

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**Développement de patchs perfusables par bioimpression 3D
pour une application potentielle dans la régénération de tissu
cardiaque**

Par Zineb Ajji

Département de pharmacologie et physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en sciences appliquées

(M.Sc.A) en génie biomédical

Août 2022

© Zineb Ajji, 2022

Université de Montréal
Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Développement de patchs perfusables par bioimpression 3D pour une application potentielle dans la régénération de tissu cardiaque

Présenté par
Zineb Aji

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Christos Boutopoulos
Président-rapporteur

Houman Savoji
Directeur de recherche

Marie-Claude Heuzey
Codirecteur

Géraldine Merle
Membre du jury

Résumé

Les maladies cardiovasculaires sont une des causes de mortalités les plus élevées mondialement. Parmi celles-ci, on retrouve l'infarctus du myocarde, qui n'a pour traitement que la transplantation cardiaque. Or, dû à la faible quantité de donneur, une solution alternative est recherchée. De ce fait, l'ingénierie tissulaire permet le développement de tissus et d'implants thérapeutiques tels les patchs cardiaques, qui peuvent être bioimprimés. Or, une des limitations actuelles de l'utilisation d'une telle stratégie est la vascularisation de tissu bioimprimés.

Dans cette étude, la bioimpression 3D a été utilisée afin de bioimprimer des patchs perfusables de gélatine méthacrylate (GelMA) à utiliser potentiellement pour le tissu cardiaque. Il a été possible de développer une bioencre pouvant être utilisée pour une application dans le tissu cardiaque, d'évaluer l'imprimabilité de l'encre et de bioimprimer de patchs standards et perfusables. Pour ce faire, GelMA a été synthétisé et les propriétés mécaniques ont été évaluées pour finalement sélectionner une encre de 10 % GelMA, ayant un module de Young approprié pour le tissu cardiaque, de $23,7 \pm 5,1$ kPa. Par la suite, les processus d'impression, standard et coaxial, de patchs standards et perfusables ont pu être optimisés. Finalement, des patchs perfusables de GelMA 10% et gélatine 2% ont pu être imprimés avec une viabilité cellulaire élevée, jusqu'à $79,7 \pm 8,7$ % et $83,5 \pm 5,7$ % obtenue aux jours 1 et 7 de culture respectivement, avec des fibroblastes 3T3. La présence de canaux vides et la perfusabilité des patchs démontrent le potentiel de cette méthode pour éventuellement bioimprimer des patchs cardiaques vascularisés épais.

Mots-clés : Bioimpression 3D, patch perfusable, vascularisation, tissu cardiaque, gélatine méthacrylate (GelMA), impression coaxiale

Abstract

Cardiovascular diseases are a leading cause of death worldwide. Myocardial infarction captures a significant segment of this population, and the end-stage myocardial infarction can only be treated by heart transplantation. However, due to the scarcity donors, tissue engineering has been considered as an alternative solution. Tissue engineering allows the development of tissues and therapeutic implants such as cardiac patches. However, one of the main hurdles in the use of such a strategy is the vascularization of bioprinted tissue.

In this study, 3D bioprinting was used to bioprint perfusable gelatin methacrylate (GelMA) patches for a potential use in cardiac tissue. This work consists in the development of a bioink that can be used for the cardiac tissue, the evaluation of the printability of the ink, and the final bioprinting of standard and perfusable patches. For this purpose, GelMA was synthesized and a final concentration of 10 % was selected as it showed an appropriate Young's modulus for cardiac tissue, of 23.7 ± 5.1 kPa, while maintaining high biocompatibility. Subsequently, the printing process of standard and perfusable patches could be optimized with the use of GelMA and gelatin inks. Finally, 10% GelMA and 2% gelatin vascularized patches could be printed with high cell viability, of up to 79.7 ± 8.7 % and 83.5 ± 5.7 % on days 1 and 7 of culture respectively for 3T3 fibroblasts. Additionally, the presence of hollow channels of the perfusable patches demonstrates the potential of this method to be eventually applied to the bioprinting of thick vascularized cardiac patches.

Key words: 3D bioprinting, vascularization, perfusable patches, cardiac tissue, gelatin methacrylate (GelMA), coaxial bioprinting

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations.....	xii
1 Introduction.....	13
1.1 Maladies cardiovasculaires	13
1.1 Tissu cardiaque	14
1.2 Génie tissulaire cardiaque.....	15
1.3 Hydrogels.....	16
1.4 Techniques d'impression 3D	19
1.4.1 Extrusion.....	20
1.4.2 Laser.....	21
1.4.3 Jet d'encre (Inkjet)	21
1.4.4 Stéréolithographie.....	22
1.5 Matériaux utilisés pour l'impression 3D de tissus.....	23
1.5.1 Matériaux synthétiques	23
1.5.2 Matériaux naturels	25
1.5.3 Matrice extracellulaire décellularisée	25
1.6 Critères généraux pour la bioimpression 3D de tissus.....	29
1.6.1 Propriétés rhéologiques.....	29
1.6.2 Paramètres d'impression.....	31
1.6.3 Propriétés mécaniques de la structure.....	32
1.7 Impression 3D de tissus	32
1.8 Développement de systèmes vasculaires	36
1.8.1 Formation de vaisseaux.....	37
1.8.2 Méthodes de vascularisation de tissus fabriqués	38
1.9 Méthodes d'impression 3D de système vasculaire	41
1.9.1 Multi matériel.....	41
1.9.2 Bioimpression coaxiale.....	42

2	Objectifs.....	48
3	Méthode	49
3.1	Synthèse de bioencres.....	49
3.2	Propriétés mécaniques	51
3.3	Rhéologie	52
3.4	Imprimabilité.....	53
3.4.1	Imprimabilité de structures standard.....	53
3.4.2	Fidélité d'impression	54
3.5	Imprimabilité de structures coaxiales	55
3.6	Viabilité cellulaire.....	57
3.6.1	Encapsulation manuelle	58
3.6.2	Bioimpression standard.....	58
3.6.3	Bioimpression coaxiale.....	59
3.7	Analyse statistique	60
4	Résultats et discussion	61
4.1	Synthèse de GelMA	61
4.2	Propriétés mécaniques	63
4.3	Biocompatibilité.....	66
4.4	Rhéologie	73
4.5	Imprimabilité.....	76
4.5.1	Imprimabilité de structures standard.....	76
4.5.2	Fidélité d'impression	79
4.5.3	Imprimabilité coaxiale	80
4.6	Viabilité cellulaire.....	84
4.6.1	Encapsulation manuelle	84
4.6.2	Bioimpression standard.....	86
4.6.3	Bioimpression coaxiale.....	89
5	Discussion générale	92
6	Travaux futurs.....	97
7	Conclusion	98
	Bibliographie.....	99

Liste des tableaux

Tableau 1. Degré de méthacrylation (DoM) pour plusieurs lots de GelMA synthétisés..	62
Tableau 2. Imprimabilité d'une encre de GelMA 10 % du lot 1 pour différentes températures d'impression.	76
Tableau 3. Imprimabilité de GelMA 10 % du lot 1 à une température de 23 °C. Par observation visuelle, le vert représente une bonne structure, le jaune, une structure moyenne et le rouge, une mauvaise structure.	77
Tableau 4. Plage de pressions permettant une imprimabilité notée comme « bonne » de GelMA 10 % pour les lots 2 et 3 pour différentes vitesses d'impression.	79
Tableau 5. Conditions permettant d'obtenir une bonne structure imprimable.	79
Tableau 6. Pressions nécessaires à l'extrusion d'encres de GelMA 10 % avec plusieurs concentrations de gélatine.	82
Tableau 7. Conditions permettant d'obtenir une bonne structure coaxiale imprimable. ..	83

Liste des figures

- Figure 1. Structure du tissu cardiaque. Tiré de « Constructing biomimetic cardiac tissues: a review of scaffold materials for engineering cardiac patches » par D. Sharma, 2019, *Emergent materials*, (2), fig. [1]. (<https://doi.org/10.1007/s42247-019-00046-4>). Reproduit avec permission de Springer Nature. Copyright 2019. 15
- Figure 2. Représentation des principes d'ingénierie tissulaire cardiaque; (a) Principes de développement de tissu; (b) applications possibles du génie tissulaire dans le tissu cardiaque. Image adaptée de « 3D bioprinting and its potential impact on cardiac failure treatment: An industry perspective », par R.K. Birla, 2020, *APL Bioengineering*, 4(1). doi:10.1063/1.5128371. Licence CC BY. 16
- Figure 3. Représentation des différents types de réticulation physique et chimique. Tiré de « Advances in Extrusion 3D Bioprinting: A Focus on Multicomponent Hydrogel-Based Bioinks », par X. Cui, 2020, *Advanced Healthcare Materials*. 9(15), fig. [2]. (<https://doi.org/10.1002/adhm.201901648>)Image reproduite avec permission de JOHN WILEY AND SONS. Copyright 2020 19
- Figure 4. Techniques d'impression 3D. Tiré de « Polymeric Systems for Bioprinting », par M. Bedell, 2020, *Chemical Reviews*, 120(19), fig. [3]. (<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00834>). Image reproduite avec permission de American Chemical Society. Copyright 2020. 22
- Figure 5. Paramètres rhéologiques à considérer lors de l'impression 3D d'encres. Reproduit de « Printability and shape fidelity of bioinks in 3D bioprinting », par A. Schwab, 2020, *Chemical reviews*, 120(19), fig. [3]. (<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00084>). Copyright © 2020 American Chemical Society. Licence CC-BY-NC-ND. 31
- Figure 6. Bioimpression de structure vascularisée dans un bain FRESH. (a) représentation schématique de la bioimpression. (b)-(d) Images de la structure bioimprimée. Tiré de « Human-recombinant-Elastin-based bioinks for 3D bioprinting of vascularized soft tissues », par S. Lee, 2020, *Advanced Materials*, 32(45), fig. [3]. (<https://doi.org/10.1002/adma.202003915>). Adapté avec permission de John Wiley and Sons. Copyright 2020..... 34
- Figure 7. Impression 3D de structures à l'aide d'une encre à base de GelMA/gélatine prenant avantage d'une méthode de double réticulation. Tiré de « 3D bioprinting of low-concentration cell-laden gelatin methacrylate (GelMA) bioinks with a two-step cross-linking strategy », par J. Yin, 2018, *ACS Applied Material & Interfaces*, 10(08), fig. [2]. (<https://doi.org/10.1021/acsami.7b16059>). Reproduit avec permission de American Chemical Society. Copyright 2018. 35
- Figure 8. Schématisation des méthodes de vascularisation par (A) angiogenèse par germination et (B) vasculogenèse. Tiré de « Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis », par P. Carmeliet et al., 2011, *Nature*, 473, fig. [1]. (<https://doi.org/10.1038/nature10144>). Reproduit avec permission. Copyright 2011. 38
- Figure 9. Bioimpression 3D à partir de tissu autologue à l'aide d'une méthode d'impression multi matériel. Reproduit de «3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts », par N. Noor, 2019, *Advanced science*, 6(11), fig. [1]. (<https://doi.org/10.1002/advs.201900344>). Licence CC BY. 42

Figure 10. Impression coaxiale à l'aide d'un montage par réticulation in situ de GelMA, gélatine et acide hyaluronique comme encre externe et PBS coloré en bleu comme encre interne. Tiré de « Free-form co-axial bioprinting of a gelatin methacryloyl bio-ink by direct in situ photo-crosslinking during extrusion », par C.D. O'Connell, 2020, <i>Bioprinting</i> , 19, fig. [7]. (doi: https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00087). Reproduit avec permission de Elsevier. Copyrights 2020.....	44
Figure 11. Schéma de bioimpression 3D coaxiale de structures creuses à l'aide d'encres à base de GelMA et gélatine. i) Bioimpression coaxiale de gélatine (vert) et de GelMA (rouge). ii) Photo réticulation des structures bioimprimées. iii) Dissolution de la gélatine des canaux internes. Adapté de « Directly coaxial 3D bioprinting of large-scale vascularized tissue constructs. <i>Biofabrication</i> », par L. Shao, 2020, <i>Biofabrication</i> , 12(3), fig. [2]. (Doi:10.1088/1758-5090/ab7e76). Reproduit de IOP Publishing Ltd.....	45
Figure 12. Bioimpression 3D de structures coaxiales avec réticulation thermique et lumineuse rapide post-impression. Tiré de « Coaxial Extrusion of Tubular Tissue Constructs Using a Gelatin/GelMA Blend Bioink », par Y. Wang, 2019, <i>ACS Biomaterials Science & Engineering</i> , 5(10), fig. [1]. (https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00926). Reproduit avec permission de American Chemical Society. Copyright 2019.	46
Figure 13. Étapes nécessaires à la synthèse de GelMA.....	50
Figure 14. Processus de méthacrylation de la gélatine en GelMA.....	50
Figure 15. Exemple de courbes type brutes obtenues suite aux tests de traction uniaxiale permettant d'obtenir le module de Young des échantillons. Pour des échantillons de GelMA 10 %, LAP 0,5 %, 60s directement obtenu du logiciel de l'appareil Instron Electropuls E3000.....	52
Figure 16. Schéma représentant les différents paramètres nécessaires au calcul de la fidélité d'impression (Pr).....	55
Figure 17. Montage de la bioimprimante BioX6 de Cellink au centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine pour l'impression coaxiale de structures. a) tête d'impression standard; b) tête d'impression à température contrôlable; c) modules UV.	56
Figure 18. Spectre 1HNMR de la gélatine porcine de type A. Représentation du pic caractéristique de phénylalanine (a); et du pic de lysine (b).....	61
Figure 19. Spectre 1HNMR de GelMA synthétisé. Représentation du pic de caractéristique de phénylalanine (a); des pics de groupements méthacrylates (b); et du pic de lysine (c).	62
Figure 20. Modules de Young pour GelMA 5 % pour des temps de réticulation de 30s et 60s. * Indique une différence statistiquement significative pour un test t-Student à un seuil $p < 0,05$ entre les groupes de LAP 0,25% à 30s et 60s (N=2, n=>2).	63
Figure 21. Modules de Young pour GelMA 10 % pour des temps de réticulation de 30s et 60s. Pas de différence statistiquement significative au seuil $p < 0,05$ avec le test t-Student (N = 2, n=>3).	65
Figure 22. Images de LIVE/DEAD de fibroblastes 3T3 encapsulés dans un gel de GelMA 5% avec du LAP 0,5 %. La fluorescence verte indique les cellules viables et la fluorescence rouge, les cellules mortes.....	66

