelle et confirmer la mesure de l'altitude.

Protocole de vérification du spot optique

Protocole n°8 : Protocole de vérification du spot optique

- La méthode de caractérisation du cône optique est détaillée dans la partie 5.1.2.
- À la place de la lame du substrat, placer la lame porteuse du film fluorescent (voir Fig. 5.2.A) qui permet d'observer le spot optique avec le filtre FITC.
- Descendre la tête à l'altitude nécessaire pour une impression (typiquement 100 μm)
- Allumer le laser et vérifier l'aspect du spot optique. S'il est trop large, cela peut impliquer que la tête est usée ou que la fibre est mal positionnée. Résoudre ce problème en repositionnant la fibre, en la changeant ou en changeant de tête.

Protocole de début d'impression

Protocole n°9 : Protocole de début d'impression

- En début d'expérience : faire circuler préalablement à l'impression du solvant dans les tubes. L'injection peut aller dans un falcon "poubelle". La sortie peut aspirer dans un falcon de solvant. Le passage des solvants par la tête n'est pas obligatoire. Cette étape peut durer plusieurs minutes ou dizaines de minutes. Vérifier le volume dans le falcon de récupération.
- Remonter la tête.
- Placer la lame porteuse de la lamelle traitée MAPTMS.
- Remplir le cadre de PMMA de la solution de l'environnement.
- Descendre la tête à l'altitude d'impression.
- Vérifier que les flux circulent bien avec des rapports pression — débits attendus. Si ce n'est pas le cas, cela peut suggérer un engorgement partiel ou total des tubes. La régulation en débit permet de forcer le passage du fluide (solvant ou photo-polymérisable) afin de déboucher les tuyaux et de sécuriser les conditions de manipulation.
- Arrêter le nettoyage des tubes *via* les solvants en passant à l'hydrogel polymérisable. Attendre le temps nécessaire à ce qu'il soit acheminé jusqu'à l'extrémité des tubes.
- Placer les tubes de l'injection et de l'aspiration dans la tête d'impression
- En cas de bulles d'air (bloquées par la tête lors de l'immersion ou acheminées par les tubes), faire vibrer le portoir de la tête pour les déloger. Il est possible de relever la tête jusqu'à l'interface air-liquide, de couper l'injection afin que l'aspiration aspire tout le fluide restant par capillarité sur la tête, puis de replonger la tête et de relancer l'injection.

Protocole de calibration de la dose d'impression en fonction de la largeur de ligne

Protocole n°10 : Protocole de calibration de la dose d'impression en fonction de la largeur de ligne

- Dans l'onglet " *Vecteurs* du programme, appuyer sur *ouvrir fichier texte* et choisir le fichier de vecteurs de test nommé *changement puissance*. Il code pour l'impression des lignes parallèles de 1 ou 2 millimètres de long, espacées de 500 μm , à une vitesse choisie. Entre chaque vecteur, la puissance augmente progressivement.

ΔX	ΔY	Vitesse	Etat laser	Altitude Z	Puissance	Matériau
0	-2000	0.1	1	24200	5	1
500	2000	0.1	0	24200	0	1
0	-2000	0.1	1	24200	10	1
500	2000	0.1	0	24200	0	1
0	-2000	0.1	1	24200	20	1
500	2000	0.1	0	24200	0	1
0	-2000	0.1	1	24200	40	1
500	2000	0.1	0	24200	0	1
0	-2000	0.1	1	24200	80	1
500	2000	0.1	0	24200	0	1
0	-2000	0.1	1	24200	120	1

TABLE 4 – Tableau de vecteurs de calibration de la dose

- Il est possible de modifier les paramètres de ces vecteurs de façon globale *via* l'encadré sur la gauche de l'onglet ou vecteur par vecteur *via* le tableau de vecteurs.
- Sur l'onglet principal, appuyer sur *Impression*. Le laser s'allume et la platine se déplace pour imprimer le premier vecteur.
- La séquence imprime des vecteurs parallèles non collés à différentes puissances. Les premières lignes n'ont généralement pas atteint le seuil de polymérisation. Les dernières sont généralement sur-dosées.
- Il est possible de répéter ce test en variant le cycle du GBF (effet direct sur la puissance du laser), la vitesse de déplacement de la tête (effet direct sur la dose), la hauteur ou les flux (effets indirects sur la largeur de ligne).
- Il est possible de régler des variables globales à l'impression dans l'encadré *Variables d'impression*, comme *garder le temps le laser allumé entre deux vecteurs imprimant* pour augmenter la continuité ou *Temps d'attente avec laser allumé avant le déplacement* pour favoriser l'ancrage du début des vecteurs.
- Choisir les variables adaptées à l'impression, avec la largeur de ligne intéressante. Choisir préférentiellement la première ou seconde largeur de ligne qui permet l'impression de lignes stables et régulières. Les premières lignes imprimées sont généralement trop faiblement polymérisées pour garantir une tenue mécanique. Elles ondulent dans le milieu.
- Charger le fichier de vecteur *Surface dans le même sens*. Ce fichier imprime des vecteurs parallèles juxtaposés, sans allers-retours, avec les mêmes paramètres pour tous les vecteurs. Adapter l'écart entre les vecteurs (hatching) à 90% de la valeur des largeurs de lignes choisies ci-dessus, avec le bouton *Modifier dimensions* de l'encadré *Modifier vecteurs*.
- Lancer l'impression et vérifier le chevauchement des lignes. Modifier l'écart entre les lignes et relancer l'impression si besoin.
- Facultatif en cas d'objet multimatériaux : Mesurer le temps de changement de matériau :
 - Sur l'onglet principal, choisir un autre canal sur la vanne multivoies.
 - Chronométrer le temps nécessaire au renouvellement de la zone de polymérisation par le nouveau fluide.

Protocole de lancement de l'impression

Protocole n°11 : Protocole de lancement de l'impression

- Utiliser la valeur déterminée dans le protocole précédent pour le chevauchement des lignes comme variable *hatching* pour la vectorisation des pièces *via* le programme Python (voir protocole n°1, p.172).
- Les étapes suivantes sont dans le programme LabVIEW : Rentrer les paramètres globaux pour le chargement du gcode dans l'encadré *Fichiers de vecteurs*. Entre autres, rentrer la valeur du temps d'attente lors de changement de matériaux.
- Charger le fichier gcode de l'objet à imprimer *via* la commande *Ouvrir Gcode* sur l'onglet *Vecteurs*
- Vérifier les vecteurs issus du gcode en passant de couche en couche *via* l'encadré *voir couche*
- Lancer l'impression de la pièce.
- Il est possible de l'arrêter *via* le bouton *Stopper nettoyage*. Il est aussi possible de la mettre en pause avec le bouton *Pause*, pour observer l'échantillon en cours d'impression ou modifier des variables. En appuyant sur le bouton *Reprendre*, la platine XY et l'actionneur Z se replace au point de l'arrêt, pour continuer l'impression.

Protocole de nettoyage de fin d'impression

Protocole n°12 : Protocole de nettoyage de fin d'impression

- Le rinçage de l'échantillon pour enlever le biomatériau non polymérisé peut se faire de deux manières :
 - Avec la tête d'impression et la vanne multivoies : Changer le fluide, positionner la vanne vers la solution de l'environnement pour rincer l'échantillon du biomatériau non polymérisé.
 - A la main : remonter la tête. Avec une seringue ou une pipette, retirer le fluide environnant puis en remettre du nouveau. Répéter l'action de rinçage.
- Mettre le tube de l'injection dans un falcon poubelle et l'aspiration dans un falcon de 15 ml de solvant (éthanol pour du PEGDA, eau chaude pour du GelMA).
- Enlever les falcons de biomatériaux et les remplacer par des falcons de 15 ml solvant.
- Positionner une boîte de pétri avec du solvant sous la tête et l'y immerger.
- Lancer la séquence *Nettoyage tubes* sur l'onglet *Calibration*. Cette séquence alterne entre plusieurs tubes à nettoyer (en cas d'impression multimatériaux) et un tube vide, afin de pousser de l'air. Sur le canal de l'aspiration, le système profite du module *Fluigent Push-Pull* pour aspirer du solvant puis pousser de l'air (au niveau de la poubelle, le tube ne plonge pas dans la poubelle, mais reste positionné au dessus du liquide. Le fluide est recueilli dans le falcon. En cas de pression positive, seul de l'air est poussé.). La séquence fait aussi bouger la tête dans la boîte de pétri contenant le solvant.
- La séquence peut durer plusieurs heures. Il est possible de l'arrêter *via* le bouton *Stopper nettoyage*.
- Remonter la tête et stopper le programme avec le bouton *STOP*.
- Jeter le solvant de la boîte de pétri. Jeter la poubelle de solvant de l'injection et de l'aspiration.
- Fermer le programme et éteindre les appareils.

Protocole de caractérisation de la bulle d'air pour impression de GelMA

Protocole n°13 : Protocole de caractérisation de la bulle d'air pour impression de GelMA

- Brancher les tubes pneumatiques à l'arrière de la tête
- Sur le logiciel *A-i-O* choisir une pression de 2 mBar.
- Immerger la tête. La pression choisie devrait au moins permettre d'empêcher le fluide de pénétrer dans la cavité de la bulle (4 mBar par exemple).
- Augmenter ou diminuer la pression de la bulle afin de la faire grossir ou diminuer, et donc de la faire plus ou moins dépasser de la tête.
- Focaliser sur les nanoparticules présentes dans la solution entre le substrat et la bulle d'air. La focale permet de déterminer la hauteur des nanoparticules précisément : quelques microns près, les nanoparticules deviennent nettes ou floues. Au plus bas, le substrat sera visible par une couche de nanoparticules stables (au contraire des cellules en suspension qui bougent) puis par l'absence de nanoparticules focalisées (dans le verre du substrat). Au plus haut, les nanoparticules ne seront pas visibles dans la bulle d'air. Une zone ronde sans nanoparticule focalisée signifie donc que la focale est dans la bulle. Encore plus haut, il est possible de voir la tête d'impression.
- Placer la focale à 50 μm ou 100 μm du point le plus bas de la tête (la couronne extérieure).
- Modifier la pression de la bulle pour qu'elle atteigne exactement cette hauteur.
- Calibrer la distance entre la bulle d'air et le substrat d'après la méthode du protocole n°7, p.177

Protocole d'impression 3D avec l'imprimante de stéréolithographie DWS

Protocole n°14 : Protocole d'impression 3D avec l'imprimante de SLA DWS

- Concevoir la pièce en 3D par CAO sur Fusion 360 (voir partie 2.3.1).
- Préparer la pièce sur NAUTA :
 - Importer le fichier STL sur le logiciel NAUTA. Importer un seul fichier. Les étapes suivantes préparent la pièce. Une fois prête, nous dupliquerons la pièce autant de fois que nécessaire.
 - Mettre le côté arrière de la tête vers le côté substrat. L'extrémité de la tête côté impression doit être vers le haut.
 - Déplacer la tête de 2.5 mm vers le haut. Les couches collées à la plateforme substrat de la DWS n'ont pas une bonne qualité, car elles sont sur-insolées pour favoriser l'adhérence à la plateforme. La tête sera donc portée par des piliers, eux-mêmes unis par une base. La base et les piliers seront sur-insolés.
 - Avec l'option *piliers sur surface*, ajouter des piliers entre la tête et le substrat. Utiliser les paramètres suivants. Contact size = 0.5 mm, Max distance = 1.1 mm, Border distance = 0 mm, Contact strength = 80 %, Break point strength = 80 %.
 - Ajouter aussi des piliers au niveau des parties suspendues qui servent à fixer la tête sur son portoir.
 - Ajouter une base pour unir les piliers, d'une épaisseur de 250 μm .
 - Copier les têtes autant de fois que nécessaire.
 - S'il faut imprimer plusieurs têtes avec des géométries légèrement différentes, il est possible de copier les piliers d'une tête à une autre.
 - Il est possible d'ajouter un texte pour identifier chaque tête.
 - Enregistrer et exporter la pièce en fichier *.factor*
- Ouvrir le logiciel FICTOR qui vectorise les pièces et commande l'imprimante :

- Importer le fichier *.factor* des têtes d'impression.
- Dans la liste des matériaux, choisir la résine *DL260*.
- Choisir les paramètres d'impressions suivants :
 - Les premières couches ont besoin d'être sur-insolées ($v_{laser} = 180m/s$). Ces couches sont dans la base. Les couches suivantes sont encore sur-insolées dans les piliers ($v_{laser} = 1800m/s$). Les paramètres stables pour la haute-résolution commencent à la troisième séquence de paramètres ($v_{laser} = 5600m/s$).
 - Avec la DL260, la distance entre deux passages sur le plan XY (hatching) ou dans l'axe Z (slicing) ne varie pas (30 μm). Avec d'autres résines (DS3000, HF12), ces valeurs peuvent être égales à 50 μm dans les parties sans besoin de précisions, comme l'arrière des têtes. Dans les parties avec besoin de résolution (partie avant avec confinement microfluidique), ces valeurs peuvent être descendues à 30 μm .
 - Choisir les paramètres suivants : Contours number = 3, indentation = 0.01 mm, Ops validé, TTT validé, Z compensation = 0 mm, laser speed = 5800 mm/s.
- Appuyer sur *estimer* pour estimer le temps d'impression. En cas de temps d'impression trop long, il est possible de retirer des têtes du fichiers NAUTA. Cependant, le temps d'impression est grandement dû au nombre de couches dans l'axe Z, et non au nombre de pièces.
- Sortir le bac de DL260 *Haute résolution*. Mélanger la résine avec une spatule afin d'homogénéiser la solution.
- Régler la hauteur de la plateforme relativement à la calibration marquée sur le bac de résine (en suivant la procédure classique de la DWS. Requier une formation spécifique). Chaque bac a une valeur différente.
- Fixer la plateforme substrat sur son portoir.
- Mettre le bac de résine en place.
- Sur Fictor, appuyer sur *impression*
- Au bout d'un quart d'heure, appuyer sur *Pause* (et non *STOP!*). Observer si les premières couches se sont bien imprimées. Dans le cas contraire, corriger la source de l'erreur et relancer une nouvelle impression. Sinon appuyer sur *Reprendre*.
- Développement :
 - A la fin de l'impression, sortir la plateforme sur laquelle sont fixées les têtes.
 - Avec une spatule métallique, décoller les bases. Si les bases ou les piliers cassent, ce n'est pas grave.
 - Avec une lame de cutter, casser les piliers de support au point prévu de cassure.
 - Il faut maintenant retirer la DL260 non polymérisée de la surface de la tête et de l'intérieur des canaux.
 - Pour chaque tête, les asperger du solvant de la résine (acétone pour la DL260, isopropanol pour la DS3000 et la HF12). Puis les plonger dans un falcon de 50 ml rempli de solvant.
 - placer le falcon dans le bain à ultrasons pendant 15 min.
 - Re-rincer les têtes au solvant. Puis avec une soufflette d'azote, éjecter la solution présente sur la tête qui est encore un mélange de DL260 et de solvant. Il est possible d'utiliser une seringue pour injecter directement du solvant dans les canaux.
 - Répéter plusieurs fois l'action d'asperger les pièces de solvant et de souffler à l'azote. Cela permet entre autres de sortir la DL260 liquide des canaux.
 - Remettre les pièces dans le solvant dans le falcon, et remettre 15 min aux ultrasons.
 - Certaines têtes peuvent avoir des amas de DL260 coincés dans les canaux. Avec une pointe de seringue fine, il est possible de les déloger des canaux.
 - Re-sécher à l'azote. Vérifier l'état des têtes et l'ouverture des canaux.
 - Facultatif : Il est possible finalement de sur-polymériser les pièces dans un four UV au cas où certaines réactions de polymérisation n'aient pas toutes eu lieu.