Figure 23. Viabilité des fibroblastes 3T3 encapsulés dans des gels de 5 % GelMA, 0,5 % LAP avec un temps de réticulation de 30s à 120s aux jours 1 et 7 de culture cellulaire. Pas de différence statistiquement significative avec le test ANOVA, $p > 0,05$ ($N = 1$, $n \Rightarrow 3$).....	67
Figure 24. Images de LIVE/DEAD de fibroblastes 3T3 encapsulés dans un gel de GelMA 10 % avec du LAP 0,5 %. La fluorescence verte indique les cellules viables et la fluorescence rouge, les cellules mortes.....	68
Figure 25. Viabilité de fibroblastes 3T3 encapsulés dans des gels de 10 % GelMA et 0,5 % LAP pour des temps de réticulation de 30s à 120s aux jours 1 et 7 de culture. Pas de différence statistiquement significative avec le test ANOVA, $p > 0,05$ ($N = 2$, $n \Rightarrow 3$).	69
Figure 26. Images de LIVE/DEAD de fibroblastes 3T3 encapsulés dans un gel de GelMA 10 % avec du LAP 0,25 % pour un temps de réticulation de 30s. La fluorescence verte indique les cellules viables et la fluorescence rouge, les cellules mortes.	70
Figure 27. Viabilité des fibroblastes 3T3 encapsulés dans des gels de GelMA 10 % et LAP 0,25 % pour le temps de réticulation de 30s aux jours 1 et 7 de culture. ($N = 1$, $n=2$).	71
Figure 28. Balayage de température de la gélatine 5 % et GelMA 5 % et 10 %.....	73
Figure 29. Viscosité des encres de GelMA 10 % et GelMA 10 %-gélatine 2 % lors de l'écoulement à différentes températures.	74
Figure 30. Images représentatives de l'échelle visuelle d'impression. a) représente une mauvaise figure (rouge); b) représente une figure moyenne (jaune) et; c) représente une bonne figure (vert). Les structures imprimées sont de 1 cm x 1 cm.	77
Figure 31. Impression d'une structure de GelMA 10 % dans la plage de bonne impression. Structure de taille 1x1cm. Échelle: 1 cm.	78
Figure 32. Vue de haut d'une structure imprimée de GelMA 10 % en suivant les conditions d'une bonne plage d'impression.	80
Figure 33. Images tirées d'une vidéo à plusieurs intervalles de temps montrant le processus de perfusion d'une structure de GelMA 10 %, gélatine 2 % et LAP 0,5 %. (a) Structure avec canaux creux. (b) insertion de l'aiguille et début de perfusion. (c) Structure avec canaux creux perfusée, les flèches noires indiquent certains canaux clairement perfusés.	83
Figure 34. Fibroblastes 3T3 encapsulés dans des gels de 10 % GelMA, 2 % gélatine et 0,5 %LAP pour des temps de 30s et 60s de réticulation aux jours 1 et 7 de culture. La fluorescence verte indique les cellules viables et la fluorescence rouge, les cellules mortes.....	85
Figure 35. Viabilité de fibroblastes 3T3 encapsulés dans des gels de 10 % GelMA, 2 % gélatine et 0,5 % LAP pour des temps de 30s et 60s de réticulation aux jours 1 et 7 de culture cellulaire.* indique une différence statistiquement significative avec un test de t-Student pour un seuil limite de $p < 0,05$ ($N=1$, $n \Rightarrow 3$).	86
Figure 36. Structures encapsulant des fibroblastes 3T3 bioimprimés en 3D avec une encre de 10 % GelMA et 0,25 % LAP. La fluorescence verte indique les cellules viables et la fluorescence rouge, les cellules mortes.....	87
Figure 37. Viabilité cellulaire de fibroblastes 3T3 lors de la bioimpression 3D de 10 % GelMA avec 0,5 % LAP et 0,25 % LAP à un temps de réticulation de 60s aux jours 1	

et 7 de culture.* Indique une différence significative par test Student-t à un seuil de $p < 0,05$ ($N = 1, n \geq 2$).	87
Figure 38. Structures coaxiales avec canal interne vide encapsulant des fibroblastes 3T3 bioimprimés en 3D avec une encre externe de 10 % GelMA, gélatine 2 % et 0,5 % LAP et une encre interne de 5 % gélatine. La fluorescence verte indique les cellules viables et la fluorescence rouge, les cellules mortes. Les flèches blanches indiquent les canaux creux.	89
Figure 39. Viabilité cellulaire de fibroblastes 3T3 lors de la bioimpression 3D de structures coaxiales avec une encre externe de 10 % GelMA, gélatine 2 % et 0,5 % LAP et une encre interne de 5 % gélatine à un temps de réticulation de 60s aux jours 1 et 7 de culture. Pas de différence significative avec un test Student-t au seuil $p < 0,05$ ($N=1, n \geq 4$).	90

Liste des sigles et abréviations

3D : trois dimensions

C : circularité

CMs : cardiomyocytes

CFs: fibroblastes cardiaques

DoM: degré de méthacrylation

ECM: matrice extracellulaire

GelMA: gélatine méthacrylate

¹HRMN : spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

LAP : lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate

SLA : stéréolithographie

PBS : solution de phosphate buffer

Pr : fidélité d'impression

ECs: cellules endothéliales

1 Introduction

1.1 Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont une des causes de mortalité les plus élevées à travers la planète (Fakhruddin, Razak, Nayan, & Kadir, 2020). Parmi les maladies cardiovasculaires, généralement considérées comme troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, on retrouve l'infarctus du myocarde, plus communément appelé crise cardiaque, les arythmies cardiaques, les maladies valvulaires cardiaques, ainsi que d'autres maladies coronariennes (Fakhruddin et al., 2020; McMahan et al., 2020).

La progression de ces maladies réduit l'apport de sang au cœur, ce qui fait en sorte que les cellules environnantes n'ont pas un apport suffisant en nutriments et oxygène, ce qui peut éventuellement causer la mort du tissu (McMahan et al., 2020; Sharma, Ferguson, Kamp, & Zhao, 2019). Cela est un inconvénient majeur pour le cœur puisque le tissu cardiaque ne possède pas de capacité de régénération suffisante pour palier à la mort de cellules cardiaques, les cardiomyocytes (CMs) (McMahan et al., 2020; Sharma et al., 2019). Suite à l'endommagement et la mort du tissu, le système immunitaire s'active et un tissu de cicatrisation se forme au site endommagé. Cela résulte ensuite en la modification de la rigidité de la paroi du cœur, ce qui par la suite peut affecter la capacité du cœur à pomper le sang convenablement et ainsi induire des effets secondaires néfastes (McMahan et al., 2020).

Pour les cas les plus graves, la seule solution est la transplantation cardiaque. Or, en tenant compte des complications potentielles de la chirurgie, des risques de rejet immunitaire et de l'insuffisance du nombre de donneurs, il s'avère nécessaire de développer des alternatives (Fakhruddin et al., 2020; McMahan et al., 2020).

Outre la transplantation cardiaque, une autre méthode qui a été tentée afin de résoudre ce problème est l'injection cellulaire directe. Cette technique a été en mesure de démontrer certains progrès et la possible amélioration du tissu en réduisant les dommages

subséquents au myocarde. Or, cette méthode présente des limitations, incluant majoritairement la faible survie des cellules après l'injection ainsi que le fait que les cellules ne demeurent pas au site post injection (Bejleri et al., 2018; M. Qasim, F. Haq, M. H. Kang, & J. H. Kim, 2019; Sharma et al., 2019). Également, il a été montré que l'introduction de cellules dans le corps à l'aide de structures et non pas par injection seule permet d'améliorer les implantations (Sharma et al., 2019).

Ainsi, certains scientifiques se sont tournés vers le génie tissulaire afin de développer des patchs cardiaques. Ces patchs ont pour but d'être appliqués sur le cœur afin de fournir un support mécanique et biologique qui pourra permettre la régénération du tissu du myocarde (McMahan et al., 2020). Pour être en mesure de développer ce genre d'implant thérapeutique, il faut que le support développé ressemble le plus possible au tissu cardiaque natif en termes de propriétés.

1.1 Tissu cardiaque

Un des éléments fonctionnels structurant principaux du cœur est la matrice extracellulaire (ECM). Cette matrice permet le mouvement continu du cœur suite aux contractions cardiaques en plus de fournir un environnement approprié aux cellules. Le type d'ECM retrouvé dans chaque région du cœur, plus principalement des ventricules, va varier selon la région (Sharma et al., 2019).

Le mur des ventricules cardiaques renferme trois couches : l'épicarde, l'endocarde, et le myocarde. L'épicarde est la couche externe située à la surface des ventricules et est majoritairement composée de tissu connectif et d'ECM riche en protéines. L'endocarde est la couche interne élastique des ventricules et est principalement composée de collagène (McMahan et al., 2020; Mota, Camarero-Espinosa, Baker, Wieringa, & Moroni, 2020; Sharma et al., 2019).

Le myocarde est la couche intermédiaire entre l'endocarde et l'épicarde, responsable de la contraction et de la propagation des signaux électriques. On y retrouve à

30 % des CMs alignés densément, à 60 % des cellules endothéliales (ECs) et le reste est composé de myofibroblastes, péricytes, et des cellules régulatrices du système immunitaire (McMahan et al., 2020; Mota et al., 2020; Savoji et al., 2019; Sharma et al., 2019). Ces cellules sont réparties dans un réseau d'ECM principalement composé de collagène de type 1 et 3, de fibres d'élastine et de glycoprotéines (McMahan et al., 2020; Mota et al., 2020). Les principales couches composant le tissu cardiaque, incluant le mur des ventricules, sont représentées à la figure 1.

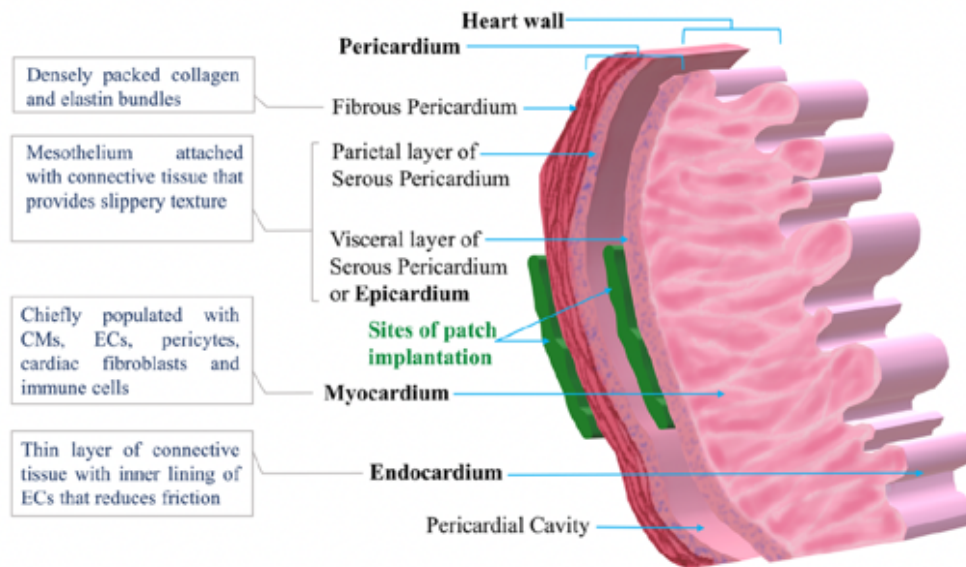


Figure 1. Structure du tissu cardiaque. Tiré de « Constructing biomimetic cardiac tissues: a review of scaffold materials for engineering cardiac patches » par D. Sharma, 2019, *Emergent materials*, (2), fig. [1]. (<https://doi.org/10.1007/s42247-019-00046-4>).

Reproduit avec permission de Springer Nature. Copyright 2019.

1.2 Génie tissulaire cardiaque

Le génie tissulaire est un domaine qui combine l'ingénierie, les matériaux et les sciences de la vie afin de permettre de régénérer ou de remplacer des tissus endommagés (Birla & Williams, 2020; Fakhruddin et al., 2020). Ainsi, des cellules sont combinées à des biomatériaux qui servent d'échafaudage pour créer des structures utilisées pour répliquer différents types de tissus. Ce concept est schématisé à la figure 2a. Lorsqu'appliqué au tissu

cardiaque, le terme d'ingénierie tissulaire cardiaque est utilisé. Il est alors question d'une application afin de réparer des parties du cœur, incluant les patches cardiaques, les ventricules, les valves cardiaques etc. (Fig. 2b) (Birla & Williams, 2020). Parmi les techniques qui peuvent être utilisées en génie tissulaire cardiaque, l'impression et la bioimpression 3D sont des techniques prometteuses.

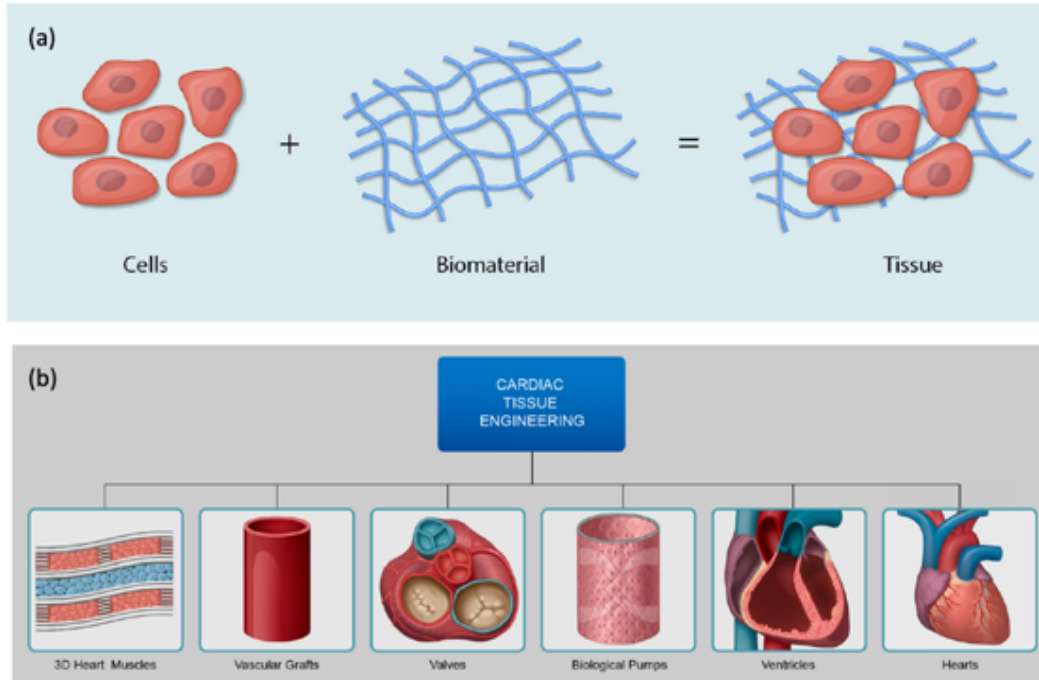


Figure 2. Représentation des principes d'ingénierie tissulaire cardiaque; (a) Principes de développement de tissu; (b) applications possibles du génie tissulaire dans le tissu cardiaque. Image adaptée de « 3D bioprinting and its potential impact on cardiac failure treatment: An industry perspective », par R.K. Birla, 2020, *APL Bioengineering*, 4(1). doi:10.1063/1.5128371. Licence CC BY.

1.3 Hydrogels

Les matériaux les plus communément utilisés dans l'ingénierie tissulaire, ainsi que pour la bioimpression 3D sont les hydrogels (Mota et al., 2020; Rider, Kačarević, Alkildani, Retnasingh, & Barbeck, 2018). Les hydrogels sont des chaînes de polymères hydrophiles qui forment des réseaux avec un fort contenu en eau (Mota et al., 2020; Rider et al., 2018;

Unagolla & Jayasuriya, 2020). Ces matériaux sont utilisés en génie tissulaire puisqu'ils sont biocompatibles et biodégradables. De plus, avec leur fort contenu en eau, ils offrent la possibilité d'encapsuler des cellules et ils offrent un environnement ressemblant à celui de l'ECM, ce qui favorise la croissance cellulaire (Gungor-Ozkerim, Inci, Zhang, Khademhosseini, & Dokmeci, 2018; Mota et al., 2020; Unagolla & Jayasuriya, 2020). Un autre avantage des hydrogels est qu'ils sont idéaux pour tout ce qui concerne le développement de structures ayant une bonne réponse aux stimuli et pouvant s'approcher des caractéristiques de tissus mous (Mota et al., 2020).

Or, afin de former des réseaux 3D qui conservent leur forme, la réticulation des chaînes de polymères des hydrogels est nécessaire (X. Cui et al., 2020; Unagolla & Jayasuriya, 2020). Les différentes méthodes de réticulation peuvent être séparées en deux catégories : la réticulation chimique et physique (X. Cui et al., 2020; Mota et al., 2020; Unagolla & Jayasuriya, 2020). La figure 3 résume différents types de réticulation. De plus, en modifiant le type ou les caractéristiques de réticulation d'un hydrogel, il est possible d'ajuster les propriétés physico-chimiques de la structure résultante (Unagolla & Jayasuriya, 2020).

Réticulation chimique

La forme la plus stable de réticulation est la réticulation chimique, souvent causée par des interactions covalentes. Cela inclut, entre autres, la réticulation par polymérisation de radicaux libres, la chimie click, la réticulation enzymatique et la réaction de base Schiff (X. Cui et al., 2020; Unagolla & Jayasuriya, 2020). Une des méthodes de réticulation chimique la plus utilisée avec les hydrogels photo réticulables, tel la gélatine méthacrylate (GelMA), est la méthode de polymérisation de radicaux libres (X. Cui et al., 2020; Young, White, & Daniele, 2020). En effet, GelMA combiné à un photo initiateur, lorsqu'exposé à la lumière UV, forme des liens covalents irréversibles, formant ainsi l'hydrogel (Yin, Yan, Wang, Fu, & Suo, 2018; Young et al., 2020).

Réticulation physique

La réticulation physique comprend les interactions non covalentes telles les interactions hydrophobes, électrostatiques et les liens hydrogènes (X. Cui et al., 2020; Unagolla & Jayasuriya, 2020). Les gels réticulés physiquement ont souvent une stabilité mécanique plus faible que les gels réticulés chimiquement (X. Cui et al., 2020; Unagolla & Jayasuriya, 2020). Un exemple de gel réticulé physiquement par interactions électrostatiques est celui de l'alginate. La réticulation est causée par la formation de structures insolubles entre les chaînes de polymères et des anions ou cations présents dans le système. L'alginate, étant chargé négativement, devient réticulé en présence d'ions de calcium Ca^{2+} , lors de l'ajout d'une solution de CaCl_2 dans le système (X. Cui et al., 2020; Unagolla & Jayasuriya, 2020).

Un autre exemple est la gélification physique de la gélatine. Lorsque cette solution est refroidie sous une certaine température critique, sa structure change et passe de filaments de polymère enroulés seuls à une structure en hélice triple, ce qui crée des liens hydrogènes, et ainsi forme le réseau 3D de l'hydrogel. Cette gélification est réversible lorsque la température retourne au-dessus de la température critique de gélification (Unagolla & Jayasuriya, 2020; Young et al., 2020).

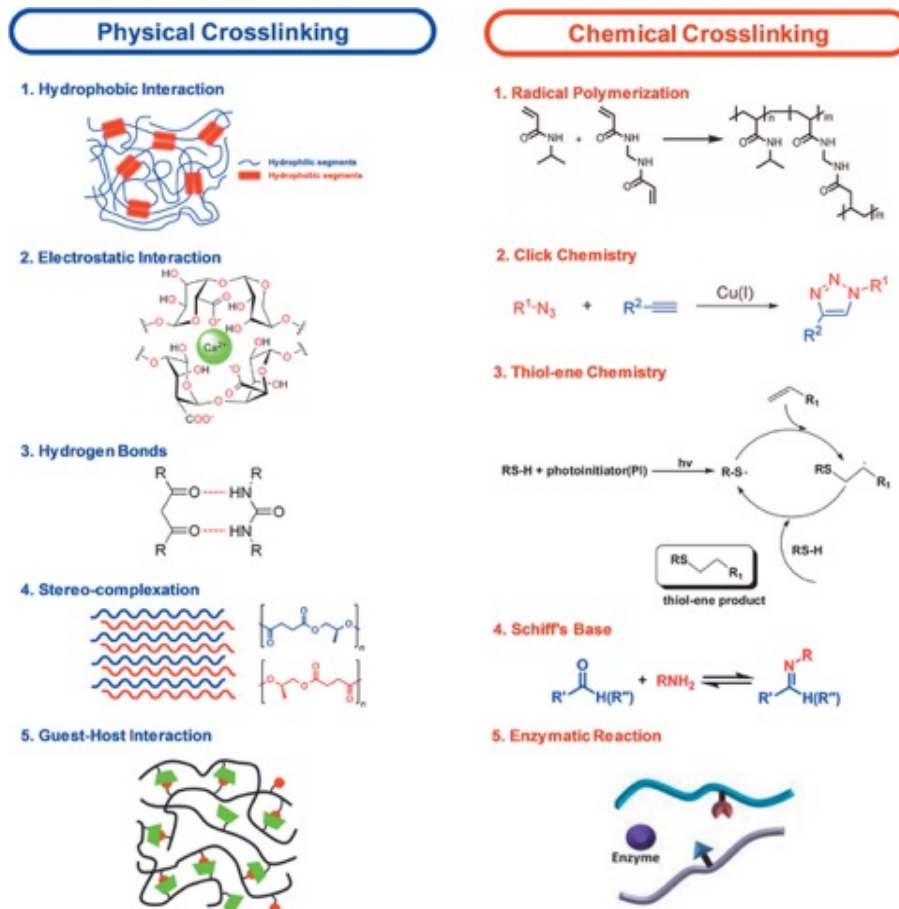


Figure 3. Représentation des différents types de réticulation physique et chimique. Tiré de « Advances in Extrusion 3D Bioprinting: A Focus on Multicomponent Hydrogel-Based Bioinks », par X. Cui, 2020, *Advanced Healthcare Materials*. 9(15), fig. [2]. (<https://doi.org/10.1002/adhm.201901648>) Image reproduite avec permission de JOHN WILEY AND SONS. Copyright 2020

1.4 Techniques d'impression 3D

L'impression 3D appliquée à l'ingénierie tissulaire, est une méthode qui permet d'obtenir une déposition précise de matériel en structures fines qui peut être personnalisable pour chaque patient (Rider et al., 2018).

Il est à noter que la principale distinction entre l'impression 3D et la bioimpression 3D est que l'impression 3D consiste en l'impression de structures acellulaires qui peuvent par la suite être utilisées comme plateforme afin de réaliser de la culture cellulaire. Alors

que la bioimpression 3D implique l'impression directe de bioencres, c'est-à-dire, des encres comprenant des cellules ou composants biologiques tels des facteurs de croissances encapsulés dans l'encre (Ashammakhi et al., 2022; Fakhruddin et al., 2020). Les différentes techniques d'impression présentées dans cette section sont schématisées à la figure 4.

1.4.1 Extrusion

La méthode de bioimpression par extrusion est la méthode d'impression la plus commune et permet l'utilisation d'une grande variété de matériaux (S. C. Lee, Gillispie, Prim, & Lee, 2020; Rider et al., 2018). Cette méthode est caractérisée par l'utilisation de bioencres qui sont déposées couche par couche suivant un modèle numérique CAD (*computer assisted design*) sur une plateforme. Tout cela est réalisé par des têtes d'impressions contrôlable qui se déplacent en position x et y et z, permettant de créer une architecture désirée (Alonzo, AnilKumar, Roman, Tasnim, & Joddar, 2019; Rider et al., 2018). La génération de structure se fait par l'empilage de couches qui peuvent être extrudées de trois manières différentes, selon l'imprimante : par méthode pneumatique, par piston ou par vis (Alonzo et al., 2019). Suite à la déposition de l'encre, une méthode de réticulation, selon l'encre utilisée, suit afin de permettre aux structures de conserver leurs forme post impression (Schwab et al., 2020). À l'aide de la technique d'extrusion par vis, il est possible d'imprimer des encres et matériaux à viscosité plus élevés que lors de l'utilisation des autres techniques, la viscosité allant jusqu'à 10^4 Pa.s (Schwab et al., 2020). Il est à noter que la taille des filaments obtenus sera dictée par l'encre utilisée ainsi que par le diamètre de l'aiguille (Schwab et al., 2020). À l'aide de cette technique, il est possible d'imprimer des structures avec des densités cellulaires élevées en conservant une bonne forme suite à la déposition (Rider et al., 2018). Or, une des limites de l'impression par extrusion est la résolution d'impression, d'environ 200 μ m, qui est considérée comme étant inférieure par rapport aux autres types d'impression 3D (Rider et al., 2018). De plus, avec cette méthode, la géométrie des aiguilles utilisées peut avoir un impact sur la viabilité cellulaire lors de la bioimpression (Bedell, Navara, Du, Zhang, & Mikos, 2020). Or cette

méthode d'impression est assez rapide, ce qui facilite l'impression de structures plus larges (Bedell et al., 2020; Rider et al., 2018).

1.4.2 Laser

L'impression 3D par laser, *laser-assisted bioprinting* (LAB), est une méthode qui permet d'imprimer des structures sans échafaudage. Le montage général de ce type d'imprimante comporte un laser pulsatile, une surface donneur et une surface réceptrice (Rider et al., 2018). Cette technique fonctionne avec le principe selon lequel le laser induit une vaporisation sur la surface donneur couverte d'or ou titane (Rider et al., 2018). Cela entraîne la formation d'une bulle qui est alors propulsée sur la surface réceptrice (Rider et al., 2018). L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'obtenir des structures de résolution élevée, de l'ordre des 20 μm et une très bonne viabilité cellulaire. Or, cette technique est limitée aux hydrogels ayant des viscosités moyennes, autour de 100 mPa.s (Bedell et al., 2020; Rider et al., 2018). Il s'agit d'une méthode moins utilisée due à ses coûts élevés et à la complexité du montage (Fakhruddin et al., 2020). Or, l'avantage principal est que puisque cette technique n'utilise pas d'aiguilles, cela élimine la problématique de blocage dans les seringues et cela permet d'obtenir des structures avec une viabilité cellulaire plus élevée (Bedell et al., 2020; Fakhruddin et al., 2020).

1.4.3 Jet d'encre (Inkjet)

La technique d'impression par jet d'encre permet la déposition localisée de gouttelettes afin de former des structures imprimées en 3D (Rider et al., 2018). Avec cette technique, il est possible d'imprimer des cellules avec une résolution de 30 à 300 μm (Bedell et al., 2020; Rider et al., 2018). Or, il est possible qu'il y ait formation d'agrégats de cellules, ce qui peut réduire la qualité des structures finales (Rider et al., 2018). Avec cette technique, la viscosité des matériaux utilisés est souvent assez faible, moins de 100 mPa.s, ce qui peut limiter la fidélité de forme post impression des structures (Bedell et al., 2020; Rider et al., 2018). Ainsi, malgré le fait que la déposition de cellules peut être très

précise avec cette technique, la faible fidélité de forme fait en sorte qu'il est difficile d'imprimer des structures complexes de grande taille (Rider et al., 2018).