Protocole d'assemblage des têtes de troisième génération

Protocole n°15 : Protocole d'assemblage des têtes de troisième génération

- Protocole assemblage
- Nous préparons un mélange 1 :4 de la colle époxy E301 et le mettons dans une seringue avec une pointe de seringue de gauge 32. La seringue est positionnée sur l'appareil *Tresky* et pressurisée. Grâce à une observation par des oculaires, nous pouvons positionner la seringue précisément en XYZ et déposer la colle dans la cavité prévue à cet effet (voir Fig. 3.13.A.ii).
- Ensuite, nous changeons d'outil et sélectionnons une pointe de seringue de gauge 27 pour aspiration. Nous attrapons une lamelle avec du vide (préalablement nettoyée à l'acétone, rincée à l'eau, nettoyée à l'isopropanol et séchée à l'azote), et la déposons dans l'encoche prévue (voir Fig. 3.13.A.iii). La colle est polymérisée à 70°C pendant une heure.
- Ensuite, nous préparons le PDMS (Sylgard 184 1 :10) et le mettons dans une nouvelle seringue. De même que pour la colle, nous le déposons avec précision grâce à la *Tresky* sur la lamelle de verre (voir Fig. 3.13.A.iv).

Protocole de caractérisation du faisceau optique

Protocole n°16 : Protocole de caractérisation du faisceau optique

- Il faut d'abord acquérir les photos :
 - Placer la lamelle de verre portant le film *Daffodil 310 Roscolux* sur la platine du microscope.
 - Placer le cube de fluorescence FITC. Il coupera la lumière directe de la fibre laser, mais transmettra la lumière émise par la surface fluorescente.
 - Mettre en place la fibre dans la situation voulue : caractérisation de la fibre témoin, fibre caractérisée à travers l'interface verre + PDMS, etc.
 - Calibrer la distance entre la fibre et la surface d'après le protocole n°7, p.177.
 - Placer la fibre à 1000 µm.
 - Focaliser avec le microscope sur le film fluorescent.
 - Allumer le laser.
 - Déplacer la platine pour que le spot optique soit parfois au-dessus de la surface et parfois à côté. Vérifier que le spot ne soit visible que *via* le film fluorescent.
 - Déplacer la fibre entre 50 µm et 1000 µm pour trouver la distance focale de la fibre.
 - Choisir le temps d'acquisition du logiciel *Nis-D* pour que le contraste soit pertinent à cette distance.
 - Placer la tête à 1000 µm, placer le spot au-dessus du film fluorescent.
 - Pour chaque hauteur entre prendre 50 µm et 1000 µm Par exemple 50 µm, 100 µm, 250 µm, 500 µm, 750 µm, 1000 µm.
 - Se placer à la hauteur désirée.
 - Prendre un photo avec le logiciel *Nis-D*.
 - Enregistrer sous le format "h1000.jpg", pour la hauteur 1000 µm.
- Il faut ensuite analyser ces informations *via* un code Python. Le code génère une image 2D coloré qui fournit l'intensité du spot le long de l'axe Z.
 - Ouvrir *Python* avec *Jupyter*. Ouvrir le programme *afficher faisceau optique spot laser*.
 - Exécuter la première fenêtre (bibliothèques) et la seconde (fonction).
 - Dans l'explorateur de fichier de l'ordinateur, placer l'ensemble des images acquises dans un dossier (par exemple *Caracterisation_faisceau_optique* et placer ce dossier à côté du fichier python.
 - Définir les variables utilisateur :

- *Pas* : la distance d'interpolation en Z. 10 μm convient bien.
- *path1* : le chemin depuis le dossier du fichier python. Dans l'exemple : `./Caracterisation_faisceau_optique/`.
- *files1* : la liste des noms des fichiers dans le dossier. Dans l'exemple : `["h50.jpg", "h100.jpg", "h250.jpg", "h500.jpg", "h750.jpg", "h1000.jpg"]`.
- *Lhfiles1* : la liste des hauteurs des images acquises. Dans l'exemple : `["h50.jpg", "h100.jpg", "h250.jpg", "h500.jpg", "h750.jpg", "h1000.jpg"]`.
- *facteurs_acquisition1* : le facteur entre les différentes acquisitions si temps d'acquisition ou gains différents. Il arrive qu'en s'éloignant de la distance focale, le spot n'ait plus assez d'intensité pour être mesuré avec les conditions même conditions qu'à la distance focale. Par exemple, le temps d'acquisition est multiplié par 10 pour les deux images à 750 μm et 1000 μm . Alors la variable vaut `[1,1,1,1,10,10]`. Nous déconseillons d'utiliser ce système à cause de non-linéarité.
- L'ensemble de variables aux noms équivalents avec un *2* à la fin ne sont pas à prendre en compte. Elles sont expliquées plus bas.
- Pour la même raison, vérifier que la fonction `afficher_2_faisceaux` est désactivée via un `#`.
- Exécuter la fenêtre. Le programme exécute la fonction `analyser_faisceau_optique`
- le programme affiche les spots à chaque hauteur et l'intensité radiale. Puis, il affiche l'ensemble des intensités sur le même graphique. À la hauteur de la distance focale, la courbe doit être la plus fine et la plus haute. Puis, le programme affiche la représentation 2D colorée de l'intensité. Cette image est enregistrée dans le dossier fourni par la variable *chemin*.
- Pour caractériser des têtes avec deux fibres, il faut utiliser le second ensemble de variables :
 - Associer les valeurs correspondantes aux variables *path2*, *files2*, *Lhfiles2* et *facteurs_acquisition2*.
 - Activer `afficher_2_faisceaux` et désactiver `analyser_faisceau_optique`.
 - Exécuter la fenêtre.
 - Le programme fournit les informations de caractérisation de chaque fibre. Puis, il fournit un graphique commun qui s'enregistre à côté du fichier Python.

Protocole caractérisation de la dose seuil avec lumière collimatée

Protocole n°17 : Protocole caractérisation de la dose seuil avec lumière collimatée

- Préparer les solutions de polymères avec le photo-initiateur.
- Découper des échantillons d'environ 8 mm · 8 mm à partir d'une lamelle de verre (épaisseur 1 mm)
- Insolation sur l'aligneur de masques Suss MA-6 Gen4 (21 mW/cm², 405 nm).
- Verser dans un puits de plaque 96 puits la solution jusqu'au sommet du puits.
- Déposer un substrat de verre pour obturer la moitié du puits.
- Compléter le puits et pousser la lamelle pour qu'elle recouvre totalement le puits, sans bulle d'air.
- Insoler le temps désiré puis sortir la plaque de puits.
- Retirer la lamelle.
- Juger de l'état de polymérisation du cylindre.
- Répéter l'expérience avec la même solution à une nouvelle valeur de temps d'insolation, en fonction de l'analyse de la dose précédente.
- Étudier l'ensemble des solutions pour obtenir un diagramme du seuil de polymérisation en fonction de la quantité en polymère et en photo-initiateur.

Protocole de structuration de surface pour croissance biologique contrainte

Protocole n°18 : Protocole de structuration de surface pour croissance biologique contrainte

- Stérilisation de la plateforme :
 - Filtrer chaque composant des solutions avec des filtres 0.22 μm et les stocker dans des falcons stériles.
 - Préparer les solutions. Pour les solutions de PEGDA classiques : 40% PEGDA, 60% tampon PBS 1x (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 1.8 mM KH₂PO₄), 0.01% LAP, 0.01% nanoparticules. Les solutions ne peuvent pas être filtrées avant l'impression à cause des nanoparticules fluorescentes de 220 nm qu'elles contiennent.
 - Nettoyer avec de l'Anios toutes les surfaces de la plateforme.
 - Faire circuler de l'éthanol à 70% dans l'ensemble des parties microfluidiques (vanne, capteurs, tubes, tête).
 - La lamelle substrat est préalablement traitée avec du MAPTMS (voir protocole n°3, p.175). Nettoyer la grande lame de verre support et la lamelle d'impression avec de l'éthanol 70%.
- Impression :
 - Connecter tous les falcons et purger les tuyaux afin de les remplir avec les solutions de l'impression .
 - Calibrer (voir protocoles dans la partie n°2.4, p.51).
 - Réaliser l'impression.
 - Si besoin, réajuster le niveau de milieu dans le bac d'impression par pipettage direct. Possibilité d'utiliser un tuyau stérile avec un pousse-seringue pour remplir le bac de façon automatique.
- Ensemencement
 - A la fin de l'impression, placer la lamelle supportant l'échantillon dans la boîte de pétri de culture.
 - Sous PSM, développer l'échantillon avec du milieu.
 - Ensemencer avec la suspension cellulaire et mettre en culture

Table des figures

1.1	Schéma des modèles d'études en biologie et évolution des modèles de modèles	11
1.2	Schéma du processus de l'impression 3D générale et plus particulièrement de la bioimpression 3D	14
1.3	Techniques multivoies pour impressions multimatériaux en extrusion	17
1.4	Techniques microfluidiques pour impressions multimatériaux en extrusion	19
1.5	Images d'impressions multimatériaux par jet d'encre, LIFT et techniques hybrides	21
1.6	La polymérisation en flux par illumination d'une section de canal ou par point en polymérisation 2 photons	27
1.7	Techniques d'impression multimatériaux en stéréolithographie par changement manuel ou automatique du bac	28
1.8	Techniques pour impressions multimatériaux en stéréolithographie assistée par microfluidique	30
1.9	Techniques pour impressions hétérogènes en stéréolithographie par procédés photochimiques	31
2.1	Concept ayant inspiré la plateforme 3D-FlowPrint	37
2.2	Concept 3D-FlowPrint et concepts l'ayant inspiré	38
2.3	Schéma de la séquence d'une impression multimatériaux de 5 lignes interdigitées	40
2.4	Schéma du dispositif fluide de la plateforme	42
2.5	Montage optique	45
2.6	Photographies et images CAO de la plateforme 3D-Flowprint	46
2.7	Capture d'écran du logiciel de CAO Fusion 360	48
2.8	Images des étapes successives du vectoriseur développées en Python	49
2.9	Images du logiciel de contrôle expérimental LabVIEW	51
2.10	Image de la lamelle substrat montée sur une lame de microscope	52
3.1	Schéma des objectifs fonctionnels des têtes d'impression	57
3.2	Images MEB des quatre générations de tête d'impression	58
3.3	Schéma d'assemblage et photo de têtes usinées avec silicone moulé	60
3.4	Comparaison du faisceau optique entre la fibre nue et la fibre à travers une tête de première génération	61
3.5	Image de plusieurs générations de têtes mettant en avant les développements successifs	63
3.6	Images CAO des têtes d'impression avec membrane optique en résine	64
3.7	Image du logiciel Nauta de quatre têtes avec piliers de soutien	65
3.8	Images MEB des têtes d'impression avec membrane optique en résine	66
3.9	Rugosité de surface de têtes d'impression imprimées en 3D avec l'imprimante J29+	67
3.10	Images des spots optiques à travers différentes têtes d'impression en développement	68
3.11	Comparaison du faisceau optique entre la fibre nue et la fibre à travers une tête de seconde génération	68
3.12	Schémas et images MEB de l'effet de rugosité sur la membrane optique	69
3.13	Méthode de création et d'assemblage des têtes d'impression	70
3.14	Caractérisation du dôme de PDMS déposé sur les têtes d'impression	71
3.15	Comparaison du faisceau optique entre la fibre nue et la fibre à travers une tête de troisième génération	72
3.16	Images MEB de têtes d'impression usagées avec GelMA accroché au niveau de la zone de photo-polymérisation	74

3.17	Schéma de concepts de stéréolithographie avec interfaces résine-air ou résine-huile évitant tout problème d'adhérence menant au concept d'Air-Assisted Printing.	75
3.18	Images CAO de différents essais de têtes d'impression pour Air-Assisted Printing.	76
3.19	Schéma d'une bulle d'air dans un tube à l'interface avec une interface solide-liquide-gaz	77
3.20	Graphique de la hauteur théorique d'une bulle d'air sous pression dans un canal immergé	78
3.21	Images de la tête d'impression de côté avec la bulle d'air dépassant en fonction de la pression	79
3.22	Caractérisation de la bulle d'air en fonction de la taille de l'ouverture et du traitement de surface de la tête	80
3.23	Comparaison du faisceau optique entre la fibre nue et la fibre à travers une tête de quatrième génération	81
4.1	Images Comsol de la géométrie du modèle	88
4.2	Images Comsol en vue large avec lignes de flux	90
4.3	Cartographie de la solution injectée sous la tête d'impression par simulation Comsol	91
4.4	Images Comsol de la cartographie des vitesses	92
4.5	Graphique Comsol de la vitesse mesurée dans la zone de polymérisation entre le substrat et la tête	93
4.6	Images comsol montrant le confinement ou la perte de la solution injectée dans le milieu et le taux de récupération associé	93
4.7	Représentation de la distribution spatiale des vitesses du fluide V_x sous la tête et la vitesse dans la zone de polymérisation associée	93
4.8	Comparaison entre expériences et simulations	94
4.9	Image Fusion CAO en coupe de la surface de la tête d'impression. Les échelles de chaque structure sont augmentées afin de favoriser la visibilité	96
4.10	Schéma illustrant l'intérêt de l'intégration d'un dôme de PDMS pour compenser les défauts de planéité de la tête et les dommages potentiels causés aux structures imprimées	97
4.11	Optimisation des structures de surface par l'observation du taux de récupération et de la vitesse du fluide	98
4.12	Coupes dans le plan XZ de la concentration en solution injectée avec et sans couronne à la surface de la tête	98
4.13	Étude de l'influence de la viscosité dans un cas simple	101
4.14	Influence de la viscosité du fluide injectée sur la récupération et la vitesse.	102
4.15	Diagrammes de phase du taux récupération et de la vitesse en fonction de la hauteur, de la vitesse de déplacement et du rapport des débits	103
4.16	Quatre coupes XZ issues de Comsol montrant la solution injectée dans le milieu	104
4.17	Confinement lors de déplacements avec une vitesse positive ou négative	105
4.18	Concentration en espèce injectée dans la zone de polymérisation	106
4.19	Étude du temps de replacement des fluides dans la zone de polymérisation	107
5.1	Évolution de la puissance optique mesurée dans la zone d'impression en fonction du rapport cyclique et de la modulation de puissance du laser	113
5.2	Caractérisation du faisceau optique	114
5.3	Impression avec deux fibres pour imprimer en multirésolutions	116
5.4	Illustrations des étapes essentielles du protocole permettant la synthèse du GelMA à partir de gélatine et de sa réticulation par photopolymérisation.	119
5.5	Caractérisation du seuil de polymérisation du PEGDA et du GelMA avec une lumière collimatée	121
5.6	Schéma du piégeage des radicaux libres par le dioxygène	122
5.7	Déplacement du laser sous la forme d'une gaussienne pour photo-réticuler	125
5.8	Étude du seuil de polymérisation du PEGDA avec la plateforme en fonction de la puissance et de la vitesse de déplacement	127
5.9	Étude de la vitesse volumétrique en fonction de la puissance et de la vitesse de déplacement	128
5.10	Impression avec deux fibres optiques	129
5.11	Influence de structures déjà imprimées sur la vitesse de la solution dans la zone de polymérisation	131
5.12	Images d'impressions 2D simples en PEGDA	135