1.4.4 Stéréolithographie

La stéréolithographie (SLA) est une technique d'impression ne nécessitant pas l'utilisation d'une aiguille. Dans cette technique les structures se forment par l'irradiation à l'UV d'un hydrogel précurseur mélangé à un photoinitiateur, permettant ainsi d'établir un motif spécifique (Bedell et al., 2020; Rider et al., 2018). Les principaux paramètres à considérer avec cette méthode sont la concentration du photoinitiateur, le type de matériel à utiliser et le temps d'exposition à l'UV. La résolution possible avec cette technique va dépendre de la technologie utilisée, mais peut être assez élevée (Bedell et al., 2020; Rider et al., 2018). Par exemple, avec la méthode de SLA à deux photons, une résolution jusqu'à 20 μm peut être atteinte (Rider et al., 2018). Or, puisque cette méthode n'utilise pas de force mécanique sur les encres et peut être utilisée avec un système de polymérisation à lumière visible, cela permet une forte viabilité cellulaire (Bedell et al., 2020).

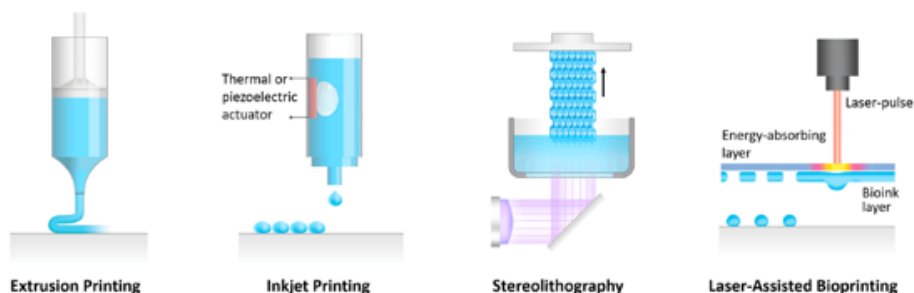


Figure 4. Techniques d'impression 3D. Tiré de « Polymeric Systems for Bioprinting », par M. Bedell, 2020, *Chemical Reviews*, 120(19), fig. [3].

(<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00834>). Image reproduite avec permission de American Chemical Society. Copyright 2020.

1.5 Matériaux utilisés pour l'impression 3D de tissus

Les matériaux (encres et bioencres) utilisés en impression et bioimpression 3D peuvent être séparés en deux grandes catégories : les matériaux synthétiques et les matériaux naturels, chacun possédant des propriétés distinctes.

1.5.1 Matériaux synthétiques

Les matériaux synthétiques sont principalement utilisés en impression 3D de tissus pour l'amélioration des propriétés mécaniques et la stabilité des structures développées (Theus et al., 2019). Ils incluent entre autres le polycaprolactone (PCL), l'acide poly glycolique (PGA), le poly (lactic-co-glycolic acide) (PLGA) et le poly (éthylène glycol) (PEG) en plus de la forme photoréticulable du PEG, poly (éthylène glycol) diacrylate (PEGDA) (H. Cui et al., 2020; Gungor-Ozkerim et al., 2018; Jafari et al., 2022; M. Qasim, F. Haq, M.-H. Kang, & J.-H. Kim, 2019). Or, puisque ces matériaux sont souvent insuffisants pour offrir un environnement favorable à la croissance cellulaire, ils sont souvent combinés avec des matériaux naturels (Gungor-Ozkerim et al., 2018; Jafari et al., 2022). En effet, Zhang et al., ont dû combiner une encre à base de PCL/PLCL (Poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone)) à une bioencre de fibrinogène, gélatine et acide hyaluronique, afin d'ajouter un motif favorable à la viabilité cellulaire pour bioimprimer une urètre implantable chez les lapins (K. Zhang et al., 2017).

De plus, Gao et al. ont utilisé l'impression 3D par jet d'encre pour imprimer du tissu cartilagineux renfermant des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) dans une bioencre composée de PEG et GelMA (Gao et al., 2015). L'ajout de PEG dans la bioencre leur a permis d'obtenir des propriétés convenables pour une encre imprimée par méthode de jet d'encre tout en permettant d'avoir des propriétés mécaniques convenables à une application pour du tissu osseux et cartilagineux. Ils ont ainsi pu imprimer une structure montrant une différenciation adéquate des cellules en ostéoblastes avec une viabilité cellulaire supérieure à 80% (Gao et al., 2015).

Alors que Cui et al. ont utilisé une encre à base de 10% PEGDA et 10% GelMA (H. Cui et al., 2020), afin d'imprimer par SLA un patch cardiaque permettant de répliquer plus précisément l'architecture anisotrope du myocarde (H. Cui et al., 2020). Ainsi, en se concentrant sur les aspects de design et de microstructure adaptable du patch, ils ont été en mesure de démontrer la possibilité d'obtenir un patch permettant une bonne intégration avec l'environnement dynamique du cœur, tout en ayant une bonne vascularisation et maturation de CMs post impression (H. Cui et al., 2020).

1.5.2 Matériaux naturels

Les matériaux naturels sont retrouvés dans la nature et peuvent être extraits à partir de différents processus physiques ou chimiques (Ahadian, Savoji, & Khademhosseini, 2018; F. Liu et al., 2018). Pour la bioimpression 3D, les matériaux naturels sont principalement utilisés puisqu'ils offrent un environnement favorable pour l'encapsulation de cellules. Ces matériaux incluent entre autres, l'acide hyaluronique (HA), le chitosane, l'alginate, le collagène, la matrice extracellulaire décellularisée (dECM), la gélatine et la forme méthacrylée de la gélatine, gélatine méthacrylate (GelMA) (Jafari et al., 2022; F. Liu et al., 2018; M. Qasim et al., 2019; Theus et al., 2019).

1.5.3 Matrice extracellulaire décellularisée

La matrice extracellulaire (ECM), est un mélange de différents polymères et peut être obtenue par décellularisation par des processus, chimiques, physiques ou mécaniques (F. Liu et al., 2018). L'ECM est retrouvée dans différents tissus, tel le tissu cardiaque, la peau, les intestins, etc. (Gungor-Ozkerim et al., 2018; F. Liu et al., 2018). L'avantage principal de l'utilisation d'un tel matériau est que puisqu'il est directement dérivé du tissu natif, il en possède alors des propriétés très similaires (F. Liu et al., 2018; Theus et al., 2019). Dans le cas de l'ECM décellularisée cardiaque, il a été montré que son utilisation peut même améliorer la différenciation de cellules progéniteurs cardiaques (CPCs) (Bejleri et al., 2018; French et al., 2012; Gaetani et al., 2016). Ainsi, Bejleri et al. ont développé une encre majoritairement composée de matrice extracellulaire cardiaque (cECM) afin d'encapsuler des cellules progéniteur cardiaques humaines (hCPCs) (Bejleri et al., 2018).

1.5.3.1 Collagène

Le collagène est une des protéines retrouvées dans l'ECM et y joue un rôle de stabilité mécanique et d'organisation cellulaire, ce qui en fait un matériel biocompatible idéal pour la biofabrication de structures mimétiques (Jafari et al., 2022; A. Lee et al., 2019; Theus et al., 2019). Or, l'impression directe de collagène peut être difficile puisqu'il possède une viscosité faible et se dégrade rapidement (Jafari et al., 2022; F. Liu et al., 2018). De plus, le collagène possède des propriétés mécaniques faibles, ce qui force l'utilisation d'une concentration élevée pour les impressions (Alonzo et al., 2019; A. Lee et al., 2019; Osidak, Kozhukhov, Osidak, & Domogatsky, 2020). Or, en développant une méthode d'impression à l'intérieur d'un bain permettant au matériel de conserver sa forme post impression, Lee, A. et al, ont pu imprimer une encre de collagène avec succès (A. Lee et al., 2019). En effet, en utilisant une méthode nommée FRESH (*freeform reversible embedding of suspended hydrogels*), les auteurs ont imprimé, dans un bain de gélatine, une forte densité de collagène avec des cellules C2C12 encapsulées. Cette technique d'impression FRESH est caractérisée par l'impression d'un matériau dans une suspension viscoplastique qui permet de conserver la forme du filament lorsqu'il est extrudé dans la suspension, qui est ensuite dissoute (A. Lee et al., 2019; Ning et al., 2020). Cette méthode a permis à Lee. et al. d'imprimer des filaments creux de collagène afin de former un système vasculaire (A. Lee et al., 2019).

1.5.3.2 Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide biodégradable et biocompatible qui peut être obtenu à partir de l'hydrolyse de la chitine, retrouvée dans la coquille des crustacés (Jafari et al., 2022; F. Liu et al., 2018). Or, dû à ses faibles propriétés mécaniques, le chitosane est utilisé pour l'impression 3D principalement lorsqu'il est mélangé avec d'autres matériaux (Jafari et al., 2022). Par exemple, Adhikari et al. ont utilisé une combinaison d'alginate et de chitosane supplémenté avec de l'hydroxyapatite pour développer une encre utilisable pour l'impression 3D de tissus (Adhikari, Perwez, Das, & Saha, 2021). De plus, le

chitosane a pu être utilisé sous sa forme méthacrylée (ChMA) (Osi et al., 2021). Dans ce cas, le chitosane a été fonctionnalisé avec des groupements méthacrylates pour former du chitosane méthacrylate (ChMA) et a été combiné avec du GelMA et de l'hydroxyapatite pour former une encre (Osi et al., 2021). GelMA a été ajouté à cette encre pour favoriser une gélification rapide et réguler la viscosité alors que l'hydroxyapatite a été ajouté pour améliorer les propriétés mécaniques (Osi et al., 2021)

1.5.3.3 Alginate

L'alginate est un polymère naturel dérivé des algues (Alonzo et al., 2019; F. Liu et al., 2018). L'avantage de l'utilisation de l'alginate en bioimpression 3D est qu'il s'agit d'un matériau biocompatible qui peut être réticulé rapidement par la présence de CaCl_2 et peut être utilisé pour l'encapsulation d'une forte densité de cellules (F. Liu et al., 2018; W. Liu et al., 2018; Theus et al., 2019; You, Wu, Kelly, & Chen, 2020). Or, une des limites de l'utilisation de l'alginate est sa faible performance biologique due à l'absence de ligands nécessaires à l'adhésion cellulaire (Alonzo et al., 2019; Shao et al., 2020; You et al., 2020). Or, l'alginate peut être modifié en incluant des groupements favorisant l'adhésion cellulaire ou il peut être mélangé avec d'autres matériaux bioactifs (Alonzo et al., 2019). Par exemple, You. et al. ont développé une bioencre faite à partir d'alginate et de gélatine (You et al., 2020). Ils ont effectué une oxydation partielle de l'alginate pour former de l'alginate dialdéhyde (ADA) afin d'améliorer la biodégradabilité de l'alginate et ont ajouté de la gélatine pour l'amélioration des propriétés d'adhésion cellulaire (You et al., 2020). Ils ont ainsi pu bioimprimer des patches cardiaques en optimisant la formulation de bioencre à 10 % comme degré d'oxydation de l'alginate avec un ratio de bioencre de ADA70-GEL30 (You et al., 2020).

1.5.3.4 Gélatine

La gélatine est une protéine naturelle soluble dans l'eau qui peut être extraite du collagène de plusieurs sources animales (Alonzo et al., 2019). Ce matériau a été utilisé en bioimpression 3D puisqu'il est biocompatible, non-immunogénique, biodégradable et possède la capacité de former un hydrogel thermoréversible par gélification lorsqu'une température critique entre 20 °C et 30 °C est atteinte (Jafari et al., 2022; F. Liu et al., 2018; X. Wang et al., 2017).

1.5.3.5 GelMA

Un autre matériel prometteur pour la bioimpression 3D est la gélatine méthacrylate (GelMA). Il est possible de synthétiser ce matériau semi-synthétique à partir de la gélatine (Koti, Muselimyan, Mirdamadi, Asfour, & Sarvazyan, 2019; S. Lee et al., 2020). Ainsi GelMA conserve alors des propriétés similaires à la gélatine une fois synthétisé (Koti et al., 2019; S. Lee et al., 2020). Lors de la synthèse de GelMA, des groupements de méthacryloyl sont substitués à certains amines et groupements hydroxyles de la gélatine ce qui donne au GelMA le caractère d'être photoréticulable, induisant ainsi la formation de liaisons covalentes suite à l'exposition à l'UV (Koti et al., 2019; S. Lee et al., 2020; Yin et al., 2018; Yue et al., 2015). Or, puisqu'il conserve les propriétés de la gélatine, GelMA reste un matériau idéal pour fournir un bon environnement cellulaire et conserve ses propriétés de thermo sensibilité (Jafari et al., 2022; S. Lee et al., 2020).

Afin de permettre la photo réticulation de GelMA, plusieurs différents photoinitiateurs peuvent être utilisés, tel l'Irgacure 2959 et le LAP (lithium phenyl-2,4,6-triméthylbenzoylphosphinate) (S. Lee et al., 2020; Xu, Casillas, Krishnamoorthy, & Xu, 2020). Or, l'avantage du LAP par rapport à l'Irgacure 2959 est qu'il s'agit d'un agent qui réagit à une lumière de longueur d'onde de 405 nm, qui se trouve dans le spectre de lumière visible. Ainsi, en utilisant cet agent, il est possible de limiter davantage les effets

cytotoxiques entraînés par le processus de photo réticulation (S. Lee et al., 2020; Sun et al., 2021; Xu et al., 2020).

1.6 Critères généraux pour la bioimpression 3D de tissus

La méthode la plus commune d'impression 3D pour les hydrogels étant l'impression par extrusion, cette section se concentrera sur les critères généraux nécessaires à la bioimpression par extrusion de structures adéquates en génie tissulaire. Ceux-ci incluent, entre autres, les propriétés rhéologiques de l'encre (ou bioencre), les paramètres généraux d'impression et les propriétés mécaniques finales des structures imprimées.