5.13	Images d'impressions 2D complexes en PEGDA	136
5.14	Structures en GelMA	137
5.15	Réseaux de lignes en PEGDA pour contrôle de la hauteur des lignes	138
5.16	Structures 2.5D de PEGDA et caractérisation en Z	139
5.17	Images MEB de structures millimétriques en PEGDA	140
5.18	Objet en PEGDA mimant la structure intestinale	141
5.19	Images d'objets multimatériaux en PEGDA de plusieurs couleurs	142
5.20	Impressions multimatériaux GelMA-PEGDA	144
5.21	Schémas pour l'utilisation ou non du protocole d'injection locale pour l'impression multimatériaux dans des zones creuses	145
6.1	Images de l'évolution de cultures de cellules en environnement contraint par des structures de PEGDA	148
6.2	Images à J3 de la prolifération de cellules en environnement contraint par des structures de PEGDA	150
6.3	Images de culture de sphéroïdes en environnement contraint	151
6.4	Images de tissu de cancer colorectal (Caco2) sur une structure support (<i>scaffold</i>) reproduisant l'intestin en 3D	153
6.5	Plan d'expérience pour caractériser la viabilité du processus de bioimpression	154
6.6	Étude de la viabilité cellulaire de PC3 en contact avec le photo-initiateur LAP ou après insolation	156
6.7	Étude de la viabilité cellulaire de PC3 en contact après insolation avec le photo-initiateur LAP dans sa forme radicalaire	157
6.8	Étude de l'impact du changement du milieu à t=7h sur la viabilité cellulaire de PC3 après insolation de la solution contenant du LAP et les cellules en suspension	158
6.9	Étude de la viabilité cellulaire de PC3 encapsulées dans du GelMA par lumière collimatée	160
6.10	Diagramme de la viabilité de cellules PC3 dans des tubes fluidiques	161
11	Schéma de programmation du vectoriseur développé en interne	170

Liste des tableaux

1.1	Tableau des principaux matériaux de bio-impression	15
1.2	Tableau présentant les résolutions typiques des techniques de bioimpression 3D ^{53,146}	22
3.1	Tableau comparant les générations des têtes d'impression en mettant en évidence les avantages et limitations.	59
4.1	Tableau présentant la viscosité et densité du PEGDA 700 à différentes concentrations dans de l'eau à 20°C. Issu de ²⁴¹	85
4.2	Tableau présentant la viscosité (en mPa.s) du GelMA à différentes températures et concentrations dans de l'eau. Viscosité mesurée avec un cisaillement = 100 s ⁻¹ . ²⁴³	85
6.1	Tableau présentant les doses de polymérisation étudiées pour la viabilité lors de bioimpression	155
6.2	Tableau présentant le pourcentage confluence à 72h, en fonction de l'insolation et de la concentration en LAP.	157
6.3	Tableau présentant le nombre total de cellules et le pourcentage de cellules vivantes lors de la réticulation de solutions de GelMA contenant des cellules en suspension et du LAP	159
4	Tableau de vecteurs de calibration de la dose	179

Abréviations

- 2PP : procédé de photopolymérisation à deux photons, technique 3D
- ChiMA : chitosan méthacrylate, biopolymère de SLA
- ColMA : Collagène méthacrylate, biopolymère de SLA
- DBB : Droplet based bioprinting - Jet d'encre
- DC : duty cycle, rapport cyclique du GBF
- DLP : Digital Light Processing, méthode d'impression photolithographique par projection d'une image planeaire
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium, medium utilisé en culture cellulaire
- EBB : Extrusion based bioprinting - Micro-extrusion
- FWHM : Full Width Half Maximum, Mesure de la largeur d'une gaussienne à la mi-hauteur
- EPA : electrographical powder application, dépôt électrographique de poudre
- GBF : Générateur basse fréquence
- GelMA : Gélatine méthacrylate, biopolymère de SLA
- HAMA : Acide hyaluronique, biopolymère de SLA
- HFC : Hydrodynamic Flow Confinement, confinement microfluidique sous la tête d'impression, mesuré avec les simulations microfluidiques
- LAP : lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate, photoinitiateur
- LIFT : Laser assisted forward transfert, transfert de matériaux par impulsion laser, technique 3D
- MAPTMS : 3-(Triméthoxysilyl)propyl méthacrylate, molécule de traitement de surface sur verre pour adhésion de polymères acrylates
- MEB : Microscope électronique à balayage
- PBF-LB : powder bed fusion - laser beam, fusion de lit de poudre - faisceau laser
- PBS : phosphate-buffered saline, solution tampon phosphate salin
- PDMS : Polydiméthylsiloxane, polymère
- PEG : Polyéthylène glycol, polymère
- PEGDA : Polyéthylène glycol diacrylate, polymère de SLA
- PSM : Poste de sécurité microbiologique
- RPMI : Roswell Park Memorial Institute, medium utilisé en culture cellulaire
- Rr : Retrieval rate, taux de récupération de la solution injectée mesuré dans les simulations microfluidique
- SLA : Stéréolithographie apparatus, technique 3D
- STL : Standard Triangle Language, format de fichier pour des pièces 3D
- SVF : Sérum de veau fœtal, complément de medium pour culture cellulaire
- TMSPPMA : 3-(Triméthoxysilyl)propyl méthacrylate, molécule de traitement de surface sur verre pour adhésion de polymères acrylates
- Z_{gap} : Distance entre le substrat et la tête d'impression dans l'axe Z

Bibliographie

- [1] Les couilles sur la table. Masculin neutre : écriture exclusive, 2022.
- [2] M. Sherry Ku and Wendy Dulin. A biopharmaceutical classification-based Right-First-Time formulation approach to reduce human pharmacokinetic variability and project cycle time from First-In-Human to clinical Proof-Of-Concept. *Pharmaceutical Development and Technology*, 17(3) :285–302, June 2012. Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.3109/10837450.2010.535826>.
- [3] Joseph A. DiMasi and Henry G. Grabowski. The cost of biopharmaceutical R&D : is biotech different? *Managerial and Decision Economics*, 28(4-5) :469–479, 2007. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mde.1360>.
- [4] Michael Hay, David W. Thomas, John L. Craighead, Celia Economides, and Jesse Rosenthal. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nature Biotechnology*, 32(1) :40–51, January 2014. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [5] Steve Morgan, Paul Grootendorst, Joel Lexchin, Colleen Cunningham, and Devon Greyson. The cost of drug development : A systematic review. *Health Policy*, 100(1) :4–17, April 2011.
- [6] Eva-Maria Dehne, Tobias Hasenberg, and Uwe Marx. The ascendance of microphysiological systems to solve the drug testing dilemma. *Future Science OA*, 3(2) :FSO0185, May 2017. Publisher : Future Science.
- [7] Sarah J. Trenfield, Atheer Awad, Alvaro Goyanes, Simon Gaisford, and Abdul W. Basit. 3D Printing Pharmaceuticals : Drug Development to Frontline Care. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(5) :440–451, May 2018. Publisher : Elsevier.
- [8] Weijie Peng, Pallab Datta, Bugra Ayan, Veli Ozbolat, Donna Sosnoski, and Ibrahim T. Ozbolat. 3D bioprinting for drug discovery and development in pharmaceuticals. *Acta Biomaterialia*, 57 :26–46, July 2017.
- [9] Peter F. Thall. A review of phase 2–3 clinical trial designs. *Lifetime Data Analysis*, 14(1) :37–53, March 2008.
- [10] P. F. Thall and S.-J. Lee. Practical model-based dose-finding in phase I clinical trials : Methods based on toxicity. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 13(3), May 2003. Publisher : BMJ Specialist Journals Section : Special Column.
- [11] Daniel G. Hackam and Donald A. Redelmeier. Translation of Research Evidence From Animals to Humans. *JAMA*, 296(14) :1727–1732, October 2006.
- [12] Ida E Holm, Aage Kristian Olsen Alstrup, and Yonglun Luo. Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders. *The Journal of Pathology*, 238(2) :267–287, 2016. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/path.4654>.
- [13] Cameron Shelley. Why test animals to treat humans? On the validity of animal models. *Studies in History and Philosophy of Science Part C : Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 41(3) :292–299, September 2010.
- [14] Claudius Griesinger, Bertrand Desprez, Sandra Coecke, Warren Casey, and Valérie Zuang. Validation of Alternative In Vitro Methods to Animal Testing : Concepts, Challenges, Processes and Tools. In Chantra Eskes and Maurice Whelan, editors, *Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing*, Advances in Experimental Medicine and Biology, pages 65–132. Springer International Publishing, Cham, 2016.
- [15] ANSM. Report by the Temporary Specialist Scientific Committee (TSSC), "FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase)", on the causes of the accident during a Phase 1 clinical trial. In /, volume /. /, 2016.
- [16] Aysha Akhtar. The Flaws and Human Harms of Animal Experimentation. *Cambridge Quarterly of Healthcare Ethics*, 24(4) :407–419, October 2015. Publisher : Cambridge University Press.
- [17] Mariana R. Carvalho, Daniela Lima, Rui L. Reis, Joaquim M. Oliveira, and Vitor M. Correlo. Anti-Cancer Drug Validation : the Contribution of Tissue Engineered Models. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(3) :347–363, June 2017.

- [18] Robin Augustine, Sumama Nuthana Kalva, Rashid Ahmad, Alap Ali Zahid, Shajia Hasan, Ajisha Nayeem, Lana McClements, and Anwarul Hasan. 3D Bioprinted cancer models : Revolutionizing personalized cancer therapy. *Translational Oncology*, 14(4) :101015, April 2021.
- [19] Annapoorni Rangarajan, Sue J. Hong, Annie Gifford, and Robert A. Weinberg. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell*, 6(2) :171–183, August 2004.
- [20] Linda G. Griffith and Melody A. Swartz. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(3) :211–224, March 2006. Number : 3 Publisher : Nature Publishing Group.
- [21] Falguni Pati, Jesper Gantelius, and Helene Andersson Svahn. 3D Bioprinting of Tissue/Organ Models. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(15) :4650–4665, 2016. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/anie.201505062>.
- [22] parlement europeen. Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE, September 2010.
- [23] Armando Salim Munoz-Abraham, Manuel I. Rodriguez-Davalos, Alessandra Bertacco, Brian Wengerter, John P. Geibel, and David C. Mulligan. 3D Printing of Organs for Transplantation : Where Are We and Where Are We Heading ? *Current Transplantation Reports*, 3(1) :93–99, March 2016.
- [24] Tuba Bedir, Songul Ulag, Cem Bulent Ustundag, and Oguzhan Gunduz. 3D bioprinting applications in neural tissue engineering for spinal cord injury repair. *Materials Science and Engineering : C*, 110 :110741, May 2020.
- [25] Mathew Varkey, Dafydd O. Visscher, Paul P. M. van Zuijlen, Anthony Atala, and James J. Yoo. Skin bioprinting : the future of burn wound reconstruction ? *Burns & Trauma*, 7 :s41038–019–0142–7, January 2019.
- [26] Yutaro Ibi and Ryuichi Nishinakamura. Kidney Bioengineering for Transplantation. *Transplantation*, 107(9) :1883, September 2023.
- [27] Pooja Jain, Himanshu Kathuria, and Nileshkumar Dubey. Advances in 3D bioprinting of tissues/organs for regenerative medicine and in-vitro models. *Biomaterials*, 287 :121639, August 2022.
- [28] Amirmasoud Samadi, Ali Moammeri, Mehrab Pourmadadi, Parisa Abbasi, Zeinab Hosseinpour, Arian Farokh, Amin Shamsabadipour, Maryam Heydari, and M. Rezaa Mohammadi. Cell Encapsulation and 3D Bioprinting for Therapeutic Cell Transplantation. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 9(4) :1862–1890, April 2023. Publisher : American Chemical Society.
- [29] Darakhshanda Iram, Rafi a Riaz, Rana Khalid Iqbal, Darakhshanda Iram, Rafi a Riaz, and Rana Khalid Iqbal. 3D Bioprinting : An attractive alternative to traditional organ transplantation. *Biomed Sci Eng*, 5(1) :007–018, July 2019.
- [30] Juan Li, Ling He, Chen Zhou, Yue Zhou, Yanying Bai, Francis Y. Lee, and Jeremy J. Mao. 3D printing for regenerative medicine : From bench to bedside. *MRS Bulletin*, 40(2) :145–154, February 2015. Publisher : Cambridge University Press.
- [31] Chengyang Wang, Zhenyu Tang, Yu Zhao, Rui Yao, Lingsong Li, and Wei Sun. Three-dimensional in vitro cancer models : a short review. *Biofabrication*, 6(2) :022001, April 2014. Publisher : IOP Publishing.
- [32] Stephanie Knowlton, Sevgi Onal, Chu Hsiang Yu, Jean J. Zhao, and Savas Tasoglu. Bioprinting for cancer research. *Trends in Biotechnology*, 33(9) :504–513, September 2015. Publisher : Elsevier.
- [33] Haonan Wang, Huaqing Yu, Xia Zhou, Jilong Zhang, Hongrui Zhou, Haitong Hao, Lina Ding, Huiying Li, Yanru Gu, Junchi Ma, Jianfeng Qiu, and Depeng Ma. An Overview of Extracellular Matrix-Based Bioinks for 3D Bioprinting. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 2022.
- [34] Zhong Min Che, Tae Heob Jung, Jung Hee Choi, Do Jun Yoon, Hyun Jeong Jeong, Eun Ju Lee, and Jin Kim. Collagen-based co-culture for invasive study on cancer cells-fibroblasts interaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(1) :268–275, July 2006.
- [35] Praveen V. Balimane and Saeho Chong. Cell culture-based models for intestinal permeability : A critique. *Drug Discovery Today*, 10(5) :335–343, March 2005.
- [36] A. Amini, S. Masoumi Moghaddam, D. L. Morris, and M. H. Pourgholami. The Critical Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Tumor Angiogenesis. *Current Cancer Drug Targets*, 12(1) :23–43, January 2012.
- [37] Gianluca Palmara, Francesca Frascella, Ignazio Roppolo, Annalisa Chiappone, and Alessandro Chiadò. Functional 3D printing : Approaches and bioapplications. *Biosensors and Bioelectronics*, 175 :112849, March 2021.
- [38] Yanshen Yang, Yuanbo Jia, Qingzhen Yang, and Feng Xu. Engineering bio-inks for 3D bioprinting cell mechanical microenvironment. *International Journal of Bioprinting*, 9(1) :632, October 2022.

- [39] Ankita Sachdev, Sourya Acharya, Tejas Gadodia, Samarth Shukla, Harshita J, Chinmay Akre, Mansi Khare, and Shreyash Huse. A Review on Techniques and Biomaterials Used in 3D Bioprinting. *Cureus*, 14(8) :e28463, 2022.
- [40] P. Selcan Gungor-Ozkerim, Ilyas Inci, Yu Shrike Zhang, Ali Khademhosseini, and Mehmet Remzi Dokmeci. Bioprinting for 3D bioprinting : an overview. *Biomaterials Science*, 6(5) :915–946, 2018. Publisher : Royal Society of Chemistry.
- [41] Earnest P. Chen, Zeren Toksoy, Bruce A. Davis, and John P. Geibel. 3D Bioprinting of Vascularized Tissues for in vitro and in vivo Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 2021.
- [42] Zengmin Xia, Sha Jin, and Kaiming Ye. Tissue and Organ 3D Bioprinting. *SLAS TECHNOLOGY : Translating Life Sciences Innovation*, 23(4) :301–314, August 2018. Publisher : SAGE Publications Inc.
- [43] Pranabesh Sasmal, Pallab Datta, Yang Wu, and Ibrahim T. Ozbolat. 3D bioprinting for modelling vasculature. *Microphysiological systems*, 2 :9, November 2018.
- [44] Karel Domansky, Walker Inman, James Serdy, Ajit Dash, Matthew H. M. Lim, and Linda G. Griffith. Perfused multiwell plate for 3D liver tissue engineering. *Lab on a Chip*, 10(1) :51–58, 2010. Publisher : Royal Society of Chemistry.
- [45] Nishat Tasnim, Laura De la Vega, Shweta Anil Kumar, Laila Abelseth, Matthew Alonzo, Meitham Amereh, Binata Joddar, and Stephanie M. Willerth. 3D Bioprinting Stem Cell Derived Tissues. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 11(4) :219–240, August 2018.
- [46] Chin Siang Ong, Pooja Yesantharao, Chen Yu Huang, Gunnar Mattson, Joseph Boktor, Takuma Fukunishi, Huaitao Zhang, and Narutoshi Hibino. 3D bioprinting using stem cells. *Pediatric Research*, 83(1) :223–231, January 2018. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [47] Matthew Alonzo, Shweta AnilKumar, Brian Roman, Nishat Tasnim, and Binata Joddar. 3D Bioprinting of cardiac tissue and cardiac stem cell therapy. *Translational Research*, 211 :64–83, September 2019.
- [48] Xin Su, Ting Wang, and Shu Guo. Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field. *Regenerative Therapy*, 16 :63–72, March 2021.
- [49] Daiki Murata, Kenichi Arai, and Koichi Nakayama. Scaffold-Free Bio-3D Printing Using Spheroids as “Bio-Inks” for Tissue (Re-)Construction and Drug Response Tests. *Advanced Healthcare Materials*, 9(15) :1901831, 2020. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adhm.201901831>.
- [50] Vladimir Mironov, Richard P. Visconti, Vladimir Kasyanov, Gabor Forgacs, Christopher J. Drake, and Roger R. Markwald. Organ printing : Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, 30(12) :2164–2174, April 2009.
- [51] Pei Zhuang, Yi-Hua Chiang, Maria Serafim Fernanda, and Mei He. Using Spheroids as Building Blocks Towards 3D Bioprinting of Tumor Microenvironment. *International Journal of Bioprinting*, 7(4) :444, October 2021.
- [52] Justine Creff, Rémi Courson, Thomas Mangeat, Julie Foncy, Sandrine Souleille, C. Thibault, Arnaud Besson, and Laurent Malaquin. Fabrication of 3D scaffolds reproducing intestinal epithelium topography by high-resolution 3D stereolithography. *Biomaterials*, 221 :119404, November 2019.
- [53] Sean V. Murphy and Anthony Atala. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology* 2014 32 :8, 32(8) :773–785, August 2014. Publisher : Nature Publishing Group.
- [54] Núria Torras, María García-Díaz, Vanesa Fernández-Majada, and Elena Martínez. Mimicking Epithelial Tissues in Three-Dimensional Cell Culture Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6 :197, 2018.
- [55] Cuidi Li and Wenguo Cui. 3D bioprinting of cell-laden constructs for regenerative medicine. *Engineered Regeneration*, 2 :195–205, January 2021.
- [56] Mohd Javaid and Abid Haleem. 3D bioprinting applications for the printing of skin : A brief study. *Sensors International*, 2 :100123, January 2021.
- [57] Anketa Jandyal, Ikshita Chaturvedi, Ishika Wazir, Ankush Raina, and Mir Irfan Ul Haq. 3D printing – A review of processes, materials and applications in industry 4.0. *Sustainable Operations and Computers*, 3 :33–42, January 2022.
- [58] S. Vanaei, M. S. Parizi, S. Vanaei, F. Saleemizadehparizi, and H. R. Vanaei. An Overview on Materials and Techniques in 3D Bioprinting Toward Biomedical Application. *Engineered Regeneration*, 2 :1–18, January 2021.
- [59] Hongli Mao, Li Yang, Haofang Zhu, Lihuang Wu, Peihong Ji, Jiquan Yang, and Zhongwei Gu. Recent advances and challenges in materials for 3D bioprinting. *Progress in Natural Science : Materials International*, 30(5) :618–634, October 2020.

- [60] Qi Ge, Zhiqin Li, Zhaolong Wang, Kavin Kowsari, Wang Zhang, Xiangnan He, Jianlin Zhou, and Nicholas X. Fang. Projection micro stereolithography based 3D printing and its applications. *International Journal of Extreme Manufacturing*, 2(2) :022004, June 2020. Publisher : IOP Publishing.
- [61] Martin Regehly, Yves Garmshausen, Marcus Reuter, Niklas F. König, Eric Israel, Damien P. Kelly, Chun-Yu Chou, Klaas Koch, Baraa Asfari, and Stefan Hecht. Xolography for linear volumetric 3D printing. *Nature*, 588(7839) :620–624, December 2020. Number : 7839 Publisher : Nature Publishing Group.
- [62] Maxim Shusteff, Allison E. M. Browar, Brett E. Kelly, Johannes Henriksson, Todd H. Weisgraber, Robert M. Panas, Nicholas X. Fang, and Christopher M. Spadaccini. One-step volumetric additive manufacturing of complex polymer structures. *Science Advances*, 3(12) :eaao5496, December 2017. Publisher : American Association for the Advancement of Science.
- [63] Pero Raos, Ivica Klapan, and Tomislav Galeta. Additive Manufacturing of Medical Models—Applications in Rhinology. *Collegium antropologicum*, 39 :667–673, September 2015.
- [64] Tainara de P. L. Lima, Caio Augusto d A. Canelas, Viktor O. C. Concha, Fernando A. M. da Costa, and Marcele F. Passos. 3D Bioprinting Technology and Hydrogels Used in the Process. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(4) :214, December 2022. Number : 4 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [65] Alexandru Pirjan and Dana-Mihaela Petroşanu. The Impact Of 3d Printing Technology On The Society And Economy. *Journal of Information Systems & Operations Management*, 7(2) :360–370, 2013. Publisher : Romanian-American University.
- [66] Susan C Shelmerdine, Ian C Simcock, John Ciaran Hutchinson, Rosalind Aughwane, Andrew Melbourne, Daniil I Nikitichev, Ju-ling Ong, Alessandro Borghi, Garrard Cole, Emilia Kingham, Alistair D Calder, Claudio Capelli, Aadam Akhtar, Andrew C Cook, Silvia Schievano, Anna David, Sebastian Ourselin, Neil J Sebire, and Owen J Arthurs. 3D printing from microfocus computed tomography (micro-CT) in human specimens : education and future implications. *The British Journal of Radiology*, 91(1088) :20180306, July 2018. Publisher : The British Institute of Radiology.
- [67] Richard Eglén and Terry Reisine. Primary Cells and Stem Cells in Drug Discovery : Emerging Tools for High-Throughput Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 9(2) :108–124, April 2011. Publisher : Mary Ann Liebert, Inc., publishers.
- [68] Nikita Voloshin, Pyotr Tyurin-Kuzmin, Maxim Karagyaur, Zhanna Akopyan, and Konstantin Kulebyakin. Practical Use of Immortalized Cells in Medicine : Current Advances and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16) :12716, January 2023. Number : 16 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [69] Pallab Datta, Madhuri Dey, Zaman Ataie, Derya Unutmaz, and Ibrahim T. Ozbolat. 3D bioprinting for reconstituting the cancer microenvironment. *npj Precision Oncology*, 4(1) :1–13, July 2020. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [70] S. Smith, M. Maclean, S. J. MacGregor, J. G. Anderson, and M. H. Grant. Exposure of 3T3 mouse Fibroblasts and Collagen to High Intensity Blue Light. In Chwee Teck Lim and James C. H. Goh, editors, *13th International Conference on Biomedical Engineering*, IFMBE Proceedings, pages 1352–1355, Berlin, Heidelberg, 2009. Springer.
- [71] U P Andley, R M Lewis, J R Reddan, and I E Kochevar. Action spectrum for cytotoxicity in the UVA- and UVB-wavelength region in cultured lens epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35(2) :367–373, February 1994.
- [72] M. Klak, M. Gomółka, T. Dobrzański, G. Tymicki, P. Cywoniuk, P. Kowalska, K. Kosowska, T. Bryniarski, A. Berman, A. Dobrzyń, J. Idaszek, W. Świążkowski, and M. Wszola. Irradiation with 365 nm and 405 nm wavelength shows differences in DNA damage of swine pancreatic islets. *PLOS ONE*, 15(6) :e0235052, June 2020. Publisher : Public Library of Science.
- [73] Estibaliz Gómez-de Mariscal, Mario Del Rosario, Joanna W. Pylvänäinen, Guillaume Jacquemet, and Ricardo Henriques. Harnessing Artificial Intelligence To Reduce Phototoxicity in Live Imaging. ., August 2023. arXiv :2308.04387 [q-bio].
- [74] L. B. Leverett, J. D. Hellums, C. P. Alfrey, and E. C. Lynch. Red Blood Cell Damage by Shear Stress. *Biophysical Journal*, 12(3) :257–273, March 1972. Publisher : Elsevier.
- [75] S P Sutera. Flow-induced trauma to blood cells. *Circulation Research*, 41(1) :2–8, July 1977. Publisher : American Heart Association.
- [76] M Tol, Ar Akar, S Durdu, E Ayyildiz, and O Ilhan. Comparison of different needle diameters and flow rates on bone marrow mononuclear stem cell viability : an ex vivo experimental study. *Cytotherapy*, 10(1) :98–99, January 2008. Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/14653240701762356>.

- [77] Peter A. Walker, Fernando Jimenez, Michael H. Gerber, Kevin R. Aroom, Shinil K. Shah, Matthew T. Harting, Brijesh S. Gill, Sean I. Savitz, and Charles S. Cox. Effect of Needle Diameter and Flow Rate on Rat and Human Mesenchymal Stromal Cell Characterization and Viability. *Tissue Engineering Part C : Methods*, 16(5) :989–997, October 2010. Publisher : Mary Ann Liebert, Inc., publishers.
- [78] Lucas Lemarié, Aravind Anandan, Emma Petiot, Christophe Marquette, and Edwin-Joffrey Courtial. Rheology, simulation and data analysis toward bioprinting cell viability awareness. *Bioprinting*, 21 :e00119, March 2021.
- [79] He-Qi Xu, Jia-Chen Liu, Zheng-Yi Zhang, and Chang-Xue Xu. A review on cell damage, viability, and functionality during 3D bioprinting. *Military Medical Research*, 9(1) :70, December 2022.
- [80] Chaoran Dou, Victoria Perez, Jie Qu, Andrew Tsin, Ben Xu, and Jianzhi Li. A State-of-the-Art Review of Laser-Assisted Bioprinting and its Future Research Trends. *ChemBioEng Reviews*, 8(5) :517–534, 2021. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cben.202000037>.
- [81] Benjamin D. Fairbanks, Michael P. Schwartz, Christopher N. Bowman, and Kristi S. Anseth. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate : polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials*, 30(35) :6702–6707, December 2009.
- [82] Stephanie J. Bryant, Charles R. Nuttelman, and Kristi S. Anseth. Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, January 2000. Publisher : Taylor & Francis Group.
- [83] James P. Kehrer. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(1) :21–48, January 1993. Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.3109/10408449309104073>.
- [84] Alexander K. Nguyen, Peter L. Goering, Vytas Reipa, and Roger J. Narayan. Toxicity and photosensitizing assessment of gelatin methacryloyl-based hydrogels photoinitiated with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate in human primary renal proximal tubule epithelial cells. *Biointerphases*, 14(2) :021007, May 2019.
- [85] Ali Malekpour and Xiongbiao Chen. Printability and Cell Viability in Extrusion-Based Bioprinting from Experimental, Computational, and Machine Learning Views. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(2) :40, June 2022. Number : 2 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [86] Scott A. Irvine and Subbu S. Venkatraman. Bioprinting and Differentiation of Stem Cells. *Molecules*, 21(9) :1188, September 2016. Number : 9 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [87] Roghayeh Khoeni, Hamed Nosrati, Abolfazl Akbarzadeh, Aziz Eftekhari, Taras Kavetsky, Rovshan Khalilov, Elham Ahmadian, Aygun Nasibova, Pallab Datta, Leila Roshangar, Dante C. Deluca, Soodabeh Davaran, Magali Cucchiari, and Ibrahim T. Ozbolat. Natural and Synthetic Bioinks for 3D Bioprinting. *Advanced NanoBiomed Research*, 1(8) :2000097, 2021. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/anbr.202000097>.
- [88] Ilze Donderwinkel, Jan C. M. van Hest, and Neil R. Cameron. Bio-inks for 3D bioprinting : recent advances and future prospects. *Polymer Chemistry*, 8(31) :4451–4471, August 2017. Publisher : The Royal Society of Chemistry.
- [89] Elizabeth A. Aisenbrey and William L. Murphy. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nature Reviews Materials*, 5(7) :539–551, July 2020. Number : 7 Publisher : Nature Publishing Group.
- [90] Deepak Choudhury, Shivesh Anand, and May Win Naing. The arrival of commercial bioprinters – Towards 3D bioprinting revolution! *International Journal of Bioprinting*, 4(2) :139, June 2018.
- [91] Ibrahim T. Ozbolat and Monika Hospodiuk. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*, 76 :321–343, January 2016.
- [92] Liqun Ning and Xiongbiao Chen. A brief review of extrusion-based tissue scaffold bio-printing. *Biotechnology Journal*, 12(8) :1600671–1600671, August 2017. Publisher : John Wiley & Sons, Ltd.
- [93] Amit Panwar and Lay Poh Tan. Current Status of Bioinks for Micro-Extrusion-Based 3D Bioprinting. *Molecules*, 21(6) :685, June 2016. Number : 6 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [94] Edidiong Nseowo Udofia and Wenchao Zhou. Microextrusion Based 3D Printing – A Review. In -, volume -. University of Texas at Austin, 2018. Accepted : 2021-11-15T21 :45 :57Z.
- [95] Katja Hölzl, Shengmao Lin, Liesbeth Tytgat, Sandra Van Vlierberghe, Linxia Gu, and Aleksandr Ovsianikov. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication*, 8(3) :032002, September 2016.
- [96] Srikanthan Ramesh, Ola L. A. Harrysson, Prahalada K. Rao, Ali Tamayol, Denis R. Cormier, Yunbo Zhang, and Iris V. Rivero. Extrusion bioprinting : Recent progress, challenges, and future opportunities. *Bioprinting*, 21 :e00116, March 2021.