1.6.1 Propriétés rhéologiques

Au niveau des paramètres rhéologiques, le premier paramètre à considérer est la viscosité. La viscosité d'un liquide constitue en sa résistance à l'écoulement lorsqu'une force γ est appliquée (Cooke & Rosenzweig, 2021; X. Cui et al., 2020; Schwab et al., 2020). Les liquides peuvent avoir un comportement Newtonien ou non-Newtonien, Pour les comportements non-Newtoniens, lors de l'application d'une force, la relation entre la contrainte de cisaillement et le taux de cisaillement est non-linéaire (Cooke & Rosenzweig, 2021; Schwab et al., 2020). Puisque l'impression 3D, consiste en une déposition de fluides visqueux, certaines propriétés rhéologiques sont importantes à considérer afin de déterminer si un matériau est imprimable ou non (Schwab et al., 2020). Dans le cas d'un matériau qui doit être utilisé en tant qu'encre à impression 3D, nous sommes à la recherche d'un matériau non-Newtonien ayant un comportement rhéofluidifiant, c'est-à-dire, que la viscosité diminue avec l'application d'un certain taux de cisaillement (Cooke & Rosenzweig, 2021; Ning et al., 2020). Ainsi, ce comportement permet de minimiser les dommages aux cellules lors de l'impression et permet une bonne déposition de filaments (X. Cui et al., 2020; S. C. Lee et al., 2020).

De plus, une viscosité suffisamment élevée est favorisée en bioimpression 3D par extrusion, puisque cela permet d'éviter la formation de gouttelettes et permet d'obtenir des filaments ayant une bonne fidélité de forme (X. Cui et al., 2020; S. C. Lee et al., 2020). La viscosité peut être contrôlée entre autres par la concentration de polymère dans l'encre, la masse moléculaire et la température (X. Cui et al., 2020). Ainsi, il est possible d'ajuster la bioencre pour améliorer le processus d'impression (X. Cui et al., 2020; S. C. Lee et al., 2020; Rider et al., 2018).

D'autres paramètres rhéologiques affectant l'imprimabilité incluent la viscoélasticité (l'élasticité) et la contrainte seuil (*yield stress*) (Schwab et al., 2020). La contrainte seuil est la contrainte nécessaire à appliquer sur l'encre afin qu'il y ait écoulement, elle va également affecter la fidélité de la forme finale de même que sa rétention (Schwab et al., 2020; C. Zhang, Wang, Therriault, & Heuzey, 2022). L'élasticité, qui peut être représentée par le module élastique (G'), est la quantité d'énergie élastique emmagasinée dans l'encre lors de l'impression, et se traduit par une meilleure rétention de forme (Schwab et al., 2020). Cette rétention de forme élastique est indicative de la capacité des filaments à être empilés en plusieurs couches sur la surface d'impression (Cooke & Rosenzweig, 2021). L'ensemble des paramètres rhéologiques à considérer sont présentés à la figure 5.

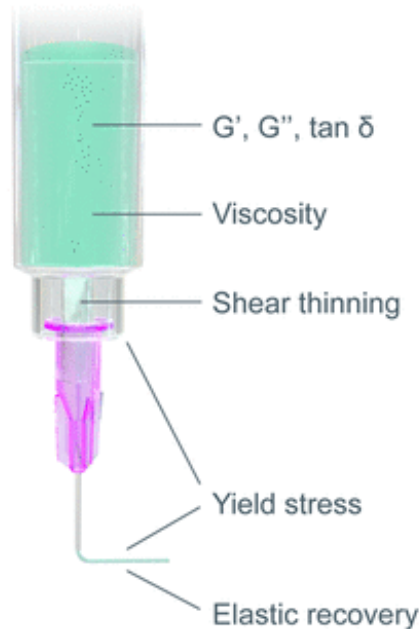


Figure 5. Paramètres rhéologiques à considérer lors de l'impression 3D d'encre. Reproduit de « Printability and shape fidelity of bioinks in 3D bioprinting », par A. Schwab, 2020, *Chemical reviews*, 120(19), fig. [3]. (<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00084>). Copyright © 2020 American Chemical Society. Licence CC-BY-NC-ND.

1.6.2 Paramètres d'impression

Au niveau des paramètres d'impression à considérer, le premier critère recherché est la capacité de l'encre à être extrudée de l'aiguille et former des filaments continus. Le second critère est d'être en mesure de conserver cette forme après la déposition, soit la fidélité de forme (S. C. Lee et al., 2020). Or lorsqu'il est question de bioimpression 3D, il est important d'avoir une encre imprimable tout en considérant que les paramètres d'impression pourront avoir un effet sur la viabilité cellulaire. Ainsi, il est important d'optimiser les paramètres d'impression afin de réduire la contrainte de cisaillement auquel les cellules seront exposées lors du processus. Cela peut être contrôlé par le diamètre de l'aiguille utilisée, la température d'impression et la pression d'extrusion. Dans le cas des encres photo réticulables, le temps d'exposition à la lumière aura également un effet

(Cooke & Rosenzweig, 2021; Koti et al., 2019; Rider et al., 2018; Yin et al., 2018). D'une tendance générale, afin d'imprimer des matériaux plus visqueux, une plus forte pression est nécessaire et la pression utilisée ainsi que le diamètre de l'aiguille vont influencer sur le diamètre des filaments des structures obtenues (Birla & Williams, 2020). De plus, une réticulation rapide post-impression permettra d'améliorer la fidélité de forme (S. C. Lee et al., 2020)

1.6.3 Propriétés mécaniques de la structure

De plus, afin d'éviter des problèmes d'intégration avec le tissu natif, il faut s'assurer que les propriétés mécaniques de la structure imprimée soit similaire à celles du tissu visé (Bejleri et al., 2018; S. C. Lee et al., 2020). Ainsi, pour le tissu cardiaque du myocarde, le module de Young visé varie selon la littérature, or les valeurs rapportées vont de 5 à 50 kPa (Bejleri et al., 2018; Mousavi et al., 2022; Reis, Chiu, Feric, Fu, & Radisic, 2016).

1.7 Impression 3D de tissus

Avec les diverses méthodes d'impression et de bioimpression 3D et les différents matériaux utilisés en tant qu'encre, plusieurs travaux ont pu être réalisés pour appliquer ces concepts à l'impression de tissus cardiaques. Les auteurs se sont concentrés sur différents aspects tels l'amélioration d'encres ou de processus d'impression. Cette section présente donc certains travaux réalisés récemment.

Ainsi, Koti et al. plutôt que de se concentrer directement sur l'impression d'une structure pouvant remplacer le tissu cardiaque, ont préféré étudier l'effet de la bioimpression 3D sur les fibroblastes (CFs) et myocytes cardiaques (CMs) (Koti et al., 2019). Ils ont encapsulés ces deux types de cellules dans des encres de concentration différentes de GelMA et ont évalué l'effet de la bioimpression des bioencres refroidies à 20 °C sur la viabilité cellulaire (Koti et al., 2019). Ils ont ainsi pu montrer que, de manière

générale, les cardiomyocytes étaient plus sensibles en termes de viabilité aux paramètres d'impression que les fibroblastes cardiaques. Également, ils ont étudié l'effet de la durée d'exposition à la photo réticulation sur la viabilité en conservant la concentration de LAP à 0,5 %. Seuls les temps prolongés d'exposition à l'UV, de plus de 300 s, ont montré des effets adverses présents pour les deux types de cellules. Ils ont finalement montré que le mélange de populations de CMs et CFs lors de l'impression améliore la viabilité cellulaire et l'étalement des cellules (Koti et al., 2019).

Bejleri et al. se sont concentrés sur le développement d'un patch cardiaque personnalisable composé de matrice extracellulaire cardiaque (cECM) avec des cellules CPCs encapsulées pour des patients pédiatriques. Ils ont alors utilisé une encre majoritairement composée de cECM (8 mg/mL), avec l'ajout de 5 % GelMA, utilisée afin d'améliorer l'imprimabilité et les propriétés mécaniques de leur encre. Ils ont pu obtenir un patch cardiaque imprimé de manière homogène avec une viabilité cellulaire supérieure à 75 %. Ils ont finalement pu implanter ce patch sur des rats et observer la présence d'un système vasculaire après 14 jours de culture *in vivo* (Bejleri et al., 2018).

Certains auteurs se sont concentrés sur le développement de nouvelles bioencres pouvant potentiellement être utilisées pour l'impression de tissus vascularisés. Ainsi, Lee et al. se sont concentrés sur la combinaison de la tropoélastine recombinante (MeTro) et de GelMA afin d'imprimer des tissus mous (S. Lee et al., 2020). Pour cette encre, GelMA est utilisé pour fournir un environnement approprié pour les cellules alors que MeTro est utilisé pour améliorer l'élasticité des structures imprimées (S. Lee et al., 2020). En utilisant cette bioencre de GelMA-MeTro, les auteurs ont pu imprimer par méthode FRESH des structures cardiaques vascularisées qui montrent une fonction de battement des CMs et une fonction de barrière endothéliale. La figure 6 présente la structure bioimprimée dans un bain FRESH par Lee et al. Dans cette structure une bioencre de GelMA pure encapsulant des CMs, des fibroblastes cardiaques et des *Human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) et une bioencre de Metro-GelMA renfermant des HUVECs, ont été utilisées afin de répliquer respectivement le tissu cardiaque et les vaisseaux sanguins (S. Lee et al., 2020).

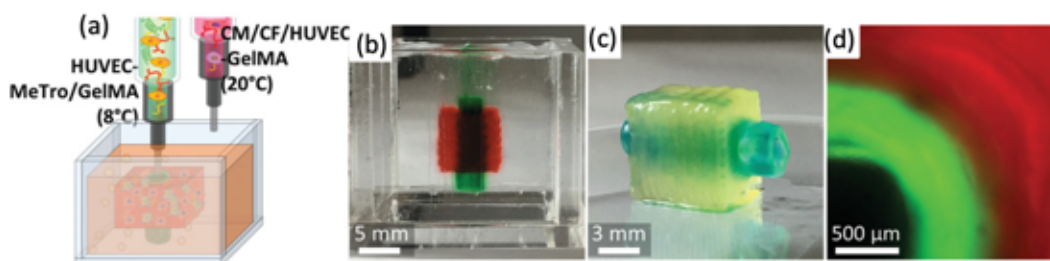


Figure 6. Bioimpression de structure vascularisée dans un bain FRESH. (a) représentation schématique de la bioimpression. (b)-(d) Images de la structure bioimprimée. Tiré de « Human-recombinant-Elastin-based bioinks for 3D bioprinting of vascularized soft tissues », par S. Lee, 2020, *Advanced Materials*, 32(45), fig. [3]. (<https://doi.org/10.1002/adma.202003915>). Adapté avec permission de John Wiley and Sons. Copyright 2020.

Ning et al. ont choisi d'utiliser GelMA seul comme encre et d'effectuer une impression de type FRESH à l'aide d'un bain de Carbopol afin d'améliorer la fidélité de forme des structures imprimées (Ning et al., 2020). Ils se sont penchés sur l'optimisation des paramètres d'impression de GelMA afin de réaliser des structures possédant une fidélité d'impression optimale. Pour ce faire, ils ont comparé l'impression de 5 % et 10 % GelMA dans l'air avec l'impression de 5 % et 10 % GelMA dans un bain de Carbopol dont la concentration variait (Ning et al., 2020). Ainsi, en testant plusieurs paramètres, ils ont été en mesure d'utiliser un bain de Carbopol à 0,4 % pour imprimer GelMA 5 % et 10 % avec une fidélité de forme améliorée comparativement aux structures imprimées dans l'air, tout en conservant une viabilité cellulaire de HUVECs supérieure à 78 %. De plus ils ont été en mesure d'imprimer directement dans le bain, sans matériel sacrificiel, des structures renfermant un canal ouvert de 1,24 mm de diamètre (Ning et al., 2020).

Yin et al. se sont concentrés sur le mélange de 5 % GelMA et de gélatine pour imprimer des structures pouvant être utilisées pour les tissus mous (Yin et al., 2018). En combinant GelMA et la gélatine comme encre, Yin et al. prennent avantage de l'augmentation de viscosité que fournit la gélatine ainsi que de sa propriété d'être thermosensible, fournissant un second processus de réticulation réversible très rapide (Yin et al., 2018). Ainsi, la technique utilisée par les auteurs de cet article se fait en deux temps.

Tout d'abord, une encre de GelMA 5 % et gélatine 8 % est imprimée à l'aide d'une tête d'impression refroidie sur une surface également refroidie, en dessous du point de gélification de l'encre, permettant la réticulation thermique réversible des filaments. Par la suite, la structure est photo réticulée, de manière irréversible. Finalement, la structure est incubée à une température supérieure au point de gélification de l'encre, ce qui permet de dissoudre la gélatine, alors que les liens irréversibles restent stable et la structure finale est finalement composée de GelMA 5 % (Yin et al., 2018). D'une telle manière, la première étape, en incluant une réticulation thermique réversible, permet le maintien de la forme des filaments déposés, ce qui est insuffisant lors de l'impression seule de GelMA 5 %. Ainsi, en encapsulant des cellules souches de moelle épinière à l'intérieure de leur encre, les auteurs ont été en mesure d'obtenir des structures de GelMA 5 % avec une viabilité plus élevée que 90 % (Yin et al., 2018). La figure 7 présente l'impression de structures à base de GelMA/gélatine utilisant le principe de double réticulation thermique et lumineuse.