- [97] Naomi Paxton, Willi Smolan, Thomas Böck, Ferry Melchels, Jürgen Groll, and Tomasz Jungst. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication*, 9(4) :044107, November 2017. Publisher : IOP Publishing.
- [98] Eva Mueller, Fei Xu, and Todd Hoare. FRESH Bioprinting of Dynamic Hydrazone-Cross-Linked Synthetic Hydrogels. *Biomacromolecules*, page acs.biomac.2c01046, October 2022.
- [99] Jonathan A. Brassard, Mike Nikolaev, Tania Hübscher, Moritz Hofer, and Matthias P. Lutolf. Recapitulating macro-scale tissue self-organization through organoid bioprinting. *Nature Materials*, 20(1) :22–29, January 2021. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [100] Hussein Abdelhay Essayed Kaoud. *Tissue Regeneration*. BoD – Books on Demand, June 2018. Google Books-ID : NXaQDwAAQBAJ.
- [101] David B. Kolesky, Ryan L. Truby, A. Sydney Gladman, Travis A. Busbee, Kimberly A. Homan, and Jennifer A. Lewis. 3D Bioprinting of Vascularized, Heterogeneous Cell-Laden Tissue Constructs. *Advanced Materials*, 26(19) :3124–3130, 2014. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adma.201305506>.
- [102] Hyun-Wook Kang, Sang Jin Lee, In Kap Ko, Carlos Kengla, James J. Yoo, and Anthony Atala. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nature Biotechnology*, 34(3) :312–319, March 2016. Number : 3 Publisher : Nature Publishing Group.
- [103] Wanjun Liu, Yu Shrike Zhang, Marcel A. Heinrich, Fabio De Ferrari, Hae Lin Jang, Syeda Mahwish Bakht, Mario Moisés Alvarez, Jingzhou Yang, Yi-Chen Li, Grissel Trujillo-de Santiago, Amir K. Miri, Kai Zhu, Parastoo Khoshakhlagh, Gyan Prakash, Hao Cheng, Xiaofei Guan, Zhe Zhong, Jie Ju, Geyunjian Harry Zhu, Xiangyu Jin, Su Ryon Shin, Mehmet Remzi Dokmeci, and Ali Khademhosseini. Rapid Continuous Multimaterial Extrusion Bioprinting. *Advanced Materials*, 29(3) :1604630, 2017. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adma.201604630>.
- [104] Jaehoo Lee, Kyu Eon Kim, Sumi Bang, Insup Noh, and Chibum Lee. A desktop multi-material 3D bioprinting system with open-source hardware and software. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 18(4) :605–612, April 2017.
- [105] Freddie Hong, Steve Hodges, Connor Myant, and David E Boyle. Open5x : Accessible 5-axis 3D printing and conformal slicing. In *Extended Abstracts of the 2022 CHI Conference on Human Factors in Computing Systems*, CHI EA '22, pages 1–6, New York, NY, USA, April 2022. Association for Computing Machinery.
- [106] Marco Rocca, Alessio Fragasso, Wanjun Liu, Marcel A. Heinrich, and Yu Shrike Zhang. Embedded Multimaterial Extrusion Bioprinting. *SLAS Technology*, 23(2) :154–163, April 2018.
- [107] Tiffany Cameron, Emad Naseri, Ben MacCallum, and Ali Ahmadi. Development of a Disposable Single-Nozzle Printhead for 3D Bioprinting of Continuous Multi-Material Constructs. *Micromachines*, 11(5) :459, May 2020. Number : 5 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [108] Ziqi Gao, Jun Yin, Peng Liu, Qi Li, Runan Zhang, Huayong Yang, and Hongzhao Zhou. Simultaneous multi-material embedded printing for 3D heterogeneous structures. *International Journal of Extreme Manufacturing*, 5(3) :035001, May 2023. Publisher : IOP Publishing.
- [109] Natalie M. Larson, Jochen Mueller, Alex Chortos, Zoey S. Davidson, David R. Clarke, and Jennifer A. Lewis. Rotational multimaterial printing of filaments with subvoxel control. *Nature*, pages 1–7, January 2023. Publisher : Nature Publishing Group.
- [110] Wenfu Zheng and Xingyu Jiang. Synthesizing Living Tissues with Microfluidics. *Accounts of Chemical Research*, 51(12) :3166–3173, December 2018. Publisher : American Chemical Society.
- [111] Zifei Yan, Jiaxin Tian, Chencan Du, Jian Deng, and Guangsheng Luo. Reaction kinetics determination based on microfluidic technology. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 41 :49–72, January 2022.
- [112] Alice Massimiani, Filippo Panini, Simone Luigi Marasso, Matteo Cocuzza, Marzia Quaglio, Candido Fabrizio Pirri, Francesca Verga, and Dario Viberti. 2D Microfluidic Devices for Pore-Scale Phenomena Investigation : A Review. *Water*, 15(6) :1222, January 2023. Number : 6 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [113] Josué Sznitman. Revisiting Airflow and Aerosol Transport Phenomena in the Deep Lungs with Microfluidics. *Chemical Reviews*, 122(7) :7182–7204, April 2022. Publisher : American Chemical Society.
- [114] google ngram. microfluidic trend Ngram, 2023.
- [115] Sarah Battat, David A. Weitz, and George M Whitesides. An outlook on microfluidics : the promise and the challenge. *Lab on a Chip*, 22(3) :530–536, 2022. Publisher : Royal Society of Chemistry.
- [116] Kaimin Wu, Xuliang He, Jinglei Wang, Ting Pan, Ran He, Feizhi Kong, Zhenmin Cao, Feiye Ju, Zhao Huang, and Libo Nie. Recent progress of microfluidic chips in immunoassay. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 2022.

- [117] Ludovic Serex, Arnaud Bertsch, and Philippe Renaud. Microfluidics : A New Layer of Control for Extrusion-Based 3D Printing. *Micromachines*, 9(2) :86, February 2018.
- [118] Fan Feng, Jiankang He, Jiabin Li, Mao Mao, and Dichen Li. Multicomponent bioprinting of heterogeneous hydrogel constructs based on microfluidic printheads. *International Journal of Bioprinting*, 5(2) :202, July 2019.
- [119] Mark A. Skylar-Scott, Jochen Mueller, Claas W. Visser, and Jennifer A. Lewis. Voxelated soft matter via multimaterial multinozzle 3D printing. *Nature* 2019 575 :7782, 575(7782) :330–335, November 2019. Publisher : Nature Publishing Group.
- [120] Martina Marcotulli, Maria Celeste Tirelli, Marina Volpi, Jakub Jaroszewicz, Chiara Scognamiglio, Piotr Kasprzycki, Karol Karnowski, Wojciech Świąszkowski, Giancarlo Ruocco, Marco Costantini, Gianluca Cidonio, and Andrea Barbetta. Microfluidic 3D Printing of Emulsion Ink for Engineering Porous Functionally Graded Materials. *Advanced Materials Technologies*, n/a(n/a) :2201244, December 2022. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/admt.202201244>.
- [121] Duilia N. du Chatinier, Kianti P. Figler, Prajwal Agrawal, Wanjun Liu, and Yu Shrike Zhang. The potential of microfluidics-enhanced extrusion bioprinting. *Biomicrofluidics*, 15(4) :041304, July 2021. Publisher : American Institute of Physics.
- [122] S. T. Beyer, A. Bsoul, A. Ahmadi, and K. Walus. 3D alginate constructs for tissue engineering printed using a coaxial flow focusing microfluidic device. In *2013 Transducers & Eurosensors XXVII : The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXVII)*, pages 1206–1209, June 2013. ISSN : 2164-1641.
- [123] Marco Costantini, Stefano Testa, Pamela Mozetic, Andrea Barbetta, Claudia Fuoco, Ersilia Fornetti, Francesco Tamiro, Sergio Bernardini, Jakub Jaroszewicz, Wojciech Świąszkowski, Marcella Trombetta, Luisa Castagnoli, Dror Seliktar, Piotr Garstecki, Gianni Cesareni, Stefano Cannata, Alberto Rainer, and Cesare Gargioli. Microfluidic-enhanced 3D bioprinting of aligned myoblast-laden hydrogels leads to functionally organized myofibers in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 131 :98–110, July 2017.
- [124] Joanna Idaszek, Marco Costantini, Tommy A. Karlsen, Jakub Jaroszewicz, Cristina Colosi, Stefano Testa, Ersilia Fornetti, Sergio Bernardini, Martyna Seta, Kaja Kasarełło, Robert Wrzesień, Stefano Cannata, Andrea Barbetta, Cesare Gargioli, Jan E. Brinchman, and Wojciech Świąszkowski. 3D bioprinting of hydrogel constructs with cell and material gradients for the regeneration of full-thickness chondral defect using a microfluidic printing head. *Biofabrication*, 11(4) :044101, July 2019. Publisher : IOP Publishing.
- [125] Xiying Li, Jia Ming Zhang, Xin Yi, Zhongyi Huang, Pengyu Lv, and Huiling Duan. Multimaterial Microfluidic 3D Printing of Textured Composites with Liquid Inclusions. *Advanced Science*, 6(3) :1800730, 2019. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/advs.201800730>.
- [126] Deng-ke Zhao, He-qi Xu, Jun Yin, and Hua-yong Yang. Inkjet 3D bioprinting for tissue engineering and pharmaceuticals. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A*, 23(12) :955–973, December 2022.
- [127] Xinda Li, Boxun Liu, Ben Pei, Jianwei Chen, Dezhi Zhou, Jiayi Peng, Xinzhi Zhang, Wang Jia, and Tao Xu. Inkjet Bioprinting of Biomaterials. *Chemical Reviews*, 120(19) :10793–10833, October 2020. Publisher : American Chemical Society.
- [128] Rémi Courson, Oleksii Bratash, Ali Maziz, Cloé Desmet, Ricardo Alvarado Meza, Loïc Leroy, Elodie Engel, Arnaud Buhot, Laurent Malaquin, and Thierry Leiché. Rapid prototyping of a polymer MEMS droplet dispenser by laser-assisted 3D printing. *Microsystems & Nanoengineering*, 9(1) :1–11, July 2023. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [129] Yang Guo, Huseini S. Patanwala, Brice Bognet, and Anson W.K. Ma. Inkjet and inkjet-based 3D printing : connecting fluid properties and printing performance. *Rapid Prototyping Journal*, 23(3) :562–576, January 2017. Publisher : Emerald Publishing Limited.
- [130] Sina Azizi Machekposhti, Saeid Movahed, and Roger J. Narayan. Physicochemical parameters that underlie inkjet printing for medical applications. *Biophysics Reviews*, 1(1) :011301, November 2020.
- [131] Janarthanan Gopinathan and Insup Noh. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomaterials Research*, 22(1) :11, April 2018.
- [132] Daniele Foresti, Katharina T. Kroll, Robert Amis, Francesco Sillani, Kimberly A. Homan, Dimos Poulikakos, and Jennifer A. Lewis. Acoustophoretic printing. *Science Advances*, 4(8) :eaat1659, August 2018. Publisher : American Association for the Advancement of Science.
- [133] Pengfei Zhang, Congying Liu, Cyrus Modavi, Adam Abate, and Huawei Chen. Printhead on a chip : empowering droplet-based bioprinting with microfluidics. *Trends in Biotechnology*, 0(0), September 2023. Publisher : Elsevier.
- [134] Stephan Förster, Jürgen Groll, Benjamin Reineke, Stephan Hauschild, Ilona Paulus, Jonas Hazur, Madita Vollmer, Gültekin Tamgüney, and Aldo Boccacini. On-Chip Fabrication and In-Flow 3D-Printing of Cell-Laden Microgel Constructs : From Chip to Scaffold Materials in One Integral Process, May 2021.

- [135] Vladimir Mironov, Thomas Boland, Thomas Trusk, Gabor Forgacs, and Roger R. Markwald. Organ printing : computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 21(4) :157–161, April 2003.
- [136] Shinji Sakai, Kohei Ueda, Enkhtuul Gantumur, Masahito Taya, and Makoto Nakamura. Drop-On-Drop Multimaterial 3D Bioprinting Realized by Peroxidase-Mediated Cross-Linking. *Macromolecular Rapid Communications*, 39(3) :1700534, 2018. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/marc.201700534>.
- [137] Lothar Koch, Andrea Deiwick, Sabrina Schlie, Stefanie Michael, Martin Gruene, Vincent Coger, Daniela Zychlinski, Axel Schambach, Kerstin Reimers, Peter M. Vogt, and Boris Chichkov. Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(7) :1855–1863, 2012. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bit.24455>.
- [138] Sebastian-Paul Kopp, Vadim Medvedev, Katja Tangermann-Gerk, Natalie Wöltinger, Richard Rothfelder, Fabian Graß, Markus R. Heinrich, Patricija Januskaite, Alvaro Goyanes, Abdul W. Basit, Stephan Roth, and Michael Schmidt. Electrophotographic 3D printing of pharmaceutical films. *Additive Manufacturing*, 73 :103707, July 2023.
- [139] Raisa E. Jones, Wei Zheng, John C. McKew, and Catherine Z. Chen. An Alternative Direct Compound Dispensing Method Using the HP D300 Digital Dispenser. *Journal of Laboratory Automation*, 18(5) :367–374, October 2013. Publisher : SAGE Publications Inc.
- [140] Raphaël Devillard, Emeline Pagès, Manuela Medina Correa, Virginie Kériquel, Murielle Rémy, Jérôme Kalisky, Muhammad Ali, Bertrand Guillotin, and Fabien Guillemot. Cell Patterning by Laser-Assisted Bioprinting. In Matthieu Piel and Manuel Théry, editors, *Methods in Cell Biology*, volume 119 of *Micro patterning in Cell Biology Part A*, pages 159–174. Academic Press, January 2014.
- [141] A. A. Antoshin, S. N. Churbanov, N. V. Minaev, Deying Zhang, Yuanyuan Zhang, A. I. Shpichka, and P. S. Timashev. LIFT-bioprinting, is it worth it? *Bioprinting*, 15 :e00052, September 2019.
- [142] Bertrand Guillotin, Agnès Souquet, Sylvain Catros, Martí Duocastella, Benjamin Pippenger, Séverine Bellance, Reine Bareille, Murielle Rémy, Laurence Bordenave, Joëlle Amédée, and Fabien Guillemot. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials*, 31(28) :7250–7256, October 2010.
- [143] B. R. Ringeisen, S. E. Lizewski, L. A. Fitzgerald, J. C. Biffinger, C. L. Knight, W. J. Crookes-Goodson, and P. K. Wu. Single Cell Isolation of Bacteria from Microbial Fuel Cells and Potomac River Sediment. *Electroanalysis*, 22(7-8) :875–882, 2010. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/elan.200880012>.
- [144] Adrija Ghosh, Jonathan Tersur Orasugh, Suprakas Sinha Ray, and Dipankar Chattopadhyay. Integration of 3D Printing–Co-electrospinning : Concept Shifting in Biomedical Applications. *ACS Omega*, July 2023. Publisher : American Chemical Society.
- [145] Maryam Rahmati, David K. Mills, Aleksandra M. Urbanska, Mohammad Reza Saeb, Jayarama Reddy Venugopal, Seeram Ramakrishna, and Masoud Mozafari. Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*, 117 :100721, April 2021.
- [146] Tommaso Zandrini, Sammy Florczak, Riccardo Levato, and Aleksandr Ovsianikov. Breaking the resolution limits of 3D bioprinting : future opportunities and present challenges. *Trends in Biotechnology*, December 2022.
- [147] Jason Paul Mazzoccoli. Properties of Poly(ethylene glycol) Diacrylate Blends and Acoustically Focused Multilayered Biocomposites Developed for Tissue Engineering Applications. -, 2008.
- [148] Thiago O. Machado, Claudia Sayer, and Pedro H. H. Araujo. Thiol-ene polymerisation : A promising technique to obtain novel biomaterials. *European Polymer Journal*, 86 :200–215, January 2017.
- [149] R. O. Allen and P. Sanderson. Characterization of Epoxy Glues with FTIR. *Applied Spectroscopy Reviews*, 24(3-4) :175–187, September 1988. Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1080/05704928808060457>.
- [150] Zongjie Wang, Raafa Abdulla, Benjamin Parker, Roya Samanipour, Sanjoy Ghosh, and Keeyoung Kim. A simple and high-resolution stereolithography-based 3D bioprinting system using visible light crosslinkable bioinks. *Biofabrication*, 7(4) :045009, December 2015. Publisher : IOP Publishing.
- [151] T. Scherzer. Photopolymerization of acrylates without photoinitiators with short-wavelength UV radiation : A study with real-time fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, 42(4) :894–901, 2004.
- [152] Kazuko Shimada and Setsuro Matsushita. Thermal coagulation of egg albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(2) :409–412, March 1980. Publisher : American Chemical Society.
- [153] Hitendra Kumar and Keeyoung Kim. Stereolithography 3D Bioprinting. *Methods in Molecular Biology*, 2140 :93–108, 2020. Publisher : Humana Press Inc.

- [154] Wanlu Li, Mian Wang, Huiling Ma, Fabiola A. Chapa-Villarreal, Anderson Oliveira Lobo, and Yu Shrike Zhang. Stereolithography apparatus and digital light processing-based 3D bioprinting for tissue fabrication. *iScience*, 26(2) :106039, February 2023.
- [155] Charles W. Hull. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography, March 1986.
- [156] Li-Hsin Han, Gazell Mapili, Shaochen Chen, and Krishnendu Roy. Projection Microfabrication of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, 130(021005), March 2008.
- [157] Yanfeng Lu, Satya Nymisha Mantha, Douglas C. Crowder, Sofia Chinchilla, Kush N. Shah, Yang H. Yun, Ryan B. Wicker, and Jae-Won Choi. Microstereolithography and characterization of poly(propylene fumarate)-based drug-loaded microneedle arrays. *Biofabrication*, 7(4) :045001, September 2015. Publisher : IOP Publishing.
- [158] Wei Lin, Wei Lin, Dihan Chen, and Shih-Chi Chen. Emerging micro-additive manufacturing technologies enabled by novel optical methods. *Photonics Research*, Vol. 8, Issue 12, pp. 1827-1842, 8(12) :1827–1842, December 2020. Publisher : Optica Publishing Group.
- [159] Zizhuo Zheng, David Eglin, Mauro Alini, Geoff R. Richards, Ling Qin, and Yuxiao Lai. Visible Light-Induced 3D Bioprinting Technologies and Corresponding Bioink Materials for Tissue Engineering : A Review. *Engineering*, 7(7) :966–978, July 2021.
- [160] Pei Zhuang, Wei Long Ng, Jia An, Chee Kai Chua, and Lay Poh Tan. Layer-by-layer ultraviolet assisted extrusion-based (UAE) bioprinting of hydrogel constructs with high aspect ratio for soft tissue engineering applications. *PLOS ONE*, 14(6) :e0216776, June 2019. Publisher : Public Library of Science.
- [161] Lingling Wei, Cheng Yang, and Wanhua Wu. Recent advances of stereolithographic 3D printing enabled by photon upconversion technology. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 43 :100851, October 2023.
- [162] Dmitry M. Zuev, Alexander K. Nguyen, Valery I. Putlyaev, and Roger J. Narayan. 3D printing and bioprinting using multiphoton lithography. *Bioprinting*, 20 :e00090, December 2020.
- [163] J. D. Bhawalkar, G. S. He, and P. N. Prasad. Nonlinear multiphoton processes in organic and polymeric materials. *Reports on Progress in Physics*, 59(9) :1041, September 1996.
- [164] Aleksandr Ovsianikov, Andrea Deiwick, Sandra Van Vlierberghe, Michael Pflaum, Mathias Wilhelmi, Peter Dubruel, and Boris Chichkov. Laser Fabrication of 3D Gelatin Scaffolds for the Generation of Bioartificial Tissues. *Materials*, 4(1) :288–299, January 2011. Number : 1 Publisher : Molecular Diversity Preservation International.
- [165] Gregor Weisgrab, Olivier Guillaume, Zhengchao Guo, Patrick Heimel, Paul Slezak, André Poot, Dirk Grijpma, and Aleksandr Ovsianikov. 3D Printing of large-scale and highly porous biodegradable tissue engineering scaffolds from poly(trimethylene-carbonate) using two-photon-polymerization. *Biofabrication*, 12(4) :045036, September 2020. Publisher : IOP Publishing.
- [166] Linas Jonušauskas, Titas Tičkūnas, Andrius Narmontas, Gedvinas Nemickas, Vytautas Purlys, Giedrė Grigalevičiūtė, and Roaldas Gadonas. Femtosecond laser-assisted etching : making arbitrary shaped 3D glass micro-structures. In *Laser-based Micro- and Nanoprocessing XII*, volume 10520, pages 227–234. SPIE, February 2018.
- [167] Puskal Kunwar, Zheng Xiong, Yin Zhu, Haiyan Li, Alex Filip, and Pranav Soman. Hybrid Laser Printing of 3D, Multiscale, Multimaterial Hydrogel Structures. *Advanced Optical Materials*, 7(21) :1900656, 2019. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adom.201900656>.
- [168] John R. Tumbleston, David Shirvanyants, Nikita Ermoshkin, Rima Janusziewicz, Ashley R. Johnson, David Kelly, Kai Chen, Robert Pinschmidt, Jason P. Rolland, Alexander Ermoshkin, Edward T. Samulski, and Joseph M. DeSimone. Continuous liquid interface production of 3D objects. *Science*, 347(6228) :1349–1352, March 2015.
- [169] David A. Walker, James L. Hedrick, and Chad A. Mirkin. Rapid, large-volume, thermally controlled 3D printing using a mobile liquid interface. *Science*, 366(6463) :360–364, October 2019. Publisher : American Association for the Advancement of Science.
- [170] Gabriel Lipkowitz, Tim Samuelsen, Kaiwen Hsiao, Brian Lee, Maria T. Dulay, Ian Coates, Harrison Lin, William Pan, Geoffrey Toth, Lee Tate, Eric S. G. Shaqfeh, and Joseph M. DeSimone. Injection continuous liquid interface production of 3D objects. *Science Advances*, 8(39) :eabq3917, September 2022. Publisher : American Association for the Advancement of Science.
- [171] Chun Cao, Yiwei Qiu, Lingling Guan, Zhen Wei, Zhenyao Yang, Lanxin Zhan, Dazhao Zhu, Chenliang Ding, Xiaoming Shen, Xianmeng Xia, Cui Fang Kuang, and Xu Liu. Dip-In Photoresist for Photoinhibited Two-Photon Lithography to Realize High-Precision Direct Laser Writing on Wafer. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(27) :31332–31342, July 2022. Publisher : American Chemical Society.

- [172] Lucas Stüwe, Matthias Geiger, Franz Röllgen, Thorben Heinze, Marcus Reuter, Matthias Wessling, Stefan Hecht, and John Linkhorst. Continuous Volumetric 3D Printing : Xolography in Flow. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, page e2306716, August 2023.
- [173] Sunandita Sarker, Adira Colton, Ziteng Wen, Xin Xu, Metecan Erdi, Anthony Jones, Peter Kofinas, Eleonora Tubaldi, Piotr Walczak, Mirosław Janowski, Yajie Liang, and Ryan D. Sochol. 3D-Printed Microinjection Needle Arrays via a Hybrid DLP-Direct Laser Writing Strategy. *Advanced Materials Technologies*, n/a(n/a) :2201641, 2023. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/admt.202201641>.
- [174] Dhananjay Dendukuri, Kim Tsoi, T. Alan Hatton, and Patrick S. Doyle. Controlled Synthesis of Nonspherical Microparticles Using Microfluidics. *Langmuir*, 21(6) :2113–2116, March 2005. Publisher : American Chemical Society.
- [175] Simona C. Laza, Marco Polo, Antonio A. R. Neves, Roberto Cingolani, Andrea Camposeo, and Dario Pisignano. Two-Photon Continuous Flow Lithography. *Advanced Materials*, 24(10) :1304–1308, March 2012.
- [176] Dhananjay Dendukuri, Daniel C. Pregibon, Jesse Collins, T. Alan Hatton, and Patrick S. Doyle. Continuous-flow lithography for high-throughput microparticle synthesis. *Nature Materials*, 5(5) :365–369, May 2006. Number : 5 Publisher : Nature Publishing Group.
- [177] Chaoyu Yang, Yunru Yu, Yuanjin Zhao, and Luoran Shang. Bioinspired Jellyfish Microparticles from Microfluidics. *Research*, 6 :0034, January 2023. Publisher : American Association for the Advancement of Science.
- [178] Wui Siew Tan, Christina L. Lewis, Nicholas E. Horelik, Daniel C. Pregibon, Patrick S. Doyle, and Hyunmin Yi. Hierarchical Assembly of Viral Nanotemplates with Encoded Microparticles via Nucleic Acid Hybridization. *Langmuir*, 24(21) :12483–12488, November 2008. Publisher : American Chemical Society.
- [179] Mehmet Akif Sahin, Helen Werner, Shreya Udani, Dino Di Carlo, and Ghulam Destgeer. Flow lithography for structured microparticles : fundamentals, methods and applications. *Lab on a Chip*, 22(21) :4007–4042, 2022. Publisher : Royal Society of Chemistry.
- [180] Karina Arcaute, Brenda Mann, and Ryan Wicker. Stereolithography of spatially controlled multi-material bioactive poly(ethylene glycol) scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 6(3) :1047–1054, March 2010.
- [181] Xuanyi Ma, Xin Qu, Wei Zhu, Yi-Shuan Li, Suli Yuan, Hong Zhang, Justin Liu, Pengrui Wang, Cheuk Sun Edwin Lai, Fabian Zanella, Gen-Sheng Feng, Farah Sheikh, Shu Chien, and Shaochen Chen. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8) :2206–2211, February 2016. Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences.
- [182] Wei Zhu, Xin Qu, Jie Zhu, Xuanyi Ma, Sherrina Patel, Justin Liu, Pengrui Wang, Cheuk Sun Edwin Lai, Maling Gou, Yang Xu, Kang Zhang, and Shaochen Chen. Direct 3D bioprinting of prevascularized tissue constructs with complex microarchitecture. *Biomaterials*, 124 :106–115, April 2017.
- [183] Yong Tae Kim, Kurt Castro, Nirveek Bhattacharjee, and Albert Folch. Digital Manufacturing of Selective Porous Barriers in Microchannels Using Multi-Material Stereolithography. *Micromachines*, 9(3) :125, March 2018. Number : 3 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [184] Yong Tae Kim, Alireza Ahmadianyazdi, and Albert Folch. A ‘print–pause–print’ protocol for 3D printing microfluidics using multimaterial stereolithography. *Nature Protocols*, pages 1–17, January 2023. Publisher : Nature Publishing Group.
- [185] Zhuo-Chen Ma, Yong-Lai Zhang, Bing Han, Xin-Yu Hu, Chun-He Li, Qi-Dai Chen, and Hong-Bo Sun. Femtosecond laser programmed artificial musculoskeletal systems. *Nature Communications*, 11(1) :4536, September 2020. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [186] Muhammed Hisham, Ahmed E. Salih, and Haider Butt. 3D Printing of Multimaterial Contact Lenses. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 9(7) :4381–4391, July 2023. Publisher : American Chemical Society.
- [187] Bagrat Grigoryan, Daniel W Sazer, Amanda Avila, Jacob L Albritton, Aparna Padhye, Anderson H Ta, Paul T Greenfield, Don L Gibbons, and Jordan S Miller. Development, characterization, and applications of multi-material stereolithography bioprinting. *Scientific Reports* /, 11 :3171–3171, 123.
- [188] Franziska Klein, Benjamin Richter, Thomas Striebel, Clemens M. Franz, Georg von Freymann, Martin Wegener, and Martin Bastmeyer. Two-Component Polymer Scaffolds for Controlled Three-Dimensional Cell Culture. *Advanced Materials*, 23(11) :1341–1345, 2011. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adma.201004060>.
- [189] Asim Inamdar, Marco Magana, Frank Medina, Yinko Grajeda, and Ryan Wicker. Development of an Automated Multiple Material Stereolithography Machine. In ., ., 2006. Accepted : 2020-03-05T19 :33 :55Z.