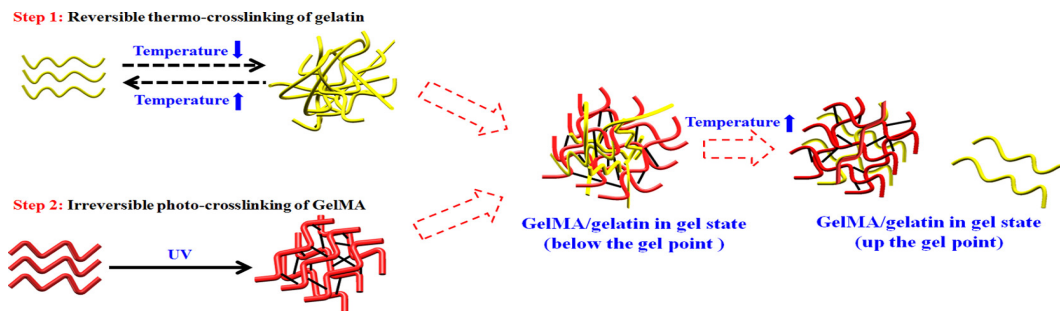


Figure 7. Impression 3D de structures à l'aide d'une encre à base de GelMA/gélatine prenant avantage d'une méthode de double réticulation. Tiré de « 3D bioprinting of low-concentration cell-laden gelatin methacrylate (GelMA) bioinks with a two-step cross-linking strategy », par J. Yin, 2018, *ACS Applied Material & Interfaces*, 10(08), fig. [2]. (<https://doi.org/10.1021/acsami.7b16059>). Reproduit avec permission de American Chemical Society. Copyright 2018.

Dans le cas de Ouyang et al, les auteurs se sont concentrés sur l'amélioration de bioencres déjà existantes (Ouyang et al., 2020). En effet, certains matériaux, tels l'acide hyaluronique méthacrylate (HAMA) et GelMA sont communément utilisés en ingénierie tissulaire. Or, avec des faibles concentrations, ils sont peu imprimables. Ainsi, Ouyang et al. ont ajouté de la gélatine afin de former des encres pouvant être imprimées. Ils ont

méthacrylé 12 différents matériaux et ont caractérisé l'utilisation de ces matériaux avec et sans un ajout de 5 % de gélatine afin de vérifier leur imprimabilité. Dans le cas de GelMA (2,5 % et 5 %), la combinaison de GelMA-gélatine a été imprimable en structure d'un cm d'épaisseur et ayant des meilleures propriétés mécaniques que GelMA seul. Or, il est à noter que suite au retrait de la gélatine, après 24 heures d'incubation, les propriétés mécaniques de la structure redevenait similaire à celles obtenues avec le GelMA pur (Ouyang et al., 2020).

1.8 Développement de systèmes vasculaires

Suite à la section précédente, il est possible de remarquer que plusieurs travaux récents portent sur l'impression 3D de tissus. Or, ces travaux ne prennent pas en considération une problématique importante liée à l'impression et la bioimpression 3D de tissus épais. En effet, lorsque les structures bioimprimées dépassent une certaine épaisseur, il devient plus difficile pour les cellules encapsulées au centre des structures de rester viables. Cela est dû au fait qu'il y a un manque d'approvisionnement en oxygène et en nutriments (Shao et al., 2020; Y. S. Zhang et al., 2016). En effet, il faut tenir compte que la limite de diffusion de l'oxygène dans les tissus est de 100 à 200 μm , et dans ce cas, il faut que les cellules aient accès à un réseau vasculaire (Kim, Hou, & Huang, 2016; Shao et al., 2020). De plus, l'absence de réseau vasculaire à l'intérieur de structures épaisses bioimprimées peut résulter en une mauvaise intégration cellulaire dans les tissus (Shao et al., 2020). Afin de s'assurer que le tissu imprimé reste viable et maintient sa fonction, il est nécessaire d'y inclure un réseau micro vasculaire pour préserver une alimentation en oxygène et en nutriments à l'intérieur des structures. Ainsi, certains auteurs se sont tournés vers le développement de tissus bioimprimés renfermant un système vasculaire afin d'éviter la présence de régions nécrotiques dans les tissus épais (Jia et al., 2016).

Afin de développer ces nouvelles structures avec un système vasculaire, il est nécessaire de comprendre la méthode de création de nouveaux vaisseaux ainsi que différentes techniques qui peuvent être utilisées pour entraîner la vascularisation de

structures fabriquées. La prochaine section présente ainsi brièvement le processus de vascularisation ainsi que quelques méthodes de vascularisation.

1.8.1 Formation de vaisseaux

La formation de nouveaux vaisseaux est guidée par plusieurs mécanismes, incluant deux processus davantage étudiés: l'angiogenèse et la vasculogenèse (Barrs, Jia, Silver, Yost, & Mei, 2020; Joshi, Choudhury, Gugulothu, Visweswariah, & Chatterjee, 2022). Initialement, la vasculogenèse est un processus présent dans le développement embryonnaire. Or, il est également présent chez les adultes, où il intervient au niveau de la prolifération et de la migration de cellules endothéliales (ECs) progénitrices de la moelle osseuse vers des sites ischémiques pour former des vaisseaux et des capillaires (Barrs et al., 2020; Joshi et al., 2022).

L'angiogenèse consiste plutôt en la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux existants (Barrs et al., 2020). Un des processus principaux qui guident l'angiogenèse est l'angiogenèse par germination (*sprouting angiogenesis*) (Barrs et al., 2020; Joshi et al., 2022). Lors de l'angiogenèse par germination, des facteurs de croissance pro-angiogéniques, tels le facteur de croissance de l'endothélium (VEGF), l'angiopoïétine-2 (Ang2) et les facteurs de croissance de fibroblastes (FGF), entraînent l'activation du gène pro angiogénique dans les vaisseaux quiescents. Cela entraîne le détachement des péricytes des vaisseaux et la libération des jonctions cellule-cellule pour faciliter la germination à partir du mur du vaisseau. Ensuite, un sous-type de ECs, les cellules *tips*, migrent au mur du vaisseau pour établir le chemin nécessaire à la germination de nouveaux vaisseaux. Ces cellules *tip* pénètrent ensuite l'ECM qui a été remodelé et les péricytes guident la stabilisation et l'intégrité du nouveau vaisseau formé (Barrs et al., 2020; Carmeliet & Jain, 2011). Ces différentes stratégies sont résumées à la figure 8

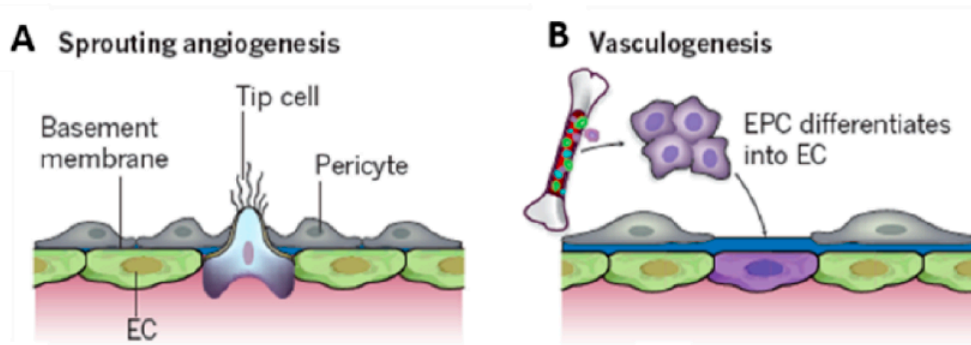


Figure 8. Schématisation des méthodes de vascularisation par (A) angiogénèse par germination et (B) vasculogénèse. Tiré de « Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis », par P. Carmeliet et al., 2011, Nature, 473, fig. [1]. (<https://doi.org/10.1038/nature10144>). Reproduit avec permission. Copyright 2011.

1.8.2 Méthodes de vascularisation de tissus fabriqués

Certaines méthodes d'impression 3D permettent de recréer des architectures complexes de manière contrôlable, incluant des réseaux vasculaires et des réseaux perfusables. Elles comprennent la méthode par impression 3D coaxiale, par impression 3D FRESH et par l'impression 3D sacrificielle (Joshi et al., 2022; Savojo et al., 2020). Or, afin d'inclure un système vasculaire complet *in vitro*, ces méthodes d'impression 3D peuvent être couplées avec des modes de stimulation de la croissance de vaisseaux par angiogénèse ou vasculogénèse. Cela peut se faire, entre autres, par l'utilisation de facteurs pro-angiogéniques et par une pré-vascularisation *in vitro* avec la co-culture de cellules endothéliales (ECs) et de cellules du tissu ciblé (Joshi et al., 2022; Kim et al., 2016).

1.8.2.1 Facteurs pro-angiogéniques

L'utilisation de facteurs pro angiogéniques inclut l'utilisation de facteurs de croissance (tels le VEGF, etc.) ajoutés aux structures pour permettre la stimulation de la croissance de vaisseaux soit par le relâchement direct de facteurs, par la stimulation de cellules migratoires qui sécrètent des facteurs qui promeuvent l'angiogénèse ou par l'utilisation de bioencres pro-angiogéniques (Joshi et al., 2022). Ainsi, par l'ajout localisé

de ces molécules, il est possible de contrôler spatialement les endroits de la structure qui favoriseront l'angiogenèse et la vasculogenèse. Or, l'immobilisation de facteurs peut résulter en l'induction de comportement cellulaires indésirables (Kim et al., 2016).

1.8.2.2 Pré-vascularisation *in vitro* avec la co-culture de cellules endothéliales (ECs)

Une méthode plus souvent utilisée est plutôt le développement de la vascularisation des structures par co-culture de cellules musculaires du tissu avec différents types de ECs, tels les HUVECs. Cette méthode a été en mesure de démontrer qu'elle permet d'établir un système pré-vasculaire plus mature *in vitro* (Joshi et al., 2022; Kim et al., 2016; Puluca et al., 2019).

À l'aide de l'impression 3D, il est possible de développer un système vasculaire par l'impression de canaux à l'intérieur de la structure. Cette technique de génération de canaux est basée sur l'impression de matériaux sacrificiels qui, une fois dissouts, permettent de former une architecture connectée dans la structure imprimée. Les canaux servent alors de guide pour le remodelage de la vascularisation (Joshi et al., 2022; Kim et al., 2016). Ainsi, il est possible d'imprimer directement des canaux remplis d'ECs et d'autres cellules pour qu'ils se développent en système vasculaire complet par angiogenèse ou vasculogenèse (Joshi et al., 2022; Noor et al., 2019). Un exemple de l'utilisation de cette méthode est présenté à la figure 9.

Une autre manière de réaliser la co-culture de cellules ECs avec l'impression 3D est par l'utilisation de l'impression coaxiale, définie plus loin à la section 1.9, qui permet l'encapsulation de cellules spécifiques au tissu développé sur la couche externe avec des ECs sur la couche interne de la structure. Ainsi, les ECs se retrouvent directement sur la paroi interne des vaisseaux imprimés et induisent le développement du système vasculaire de la structure imprimée (Joshi et al., 2022). La figure 11 présente un exemple d'impression coaxiale avec des ECs.

Ainsi, de manière générale, avec différentes méthodes d'impression 3D, il est possible de générer des structures possédant de larges canaux, permettant la création de vaisseaux perfusables qui peuvent être connectés chirurgicalement aux patients (Richards, Jia, Yost, Markwald, & Mei, 2017). Ces larges canaux servent de canaux de délivrance de nutriments et le système microvasculaire peut être ensuite développé par l'utilisation d'encres bioactives qui induisent la vasculogénèse pour former des capillaires (Richards et al., 2017). En effet les canaux perfusables à l'intérieur de structures servent de précurseurs pour la vascularisation complète des structures. Or, pour l'impression de structures renfermant un système vasculaire de canaux de petite taille, tels les capillaires (5-10 μm), la méthode d'impression de canaux perfusables n'est pas suffisante et il est nécessaire de se baser sur la vasculogénèse et l'angiogénèse (Barrs et al., 2020).

1.8.2.3 Critères et défis

Pour l'impression 3D générale de structures vascularisées, les mêmes critères que ceux de l'impression 3D standard (section 1.6) sont à prendre en compte. Or, afin de déterminer s'il y a présence d'un système vasculaire complet ou d'un système perfusable, il est possible d'utiliser plusieurs critères. Ceux-ci incluent que le diamètre des vaisseaux soit autour ou plus petit que 500 μm et que les micro vaisseaux permettent de conduire des fluides avec ou sans revêtement de ECs. De plus, les canaux de ECs sans lumière peuvent être inclus puisqu'ils peuvent précéder à la formation de canaux post-implantation (Barrs et al., 2020).

Or, il est tout de même considéré difficile d'inclure un système vasculaire complet, incluant la vasculogénèse et angiogénèse à travers des structures fabriquées denses. Certains facteurs limitants incluent la densité cellulaire, la co-culture de CMs et de cellules vasculaires et la connexion avec le système vasculaire de l'hôte post implantation (Pulcu et al., 2019; Vunjak-Novakovic et al., 2010). D'autres défis à relever incluent l'obtention d'une architecture de tissu finale inadéquate et l'incapacité de répliquer le débit sanguin réel *in vitro* (Kim et al., 2016).

Ainsi, l'introduction d'un système perfusable dans une structure fabriquée peut s'avérer avantageuse pour la délivrance d'oxygène et de nutriments. Or, afin de s'assurer d'une meilleure intégration avec l'hôte et du développement de vaisseaux de petites tailles, tels les capillaires, il est essentiel de compléter le processus de vascularisation des tissus. En effet, la perfusion à elle seule ne peut pas remédier complètement à la vascularisation pour le transport de nutriments et d'oxygène (Vunjak-Novakovic et al., 2010). Pour ce faire, suivant l'obtention d'une structure perfusable, les techniques présentées précédemment pour induire une vasculogénèse et angiogénèse dans les structures imprimées peuvent être utilisés.

1.9 Méthodes d'impression 3D de système vasculaire

Cette section se concentre sur la présentation de certains travaux récents visant à reproduire des systèmes perfusable et/ou vascularisés de tissus imprimés en 3D. Deux principales méthodes sont utilisées : la méthode multi matériel et la méthode d'impression coaxiale.