- [190] Jae-Won Choi, Eric MacDonald, and Ryan Wicker. Multi-material microstereolithography. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 49(5) :543–551, July 2010.
- [191] Jae-Won Choi, Ho-Chan Kim, and Ryan Wicker. Multi-material stereolithography. *Journal of Materials Processing Technology*, 211(3) :318–328, March 2011.
- [192] Ryan B. Wicker and Eric W. MacDonald. Multi-material, multi-technology stereolithography. *Virtual and Physical Prototyping*, 7(3) :181–194, September 2012. Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1080/17452759.2012.721119>.
- [193] Qi Ge, Amir Hosein Sakhaei, Howon Lee, Conner K. Dunn, Nicholas X. Fang, and Martin L. Dunn. Multimaterial 4D Printing with Tailorable Shape Memory Polymers. *Scientific Reports*, 6(1) :31110, August 2016. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [194] Qiming Wang, Julie A. Jackson, Qi Ge, Jonathan B. Hopkins, Christopher M. Spadaccini, and Nicholas X. Fang. Lightweight Mechanical Metamaterials with Tunable Negative Thermal Expansion. *Physical Review Letters*, 117(17) :175901–175901, October 2016. Publisher : American Physical Society.
- [195] Bilal Khatri, Marco Frey, Ahmed Raouf-Fahmy, Marc-Vincent Scharla, and Thomas Hanemann. Development of a Multi-Material Stereolithography 3D Printing Device. *Micromachines*, 11(5) :532, May 2020. Number : 5 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [196] Chi Zhou, Yong Chen, Zhigang Yang, and Behrokh Khoshnevis. Development of a Multi-Material Mask-Image-Projection-Based Stereolithography for the Fabrication of Digital Materials. In *University of Texas at Austin*, Univeristy of Texas libraries. University of Texas at Austin, 2011. Accepted : 2021-10-04T20 :26 :44Z.
- [197] Chi Zhou, Yong Chen, Zhigang Yang, and Behrokh Khoshnevis. Digital material fabrication using mask-image-projection-based stereolithography. *Rapid Prototyping Journal*, 19(3) :153–165, January 2013. Publisher : Emerald Group Publishing Limited.
- [198] Christopher-Denny Matte, Michael Pearson, Felix Trottier-Cournoyer, Andrew Dafoe, and Tsz Ho Kwok. Automated storage and active cleaning for multi-material digital-light-processing printer. *Rapid Prototyping Journal*, 25(5) :864–874, January 2019. Publisher : Emerald Publishing Limited.
- [199] Zhenpeng Xu, Chan Soo Ha, Ruthvik Kadam, John Lindahl, Seokpum Kim, H. Felix Wu, Vlastimil Kunc, and Xiaoyu Zheng. Additive manufacturing of two-phase lightweight, stiff and high damping carbon fiber reinforced polymer microlattices. *Additive Manufacturing*, 32 :101106, March 2020.
- [200] Ceramic 3D printer : CeraFab Multi, May 2022.
- [201] Anant Bhusal, Elvan Dogan, Hai-Anh Nguyen, Olga Labutina, Daniel Nieto, Ali Khademhosseini, and Amir K. Miri. Multi-material digital light processing bioprinting of hydrogel-based microfluidic chips. *Biofabrication*, 14(1), November 2021.
- [202] Kavin Kowsari, Saeed Akbari, Dong Wang, Nicholas X. Fang, and Qi Ge. High-Efficiency High-Resolution Multimaterial Fabrication for Digital Light Processing-Based Three-Dimensional Printing. *3D Printing and Additive Manufacturing*, 5(3) :185–193, September 2018. Publisher : Mary Ann Liebert, Inc., publishers.
- [203] Jianxiang Cheng, Rong Wang, Zechu Sun, Qingjiang Liu, Xiangnan He, Honggeng Li, Haitao Ye, Xingxin Yang, Xinfeng Wei, Zhenqing Li, Bingcong Jian, Weiwei Deng, and Qi Ge. Centrifugal multimaterial 3D printing of multifunctional heterogeneous objects. *Nature Communications*, 13(1) :7931, December 2022. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [204] Da Chen and Xiaoyu Zheng. Multi-material Additive Manufacturing of Metamaterials with Giant, Tailorable Negative Poisson’s Ratios. *Scientific Reports*, 8(1) :9139, June 2018. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [205] Amir K. Miri, Daniel Nieto, Luis Iglesias, Hossein Goodarzi Hosseinabadi, Sushila Maharjan, Guillermo U. Ruiz-Esparza, Parastoo Khoshakhlagh, Amir Manbachi, Mehmet Remzi Dokmeci, Shaochen Chen, Su Ryon Shin, Yu Shrike Zhang, and Ali Khademhosseini. Microfluidics-Enabled Multimaterial Maskless Stereolithographic Bioprinting. *Advanced Materials*, 30(27) :1800242, 2018. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adma.201800242>.
- [206] Daehoon Han, Chen Yang, Nicholas X. Fang, and Howon Lee. Rapid multi-material 3D printing with projection micro-stereolithography using dynamic fluidic control. *Additive Manufacturing*, 27 :606–615, May 2019. Publisher : Elsevier B.V.
- [207] Andrew C. Lamont, Michael A. Restaino, Matthew J. Kim, and Ryan D. Sochol. A facile multi-material direct laser writing strategy. *Lab on a Chip*, 19(14) :2340–2345, 2019. Publisher : Royal Society of Chemistry.
- [208] Frederik Mayer, Stefan Richter, Johann Westhauser, Eva Blasco, Christopher Barner-Kowollik, and Martin Wegener. Multimaterial 3D laser microprinting using an integrated microfluidic system. *Science Advances*, 5(2), February 2019. Publisher : American Association for the Advancement of Science.

- [209] Mian Wang, Wanlu Li, Luis S. Mille, Terry Ching, Zeyu Luo, Guosheng Tang, Carlos Ezio Garciamendez, Ami Leshia, Michinao Hashimoto, and Yu Shrike Zhang. Digital Light Processing Based Bioprinting with Composable Gradients. *Advanced Materials*, 34(1) :2107038, 2022. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adma.202107038>.
- [210] heteromerge. heteromerge site, June 2023.
- [211] J. J. Schwartz and A. J. Boydston. Multimaterial actinic spatial control 3D and 4D printing. *Nature Communications*, 10(1) :791, February 2019. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [212] Zeang Zhao, Jiangtao Wu, Xiaoming Mu, Haosen Chen, H. Jerry Qi, and Daining Fang. Origami by frontal photopolymerization. *Science Advances*, 3(4), April 2017. Publisher : American Association for the Advancement of Science.
- [213] Siham Telitel, Jason C. Morris, Yohann Guillaneuf, Jean Louis Clément, Fabrice Morlet-Savary, Arnaud Spangenberg, Jean Pierre Malval, Jacques Lalevéé, Didier Gignes, and Olivier Soppera. Laser Direct Writing of Arbitrary Complex Polymer Microstructures by Nitroxide-Mediated Photopolymerization. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(27) :30779–30786, July 2020. Publisher : American Chemical Society.
- [214] Xirui Peng, Xiao Kuang, Devin J. Roach, Yaoqing Wang, Craig M. Hamel, Chunliang Lu, and H. Jerry Qi. Integrating digital light processing with direct ink writing for hybrid 3D printing of functional structures and devices. *Additive Manufacturing*, 40 :101911, April 2021.
- [215] Kaijuan Chen, Lei Zhang, Xiao Kuang, Vincent Li, Ming Lei, Guozheng Kang, Zhong Lin Wang, and Hang Jerry Qi. Dynamic Photomask-Assisted Direct Ink Writing Multimaterial for Multilevel Triboelectric Nanogenerator. *Advanced Functional Materials*, 29(33) :1903568, 2019. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adfm.201903568>.
- [216] Amin GhavamiNejad, Nureddin Ashammakhi, Xiao Yu Wu, and Ali Khademhosseini. Crosslinking Strategies for 3D Bioprinting of Polymeric Hydrogels. *Small*, 16(35) :2002931, 2020. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/smll.202002931>.
- [217] Gregory I. Peterson, Johanna J. Schwartz, Di Zhang, Benjamin M. Weiss, Mark A. Ganter, Duane W. Storti, and Andrew J. Boydston. Production of Materials with Spatially-Controlled Cross-Link Density via Vat Photopolymerization. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(42) :29037–29043, October 2016. Publisher : American Chemical Society.
- [218] Benjamin D. Fairbanks, Laura J. Macdougall, Sudheendran Mavila, Jasmine Sinha, Bruce E. Kirkpatrick, Kristi S. Anseth, and Christopher N. Bowman. Photoclick Chemistry : A Bright Idea. *Chemical Reviews*, 121(12) :6915–6990, June 2021. Publisher : American Chemical Society.
- [219] A. Muguruza, J. Bonada Bo, A. Gómez, J. Minguella-Canela, J. Fernandes, F. Ramos, E. Xuriguera, A. Varea, and A. Cirera. Development of a multi-material additive manufacturing process for electronic devices. *Procedia Manufacturing*, 13 :746–753, January 2017.
- [220] Arndt Hohnholz, Kotaro Obata, Daniel Albrecht, Jürgen Koch, Gerrit Hohenhoff, Oliver Suttman, Stefan Kaielerle, and Ludger Overmeyer. Multimaterial bathless stereolithography using aerosol jet printing and UV laser based polymerization. *Journal of Laser Applications*, 31(2) :022301, April 2019.
- [221] Devin J. Roach, Craig M. Hamel, Conner K. Dunn, Marshall V. Johnson, Xiao Kuang, and H. Jerry Qi. The m4 3D printer : A multi-material multi-method additive manufacturing platform for future 3D printed structures. *Additive Manufacturing*, 29 :100819, October 2019.
- [222] Laurent Malaquin, Jean Louis Viovy, Sandrine Assie-Souleille, Xavier Dollat, and Victor Fournie. Tête d'impression d'une imprimante, imprimante et procédé d'impression, June 2020.
- [223] Victor Fournié, Bastien Venzac, Emmanuelle Trevisiol, Julie Foncy, Julien Roul, Sandrine Assie-Souleille, Mélanie Escudero, Pierre Joseph, Arnaud Reitz, and Laurent Malaquin. A microfluidics-assisted photopolymerization method for high-resolution multimaterial 3D printing. *Additive Manufacturing*, page 103629, May 2023.
- [224] Ahasan Habib and Bashir Khoda. Rheological analysis of bio-ink for 3D bio-printing processes. *Journal of Manufacturing Processes*, 76 :708–718, April 2022.
- [225] Lourens Blok, Marco Longana, Hana Yu, and Benjamin Woods. An investigation into 3D printing of fibre reinforced thermoplastic composites. *Additive Manufacturing*, 22, May 2018.
- [226] David Juncker, Mohammad Qasaimeh, Anne Mckinney, and Art Hur Queval. Multipurpose microfluidic probe. *Nature Materials*, 2005.
- [227] Mohammad A. Qasaimeh, Thomas Gervais, and David Juncker. Microfluidic quadrupole and floating concentration gradient. *Nature Communications* 2011 2 :1, 2(1) :1–8, September 2011. Publisher : Nature Publishing Group.

- [228] David Juncker, Herbert Schmid, and Emmanuel Delamarche. PROGRAMMING OF CAPILLARY EFFECTS FOR LIQUID CONFINEMENT AND AUTOMATIC FLOW CONTROL IN MICROFLUIDIC PROBES. -, January 2010.
- [229] Mohammad Qasaimeh, Sébastien G. Ricoult, and David Juncker. Microfluidic probes for use in life sciences and medicine. *Lab on a Chip*, 13(1) :40–50, 2013. Publisher : Royal Society of Chemistry.
- [230] Arthur Queval, Nageswara R. Ghattamaneni, Cécile M. Perrault, Raminder Gill, Maryam Mirzaei, R. Anne McKinney, and David Juncker. Chamber and microfluidic probe for microperfusion of organotypic brain slices. *Lab on a Chip*, 10(3) :326–334, February 2010. Publisher : The Royal Society of Chemistry.
- [231] Ayoola Brimmo, Pierre-Alexandre Goyette, Roaa Alnemari, Thomas Gervais, and Mohammad A. Qasaimeh. 3D Printed Microfluidic Probes. *Scientific Reports*, 8(1) :10995, July 2018. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [232] A. A. Kim, K. Kustanovich, D. Baratian, A. Ainla, M. Shaali, G. D. M. Jeffries, and A. Jesorka. SU-8 free-standing microfluidic probes. *Biomicrofluidics*, 11(1) :014112, January 2017. Publisher : American Institute of Physics.
- [233] Samuel Sofela, Alla Saleh, and Mohammad Qasaimeh. Integrated Microfluidic Probe for Single Cell Manipulation *. *2022 International Conference on Manipulation, Automation and Robotics at Small Scales (MARSS)*, pages 1–5, July 2022. Publisher : IEEE.
- [234] code specialist. 7 Python Easter Eggs, 2023.
- [235] Jenni Koskela. Light-induced biomaterial microfabrication for advanced cell culturing – a comparative study. *Tempere University*, 2010. Accepted : 2010-06-08T06 :52 :24Z.
- [236] MultiFAB.
- [237] Kan Yue, Grissel Trujillo-de Santiago, Mario Moisés Alvarez, Ali Tamayol, Nasim Annabi, and Ali Khademhosseini. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*, 73 :254–271, December 2015.
- [238] Zhikang Li, Shiming Zhang, Yihang Chen, Haonan Ling, Libo Zhao, Guoxi Luo, Xiaochen Wang, Martin C. Hartel, Hao Liu, Yumeng Xue, Reihaneh Haghniaz, KangJu Lee, Wujin Sun, HanJun Kim, Junmin Lee, Yichao Zhao, Yepin Zhao, Sam Emaminejad, Samad Ahadian, Nureddin Ashammakhi, Mehmet R. Dokmeci, Zhuangde Jiang, and Ali Khademhosseini. Gelatin Methacryloyl-Based Tactile Sensors for Medical Wearables. *Advanced Functional Materials*, 30(49) :2003601, 2020. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adfm.202003601>.
- [239] femtika. Laser Nanofactory, 2023.
- [240] Poly(ethylene glycol) diacrylate average Mn 700 | 26570-48-9.
- [241] Jelena M. Vuksanović, Mirjana Lj Kijevčanin, and Ivona R. Radović. Poly(ethylene glycol) diacrylate as a novel chaotropic compound for design of aqueous biphasic systems. *Journal of Molecular Liquids*, 261 :250–264, July 2018. Publisher : Elsevier.
- [242] Jun Yin, Mengling Yan, Yancheng Wang, Jianzhong Fu, and Hairui Suo. 3D Bioprinting of Low-Concentration Cell-Laden Gelatin Methacrylate (GelMA) Bioinks with a Two-Step Cross-linking Strategy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(8) :6849–6857, February 2018. Publisher : American Chemical Society.
- [243] Khurshid Alam, Muhammad Iqbal, Anwarul Hasan, and Nasra Al-Maskari. Rheological characterization of biological hydrogels in aqueous state. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 7(3) :171–175, July 2020.
- [244] Ashlyn T. Young, Olivia C. White, and Michael A. Daniele. Rheological Properties of Coordinated Physical Gelation and Chemical Crosslinking in Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels. *Macromolecular Bioscience*, 20(12) :2000183, 2020. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mabi.202000183>.
- [245] Hitomi Shirahama, Bae Hoon Lee, Lay Poh Tan, and Nam-Joon Cho. Precise Tuning of Facile One-Pot Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesis. *Scientific Reports*, 6(1) :31036, August 2016. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [246] Georges Gabriel Stokes. On the Theories of the Internal Friction of Fluids in Motion, and of the Equilibrium and Motion of Elastic Solids. *Transaction of the cambridge philosophical society*, pages 287–305, April 1845.
- [247] Osborne Reynolds. III. An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. *Proceedings of the Royal Society of London*, 35(224-226) :84–99, January 1883. Publisher : Royal Society.

- [248] N Rott. Note on the History of the Reynolds Number. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 22(1) :1–12, 1990. __eprint : <https://doi.org/10.1146/annurev.fl.22.010190.000245>.
- [249] Adolf Fick. Ueber Diffusion. *Annalen der Physik*, 170(1) :59–86, 1855. __eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/andp.18551700105>.
- [250] Arturo Urrios Garcia, Cesar Parra-Cabrera, Nirveek Bhattacharjee, Alan M. Gonzalez-Suarez, Luis G. Rigat-Brugarolas, Umashree Nallapatti, Josep Samitier, Cole A. DeForest, Francesc Posas Garriga, José L. Garcia-Cordero, and Albert Folch. 3D-printing of transparent bio-microfluidic devices in PEG-DA. *Lab on chip*, 2016. Accepted : 2018-12-05T08 :33 :13Z Publisher : Royal Society of Chemistry.
- [251] Xiao-Hua Qin, Aleksandr Ovsianikov, Jürgen Stampfl, and Robert Liska. Additive manufacturing of photosensitive hydrogels for tissue engineering applications. *BioNanoMaterials*, 15(3-4) :49–70, December 2014. Publisher : De Gruyter.
- [252] Thomas Billiet, Mieke Vandenhoute, Jorg Schelfhout, Sandra Van Vlierberghe, and Peter Dubruel. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials*, 33(26) :6020–6041, September 2012.
- [253] Zehao Chen, Zhendong Lv, Zhen Zhang, Yuhui Zhang, and Wenguo Cui. Biomaterials for microfluidic technology. *Materials Futures*, 1(1) :012401, January 2022. Publisher : IOP Publishing.
- [254] Lorenzo Moroni, Jason A. Burdick, Christopher Highley, Sang Jin Lee, Yuya Morimoto, Shoji Takeuchi, and James J. Yoo. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nature Reviews Materials*, 3(5) :21–37, May 2018. Number : 5 Publisher : Nature Publishing Group.
- [255] Pedro Gonzalez-Tello, Fernando Camacho, and Gabriel Blazquez. Density and Viscosity of Concentrated Aqueous Solutions of Polyethylene Glycol. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 39(3) :611–614, July 1994. Publisher : American Chemical Society.
- [256] Mengxiang Zhu, Yingying Wang, Gaia Ferracci, Jing Zheng, Nam-Joon Cho, and Bae Hoon Lee. Gelatin methacryloyl and its hydrogels with an exceptional degree of controllability and batch-to-batch consistency. *Scientific Reports*, 9(1) :6863, May 2019. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [257] Shining Xiao, Tengfei Zhao, Jingkai Wang, Chenggui Wang, Jiangnan Du, Liwei Ying, Jiangtao Lin, Caihua Zhang, Wanglu Hu, Linlin Wang, and Kan Xu. Gelatin Methacrylate (GelMA)-Based Hydrogels for Cell Transplantation : an Effective Strategy for Tissue Engineering. *Stem Cell Reviews and Reports*, 15(5) :664–679, October 2019.
- [258] Taotao Liu, Wenxian Weng, Yuzhuo Zhang, Xiaoting Sun, and Huazhe Yang. Applications of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels in Microfluidic Technique-Assisted Tissue Engineering. *Molecules*, 25(22) :5305, January 2020. Number : 22 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [259] Xintang Zhan. Effect of matrix stiffness and adhesion ligand density on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(3) :675–683, March 2020. Publisher : John Wiley & Sons, Ltd.
- [260] Francisco Drusso Martinez-Garcia, Tony Fischer, Alexander Hayn, Claudia Tanja Mierke, Janette Kay Burgess, and Martin Conrad Harmsen. A Beginner’s Guide to the Characterization of Hydrogel Microarchitecture for Cellular Applications. *Gels*, 8(9) :535, September 2022. Number : 9 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [261] Hitendra Kumar, Kabilan Sakthivel, Mohamed G. A. Mohamed, Emilie Boras, Su Ryon Shin, and Kee-kyoung Kim. Designing Gelatin Methacryloyl (GelMA)-Based Biopinks for Visible Light Stereolithographic 3D Biofabrication. *Macromolecular Bioscience*, 21(1) :2000317, January 2021. Publisher : John Wiley & Sons, Ltd.
- [262] Stephanie Nemir, Heather N. Hayenga, and Jennifer L. West. PEGDA hydrogels with patterned elasticity : Novel tools for the study of cell response to substrate rigidity. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(3) :636–644, 2010. __eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bit.22574>.
- [263] Nehar Celikkin, Simone Mastrogiacomo, Jakub Jaroszewicz, X. Frank Walboomers, and Wojciech Swieszkowski. Gelatin methacrylate scaffold for bone tissue engineering : The influence of polymer concentration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(1) :201–209, 2018. __eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.a.36226>.
- [264] Samuel Clark Ligon, Robert Liska, Jürgen Stampfl, Matthias Gurr, and Rolf Mülhaupt. Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing. *Chemical Reviews*, 117(15) :10212–10290, August 2017. Publisher : American Chemical Society.
- [265] Kamil Elkhoury, Julio Zuazola, and Sanjairaj Vijayavenkataraman. Bioprinting the future using light : A review on photocrosslinking reactions, photoreactive groups, and photoinitiators. *SLAS Technology*, 28(3) :142–151, June 2023.
- [266] Junli Hu, Yaping Hou, Hyejin Park, Bogyu Choi, Siying Hou, Amy Chung, and Min Lee. Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 8(5) :1730–1738, May 2012.

- [267] J. Jakubiak, X. Allonas, J. P. Fouassier, A. Sionkowska, E. Andrzejewska, L. Å. Linden, and J. F. Rabek. Camphorquinone–amines photoinitiating systems for the initiation of free radical polymerization. *Polymer*, 44(18) :5219–5226, August 2003.
- [268] Elbadawy A. Kamoun, Andreas Winkel, Michael Eisenburger, and Henning Menzel. Carboxylated camphorquinone as visible-light photoinitiator for biomedical application : Synthesis, characterization, and application. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(5) :745–754, September 2016.
- [269] Han Shih and Chien-Chi Lin. Visible-Light-Mediated Thiol-Ene Hydrogelation Using Eosin-Y as the Only Photoinitiator. *Macromolecular Rapid Communications*, 34(3) :269–273, 2013. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/marc.201200605>.
- [270] Tetsuro Mazaki, Yasuyuki Shiozaki, Kentaro Yamane, Aki Yoshida, Mariko Nakamura, Yasuhiro Yoshida, Di Zhou, Takashi Kitajima, Masato Tanaka, Yoshihiro Ito, Toshifumi Ozaki, and Akihiro Matsukawa. A novel, visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin scaffold for osteochondral tissue engineering. *Scientific Reports*, 4(1) :4457, March 2014. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [271] Khoon S Lim, Benjamin S Schon, Naveen V Mekhileri, Gabriella C J Brown, Catherine M Chia, Sujay Prabakar, Gary J Hooper, and Tim B F Woodfield. New Visible-Light Photoinitiating System for Improved Print Fidelity in Gelatin-Based Bioinks. *ACS*, 2016.
- [272] Evgenia Korzhikova-Vlakh, Mariia Antipchik, and Tatiana Tennikova. Macroporous Polymer Monoliths in Thin Layer Format. *Polymers*, 13 :1059, March 2021.
- [273] Christian Decker and Aubrey D. Jenkins. Kinetic approach of oxygen inhibition in ultraviolet- and laser-induced polymerizations. *Macromolecules*, 18(6) :1241–1244, June 1985. Publisher : American Chemical Society.
- [274] Dhananjay Dendukuri, Priyadarshi Panda, Ramin Haghgooei, Ju Min Kim, T. Alan Hatton, and Patrick S. Doyle. Modeling of Oxygen-Inhibited Free Radical Photopolymerization in a PDMS Microfluidic Device. *Macromolecules*, 41(22) :8547–8556, November 2008. Publisher : American Chemical Society.
- [275] Giovanni Bovone, Oksana Y. Dudaryeva, Bruno Marco-Dufort, and Mark W. Tibbitt. Engineering Hydrogel Adhesion for Biomedical Applications via Chemical Design of the Junction. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(9) :4048–4076, September 2021. Publisher : American Chemical Society.
- [276] Hyunwoo Yuk, Teng Zhang, German Alberto Parada, Xinyue Liu, and Xuanhe Zhao. Skin-inspired hydrogel–elastomer hybrids with robust interfaces and functional microstructures. *Nature Communications*, 7(1) :12028, June 2016. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [277] Joã T Cabral, Steven D Hudson, Christopher Harrison, and Jack F Douglas. Frontal Photopolymerization for Microfluidic Applications. *Langmuir*, 2004.
- [278] Neil D. Dolinski, Zachariah A. Page, E. Benjamin Callaway, Fabian Eisenreich, Ronnie V. Garcia, Roberto Chavez, David P. Bothman, Stefan Hecht, Frank W. Zok, and Craig J. Hawker. Solution Mask Liquid Lithography (SMaLL) for One-Step, Multimaterial 3D Printing. *Advanced Materials*, 30(31) :1800364, 2018. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adma.201800364>.
- [279] Théophile Pelras, Sarah Glass, Tom Scherzer, Christian Elsner, Agnes Schulze, and Bernd Abel. Transparent Low Molecular Weight Poly(Ethylene Glycol) Diacrylate-Based Hydrogels as Film Media for Photoswitchable Drugs. *Polymers 2017, Vol. 9, Page 639*, 9(12) :639–639, November 2017. Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [280] Ronald A. J. Litjens, Terence I. Quickenden, and Colin G. Freeman. Visible and near-ultraviolet absorption spectrum of liquid water. *Applied Optics*, 38(7) :1216–1223, March 1999. Publisher : Optica Publishing Group.
- [281] Fan Yang, Christopher G. Williams, Dong-an Wang, Hyukjin Lee, Paul N. Manson, and Jennifer Elisseff. The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 26(30) :5991–5998, October 2005.
- [282] Yan-Wen Ding, Xu-Wei Zhang, Chen-Hui Mi, Xin-Ya Qi, Jing Zhou, and Dai-Xu Wei. Recent advances in hyaluronic acid-based hydrogels for 3D bioprinting in tissue engineering applications. *Smart Materials in Medicine*, 4 :59–68, January 2023.
- [283] William T. Brinkman, Karthik Nagapudi, Benjamin S. Thomas, and Elliot L. Chaikof. Photo-Cross-Linking of Type I Collagen Gels in the Presence of Smooth Muscle Cells :Mechanical Properties, Cell Viability, and Function. *Biomacromolecules*, 4(4) :890–895, July 2003. Publisher : American Chemical Society.
- [284] Masoud Hasany, Sepehr Talebian, Seyedmostafa Sadat, Navid Ranjbar, Mohammad Mehrali, Gordon G. Wallace, and Mehdi Mehrali. Synthesis, properties, and biomedical applications of alginate methacrylate (ALMA)-based hydrogels : Current advances and challenges. *Applied Materials Today*, 24 :101150, September 2021.

- [285] Isabelle Servin, Alexandre Teolis, Arnaud Bazin, Aurélien Sarrazin, Paule Durin, Olha Sysova, Corinne Gablin, Benoît Saudet, Didier Leonard, Olivier Soppera, Jean-Louis Leclercq, Yann Chevolut, Raluca Tiron, Thierry Delair, and Stephane Trombotto. Chitosan as a water-based photoresist for DUV lithography. In *Advances in Patterning Materials and Processes XL*, volume 12498, pages 227–238. SPIE, April 2023.
- [286] Isabelle Servin, Alexandre Teolis, Arnaud Bazin, Paule Durin, Olha Sysova, Corinne Gablin, Benoît Saudet, Didier Leonard, Olivier Soppera, Jean-Louis Leclercq, Yann Chevolut, Raluca Tiron, Thierry Delair, and Stéphane Trombotto. Water-soluble bio-sourced resists for DUV lithography in a 200/300 mm pilot line environment. *Micro and Nano Engineering*, 19 :100202, June 2023.
- [287] Mathieu Caillau, Céline Chevalier, Pierre Crémillieu, Thierry Delair, Olivier Soppera, Benjamin Leuschel, Cédric Ray, Christophe Moulin, Christian Jonin, Emmanuel Benichou, Pierre-François Brevet, Christelle Yeromonahos, Emmanuelle Laurenceau, Yann Chevolut, and Jean-Louis Leclercq. Sub-micron lines patterning into silica using water developable chitosan bioresist films for eco-friendly positive tone e-beam and UV lithography. In *Optical Microlithography XXXI*, volume 10587, pages 225–239. SPIE, March 2018.
- [288] Zongjie Wang, Zhenlin Tian, Xian Jin, Jonathan F. Holzman, Frederic Menard, and Keekyoung Kim. Visible light-based stereolithography bioprinting of cell-adhesive gelatin hydrogels. In *2017 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, pages 1599–1602, July 2017. ISSN : 1558-4615.
- [289] Sandra Muller, Isabelle Ader, Justine Creff, Hélène Leménager, Pauline Achard, Louis Casteilla, Luc Sensebé, Audrey Carrière, and Frédéric Deschaseaux. Human adipose stromal-vascular fraction self-organizes to form vascularized adipose tissue in 3D cultures. *Scientific Reports*, 9(1) :7250, May 2019. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [290] Mélanie Escudero, Laurence Vaysse, Gozde Eke, Marion Peyrou, Francesc Villarroja, Sophie Bonnel, Yannick Jeanson, Louisa Boyer, Christophe Vieu, Benoit Chaput, Xi Yao, Frédéric Deschaseaux, Mélissa Parny, Isabelle Raymond-Letron, Christian Dani, Audrey Carrière, Laurent Malaquin, and Louis Casteilla. Scalable Generation of Pre-Vascularized and Functional Human Beige Adipose Organoids. *Advanced Science*, n/a(n/a) :2301499, September 2023. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/advs.202301499>.
- [291] Deborah Fanfone, Zhichong Wu, Jade Mammi, Kevin Berthenet, David Neves, Kathrin Weber, Andrea Halaburkova, François Virard, Félix Bunel, Catherine Jamard, Hector Hernandez-Vargas, Stephen WG Tait, Ana Hennino, and Gabriel Ichim. Confined migration promotes cancer metastasis through resistance to anoikis and increased invasiveness. *eLife*, 11 :e73150, March 2022. Publisher : eLife Sciences Publications, Ltd.
- [292] Andrew C. Daly, Matthew D. Davidson, and Jason A. Burdick. 3D bioprinting of high cell-density heterogeneous tissue models through spheroid fusion within self-healing hydrogels. *Nature Communications*, 12(1) :753, February 2021. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- [293] Jae Jung Kim, Mehdi Jorfi, Rudolph E. Tanzi, Doo Yeon Kim, Patrick S. Doyle, and Daniel Irimia. Patterning of interconnected human brain spheroids. *Lab on a chip*, 21(18) :3532–3540, September 2021.
- [294] Se-jeong Kim, Hayeon Byun, Sangmin Lee, Eunhyung Kim, Gyeong Min Lee, Seung Jae Huh, Jinmyoung Joo, and Heungsoo Shin. Spatially arranged encapsulation of stem cell spheroids within hydrogels for the regulation of spheroid fusion and cell migration. *Acta Biomaterialia*, 142 :60–72, April 2022.
- [295] Natalja E. Fedorovich, Marion H. Oudshoorn, Daphne van Geemen, Wim E. Hennink, Jacqueline Alblas, and Wouter J. A. Dhert. The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels. *Biomaterials*, 30(3) :344–353, January 2009.
- [296] Fabien Binamé, Geraldine Pawlak, Pierre Roux, and Urszula Hibner. What makes cells move : requirements and obstacles for spontaneous cell motility. *Molecular BioSystems*, 6(4) :648–661, 2010. Publisher : Royal Society of Chemistry.
- [297] Francisco Merino-Casallo, Maria Jose Gomez-Benito, Silvia Hervas-Raluy, and Jose Manuel Garcia-Aznar. Unravelling cell migration : defining movement from the cell surface. *Cell Adhesion & Migration*, 16(1) :25–64, December 2022. Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1080/19336918.2022.2055520>.
- [298] Buddy D. Ratner, Thomas Horbett, Allan S. Hoffman, and Stephen D. Hauschka. Cell adhesion to polymeric materials : Implications with respect to biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research*, 9(5) :407–422, 1975. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.820090505>.
- [299] John V. L. Nguyen and Ebrahim Ghafar-Zadeh. Biointerface Materials for Cellular Adhesion : Recent Progress and Future Prospects. *Actuators*, 9(4) :137, December 2020. Number : 4 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.