1.9.1 Multi matériel

Une des méthodes utilisées pour la bioimpression 3D d'un système macro vasculaire est l'impression multi-matériel, qui consiste en l'utilisation de plusieurs encres dispensées par de multiples têtes d'impressions, incluant une encre sacrificielle. Cette méthode a été utilisée par Noor et al. (Noor et al., 2019). Pour ce faire, ils ont utilisé du tissu autologue, du tissu propre au même patient, en prélevant le tissu de l'omentum (OM), tissu situé près des viscères, d'un patient et en le séparant en deux parties : une suspension de cellules afin de les reprogrammer en tant que cellules pluripotentes, et le dECM du patient afin qu'elle serve d'encre. Les auteurs se sont donc servi de ces matériaux afin de s'assurer d'une compatibilité spécifique avec le patient pour l'impression et l'implantation d'un patch cardiaque épais vascularisé (Noor et al., 2019). Ainsi, ils ont développé deux bioencres à utiliser ensemble : la première étant des CMs encapsulés dans le tissu omentum

et la seconde étant des fibroblastes (ou ECs) encapsulés dans de la gélatine 10 % pour être utilisée en tant que bioencres sacrificielle. Ils ont ainsi pu imprimer par extrusion un tissu de 2 mm d'épaisseur, viable et possédant un système macro vasculaire de 300 μm de diamètre une fois la gélatine liquéfiée et retirée (Noor et al., 2019). La figure 9 présente le processus général de bioimpression multi-matériel en utilisant du tissu biologique autologue.

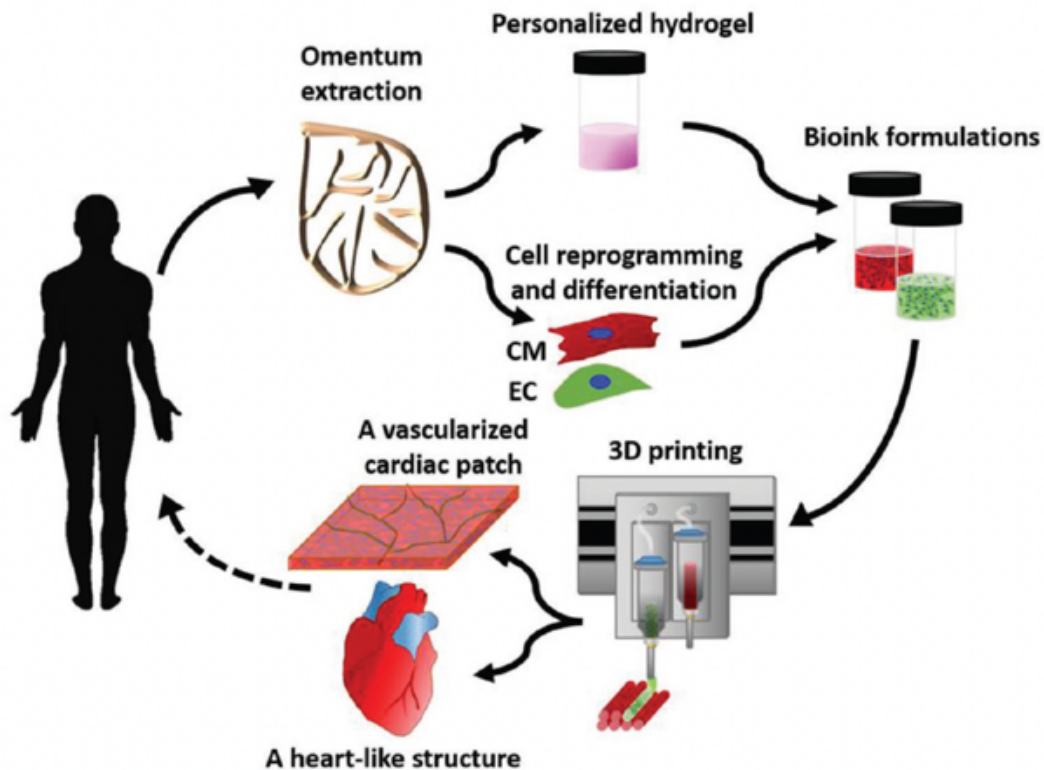


Figure 9. Bioimpression 3D à partir de tissu autologue à l'aide d'une méthode d'impression multi matériel. Reproduit de «3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts », par N. Noor, 2019, *Advanced science*, 6(11), fig. [1]. (<https://doi.org/10.1002/advs.201900344>). Licence CC BY.

1.9.2 Bioimpression coaxiale

Une autre méthode plus récente utilisée dans l'impression 3D de réseau vasculaire est l'utilisation d'un système possédant une aiguille coaxiale. C'est-à-dire, une aiguille reliant deux circuits de filaments, un servant de filament interne et le second, de filament externe.

Liu et al. se sont concentrés sur la bioimpression de GelMA et d'alginate utilisés comme matériaux pour l'impression de filaments respectivement interne et externe à des très faibles concentrations de GelMA à l'aide d'une aiguille coaxiale personnalisée. Or, dans leur travail, ils ont également pu imprimer des filaments vides d'alginate. Pour ce faire, ils ont injecté une solution de CaCl₂ à 6 % dans le canal interne et une encre d'alginate à 1 % dans le canal externe, ce qui leur a permis d'obtenir des canaux vides (W. Liu et al., 2018). En modifiant les débits d'injection de l'encre et de la solution de CaCl₂, les dimensions des filaments ont pu varier de 469 µm à 723 µm. Suivant cette technique, une structure perfusable de 10 couches a pu être imprimée (W. Liu et al., 2018).

O'Connell et al. se sont plutôt penchés sur le problème d'impression de matériaux photo réticulables possédant une bonne fidélité de forme. Ils ont ainsi développé une méthode de photo réticulation *in situ* permettant de réticuler rapidement les filaments directement à leur sortie de l'aiguille d'impression, présenté à la figure 10. Ainsi, ils ont utilisés une seringue coaxiale personnalisée, incluant directement une LED à la sortie de la seringue, afin d'imprimer des structures (O'Connell et al., 2020). Ainsi, en combinant 2,5 % de HA et 3 % de gélatine à 10 % de GelMA, ils ont pu développer une encre imprimable à température pièce. Cette méthode leur permet d'utiliser leur encre de GelMA/HA/gélatine comme filament externe pour imprimer des structures ayant un noyau à faible viscosité. En utilisant du PBS comme encre interne, ils ont montré que sans l'utilisation de l'impression avec réticulation *in situ*, il y a l'affaissement des filaments. Alors que lors de l'utilisation d'une méthode d'impression avec réticulation *in situ*, les filaments sont empilables et ne s'affaissent pas, en conservant le PBS à l'intérieur des fibres. Ils ont démontré qu'il était possible d'imprimer des filaments avec noyaux peu visqueux ayant une viabilité cellulaire préliminaire de *human cell line SAOS02* encapsulées plus élevée que 80 %, ce qui n'aurait pas été possible si ces matériaux étaient utilisés avec une méthode de post-réticulation standard (O'Connell et al., 2020).

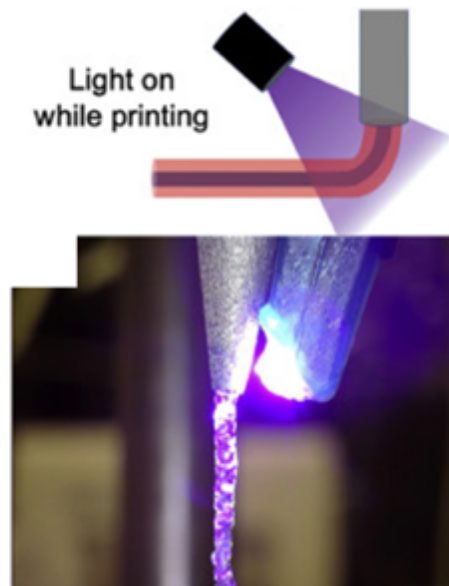


Figure 10. Impression coaxiale à l'aide d'un montage par réticulation in situ de GelMA, gélatine et acide hyaluronique comme encre externe et PBS coloré en bleu comme encre interne. Tiré de « Free-form co-axial bioprinting of a gelatin methacryloyl bio-ink by direct in situ photo-crosslinking during extrusion », par C.D. O'Connell, 2020, *Bioprinting*, 19, fig. [7]. (doi: <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00087>). Reproduit avec permission de Elsevier. Copyrights 2020.

Shao et al. se sont également basés sur la méthode de bioimpression coaxiale afin de générer directement des structures possédant des canaux vides (Shao et al., 2020). En effet, en utilisant une bioencre à base de 5 % GelMA comme filament externe et une bioencre de 5 % gélatine comme filament interne, ils ont été en mesure d'imprimer des structures de plus de 1 cm d'épaisseur possédant des canaux observables (Shao et al., 2020). Pour ce faire, ils ont pré-refroidi à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ degrés pendant 5 minutes les encres de GelMA (5 %) et de gélatine (5 %) afin d'augmenter la viscosité lors de l'impression, tout en imprimant sur une surface pré-refroidie à $2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Une fois, l'impression réalisée, la structure a été photo réticulée afin que la couche externe (GelMA) conserve sa forme, puis la structure a été incubée à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ afin de retirer la gélatine qui formait la couche interne et ainsi obtenir des canaux vides. Le processus général utilisé par les auteurs est présenté à la figure 11. Ils ont ainsi pu démontrer avec succès l'encapsulation de HUVECs, *human breast cell line* (MDA-MB-231) et *mouse osteoblast cell line* (MC3T3-E1) dans des encres à base de GelMA et de gélatine pour fabriquer des tissus épais ayant une viabilité cellulaire

élevée pour plus de 20 jours (Shao et al., 2020). Ils ont pu faire varier la taille des aiguilles et le débit d'injection lors de l'impression afin d'obtenir des structures de diamètres variant de 200 μm à 1000 μm . Or, malgré le fait qu'ils ont démontré qu'il n'y avait pas d'affaissement des canaux, dû à la faible concentration d'encre utilisée, les structures résultantes possédaient de faibles propriétés mécaniques, de 1 à 6 kPa (Shao et al., 2020). Ainsi, ce type de structure étant adéquat pour une application dans la récapitulation de tissus cancéreux et ostéogénique, n'est pas approprié pour le tissu cardiaque.

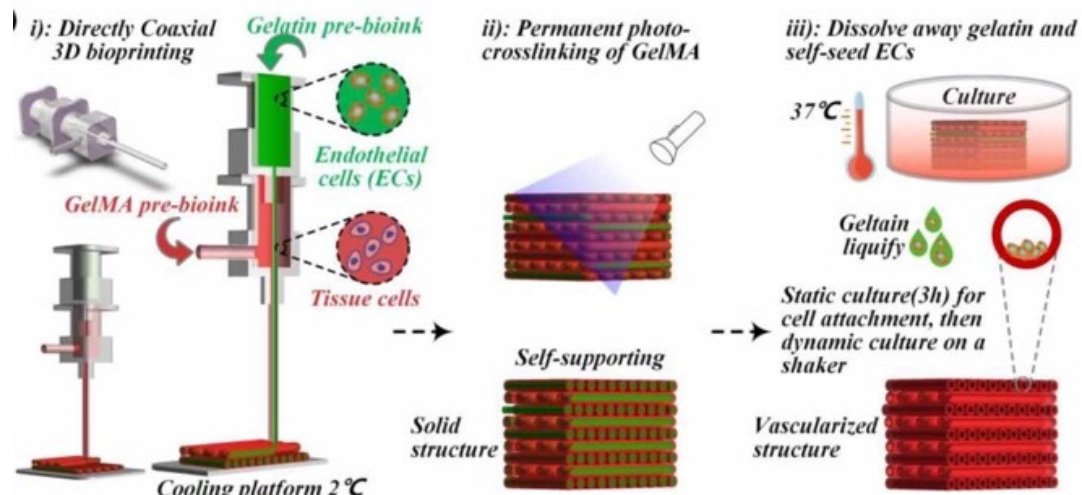


Figure 11. Schéma de bioimpression 3D coaxiale de structures creuses à l'aide d'encres à base de GelMA et gélatine. i) Bioimpression coaxiale de gélatine (vert) et de GelMA (rouge). ii) Photo réticulation des structures bioimprimées. iii) Dissolution de la gélatine des canaux internes. Adapté de « Directly coaxial 3D bioprinting of large-scale vascularized tissue constructs. Biofabrication », par L. Shao, 2020, *Biofabrication*, 12(3), fig. [2]. (Doi:10.1088/1758-5090/ab7e76). Reproduit de IOP Publishing Ltd.

Wang et al. ont suivi l'exemple de Shao et al. et se sont concentrés sur l'utilisation d'une encre avec un filament externe composée de GelMA 8 % et gélatine 8 % avec une encre pour filament interne en PVA (Y. Wang et al., 2019). Or, ils ont pris avantage du développement d'une aiguille capillaire en verre transparente en plus de réaliser l'impression directement dans un bain à basse température afin de réaliser une réticulation thermique et lumineuse très rapide des fibres. Le montage d'impression est présenté à la figure 12. Ainsi, en développant cette méthode d'impression, ils ont été en mesure de bioimprimer une bioencre mélangée avec des HUVECs et d'autres types de cellules

pouvant former des fibres creuses de 650 μm de diamètre avec une paroi de 125 μm d'épaisseur. Dans cet article, du PBS à 37 °C a été utilisé pour enlever le PVA et la gélatine (Y. Wang et al., 2019).

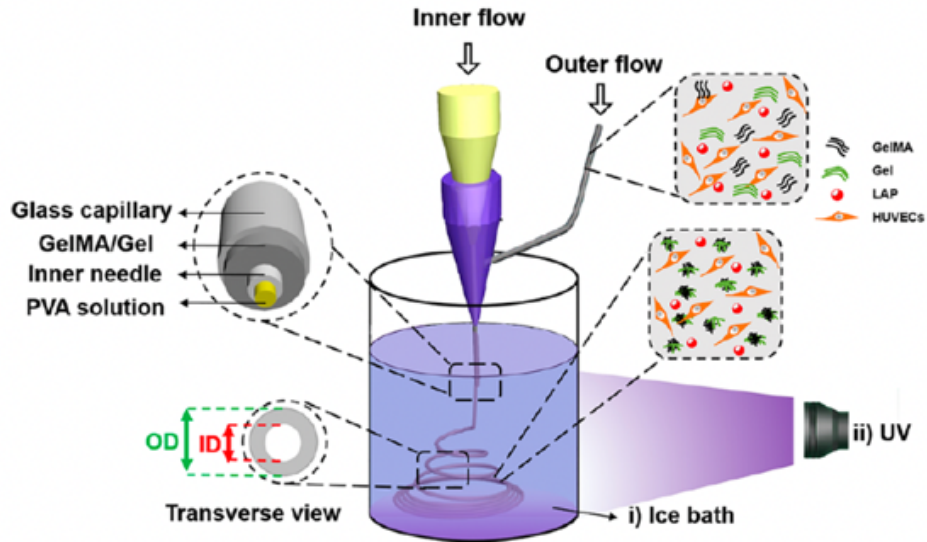


Figure 12. Bioimpression 3D de structures coaxiales avec réticulation thermique et lumineuse rapide post-impression. Tiré de « Coaxial Extrusion of Tubular Tissue Constructs Using a Gelatin/GelMA Blend Bioink », par Y. Wang, 2019, ACS Biomaterials Science & Engineering, 5(10), fig. [1]. (<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00926>). Reproduit avec permission de American Chemical Society. Copyright 2019.

De plus, Jia et al. ont plutôt mis leurs efforts dans le développement d'une stratégie pour imprimer en une étape du tissu vasculaire perfusable. Ainsi, ils ont utilisé une encre de GelMA, alginate et PEGTA (4-arm poly (ethylene glycol)-tetra-acrylate) en utilisant l'alginate comme matériel sacrificiel permettant d'améliorer l'imprimabilité et PEGTA comme matériel pour améliorer les propriétés mécaniques. En ajoutant de l'alginate à leur encre, ils ont pu réaliser une double réticulation avec du CaCl_2 pour l'alginate et la lumière pour GelMA. Pour s'assurer que leur structure était adéquatement réticulée, ils se sont servis d'une combinaison de réticulation en utilisant du CaCl_2 comme matériel dans le canal interne en plus de pulvériser du CaCl_2 sur la structure en ajoutant par la suite une réticulation lumineuse. Ainsi, avec GelMA 7 %, alginate 3 % et PEGTA 2 %, en variant la taille des aiguilles coaxiales utilisées et suivant ce processus d'impression, ils ont pu imprimer des structures ayant des diamètres externe variant de 500-1500 μm et interne variant de 400-1000 μm (Jia et al., 2016). Ils ont également montré que ce processus leur

permet d'obtenir une viabilité cellulaire de 80 % pour des HUVECs et MSCs humains après 7 jours de culture (Jia et al., 2016).

2 Objectifs

De ce fait, suite aux différents travaux présentés précédemment, il est possible de remarquer qu'il est encore nécessaire d'optimiser le développement de patches à application cardiaque. En effet, les travaux rapportés ont montré l'utilisation de plusieurs bioencres, incluant GelMA, qui s'avère prometteur pour la bioimpression 3D de tissus. Or, peu d'articles se concentrent sur l'utilisation de cette encre pour développer des structures perfusables servant de précurseur à un patch vascularisé à application cardiaque.

Hypothèse

Suivant les différents travaux présentés, l'hypothèse générale de ce projet de recherche est qu'il existe des encres ayant les propriétés recherchées et des aiguilles de diamètres appropriés pour fabriquer des structures perfusables pouvant éventuellement servir à la vascularisation par l'utilisation d'une bioimprimante 3D.

Objectif général

L'objectif général de ce projet de recherche est de fabriquer et caractériser des patches perfusables bioimprimés en 3D pour une application potentielle dans le tissu cardiaque.

Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques de ce projet sont les suivants :

1. Développer une bioencre biocompatible avec des propriétés mécaniques adéquates pour l'impression de tissu cardiaque
2. Investiguer les propriétés rhéologiques et l'imprimabilité de l'encre
3. Bioimprimer en 3D et caractériser des patches standards et perfusés pour une application potentielle dans le tissu cardiaque

3 Méthode

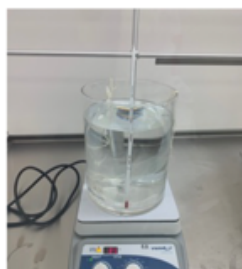
3.1 Synthèse de bioencres

Synthèse de GelMA

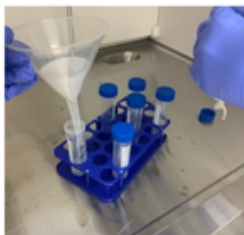
Afin de synthétiser GelMA, le protocole utilisé est similaire à ceux préalablement utilisés dans la littérature (S. Lee et al., 2020). Ainsi, 10 g de gélatine porcine de type A a été dissout à 50 °C dans du PBS. Par la suite, 8mL de méthacrylique anhydride a été ajouté manuellement goutte à goutte à l'aide d'une pipette de 1000 μ L à une température de 60°C. La réaction est restée à 60 °C pendant 3 heures et a été arrêtée en ajoutant du PBS. Par la suite, la solution a été séparée dans des tubes de dialyse (12-14 kDa, Millipore Sigma) et laissée dialysée contre de l'eau distillée pendant une semaine, en changeant l'eau à chaque jour. Finalement, les sacs de dialyse ont été répartis dans des flacons de 50 mL et ont été rangés à -80 °C pendant au moins 48 heures avant d'être lyophilisés pendant une semaine pour obtenir la poudre de GelMA. Les figures 13 et 14 récapitulent le processus général de méthacrylation de la gélatine.



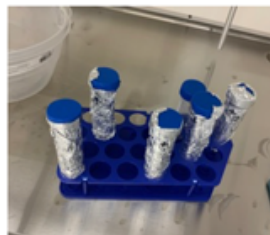
1. Réaction



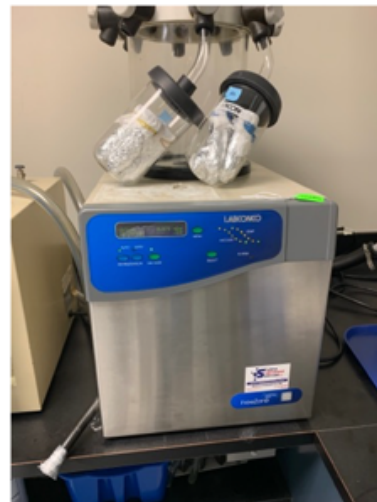
2. Dialyse



3. Filtration



4. GelMA filtré



5. Lyophilisation

Figure 13. Étapes nécessaires à la synthèse de GelMA.

Analyse par 1H RMN

Afin de confirmer s'il y a bel et bien eu méthacrylation lors de la réaction, la gélatine porcine utilisée ainsi que la poudre de GelMA de différents lots synthétisés ont été envoyées au *Centre régional de résonance magnétique nucléaire de l'Université de Montréal* afin d'obtenir le spectre 1H RMN des échantillons à l'aide d'un instrument à 400 MHz. Par la suite, les spectres ont été analysés à l'aide du logiciel *TopSpin* 4.1.1 pour déterminer le degré de méthacrylation (DoM) de différents lots de GelMA et de la gélatine (S. Lee et al., 2020; Z. Wang, Tian, Menard, & Kim, 2017). Afin de déterminer le DoM, les pics caractéristiques de lysine, groupement remplacé, ont été repérés sur chaque spectre aux points de 2.8 – 2.95 ppm et ont été normalisés en utilisant le pic de phénylalanine (7.2-7.5 ppm), inchangé dans tous les spectres, comme référence (S. Lee et al., 2020; Z. Wang et al., 2017). Par la suite, l'équation (1) a été utilisée pour calculer le DoM.

$$DoM = 100\% * \left(1 - \frac{\text{intégrale du pic de lysine de GelMA}}{\text{intégrale du pic de lysine de gélatine}}\right) \quad (1)$$

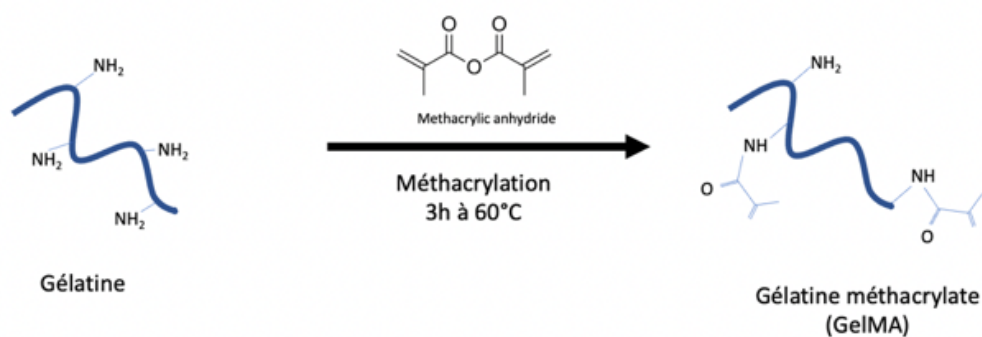


Figure 14. Processus de méthacrylation de la gélatine en GelMA

3.2 Propriétés mécaniques

Préparation des échantillons

La propriété étudiée est le module de Young. Afin de déterminer le module de Young du matériau, les échantillons de l'hydrogel ont été préparés à l'aide de moules rectangulaires de 1 cm de largeur par 5 cm de longueur avec 2 mm de profondeur. Par la suite, 1 mL de l'encre de GelMA-LAP a été transférée dans le moule à l'aide d'une pipette de 1000uL. Le LAP (lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate) a été utilisé en tant que photo initiateur. Chaque échantillon a été photo réticulé dans l'appareil Biox6 de Cellink (Figure 17) à l'aide du module préinstallé de longueur d'onde de 405 nm à une distance de 4 cm de la source (intensité $\sim 30\text{mW}/\text{cm}^2$). Les concentrations de GelMA ont variées de 5 à 10% et les concentrations de LAP, de 0,25 à 0,5 %. Le temps de réticulation a été modifié pour les différents paramètres testés. Après la réticulation, les échantillons ont été retirés du moule à l'aide d'une spatule et trempés dans un pétri d'eau pendant la nuit avant les tests.

Détermination du Module de Young

Afin de déterminer le module de Young, la machine Instron Electropuls E3000 équipé d'une cellule de charge de 250 N avec des mâchoires pneumatiques a été utilisée pour conduire les tests de traction uniaxiale des échantillons. Une pression de 10 psi, avec une vitesse d'étirement de 1 mm/min et une distance initiale entre les mâchoires de 1,5 cm ont été utilisés pour tous les tests. Par la suite, le module de Young a été déterminé en utilisant la pente dans la région linéaire des courbes. La figure 15 présente un exemple de courbe obtenue lors des tests de traction. Au moins 3 échantillons pour tous les groupes ont été testés, la moyenne et l'écart-type ont été déterminés.

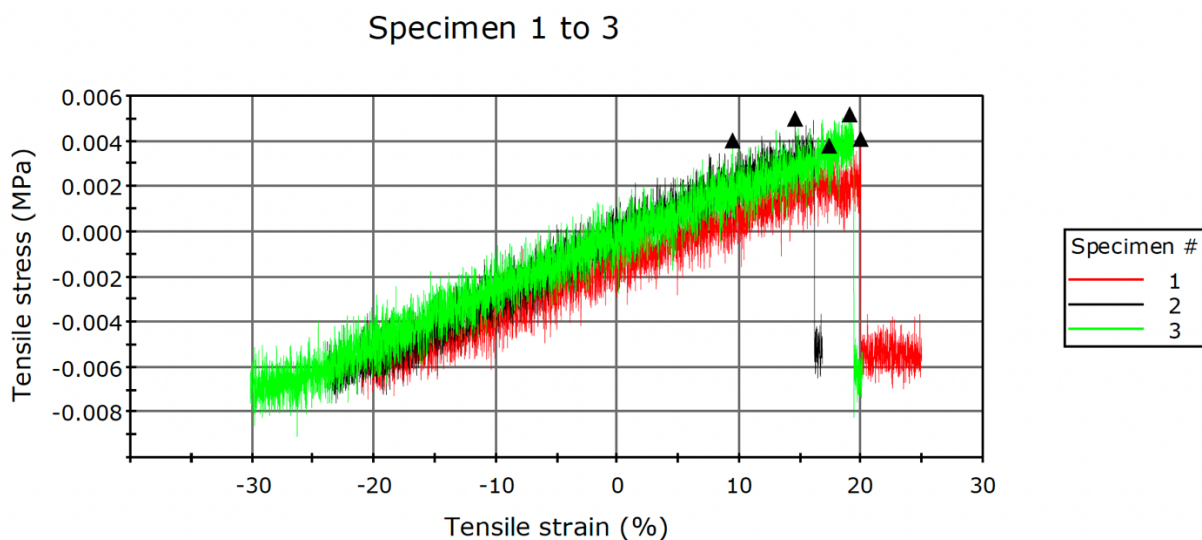


Figure 15. Exemple de courbes type brutes obtenues suite aux tests de traction uniaxiale permettant d'obtenir le module de Young des échantillons. Pour des échantillons de GelMA 10 %, LAP 0,5 %, 60s directement obtenu du logiciel de l'appareil Instron Electropuls E3000

3.3 Rhéologie

Balayage de température

Afin de déterminer le point de gélification des encres, le rhéomètre MCR501 de Anton Paar au département de génie chimique de Polytechnique Montréal a été utilisé à l'aide de la géométrie de cylindres concentriques simples. La poudre de GelMA a été dissoute dans du PBS pour obtenir la concentration désirée de la solution de GelMA et la solution a été réchauffée dans un bain-marie avant le test afin de pouvoir être transvidée dans la géométrie. Le bas de la géométrie a été préchauffé à 40 °C et environ 6 mL de la solution a été versée dans la géométrie. La solution est restée à reposer à température pour environ 15 minutes. Par la suite, le test a débuté en posant comme paramètre de test une plage de température de 40 °C à 10 °C, à un rythme de 1 °C/minute. Le test a été réalisé en mode oscillatoire et la fréquence est demeurée constante à 6,28 rad/s avec une déformation à 1 %. Les modules de perte (G'') et d'élasticité (G') ont été mesurés. Le point de gélification a été déterminé comme étant la température à laquelle G'' croise G' .

Comportement de l'écoulement

Afin de mesurer la viscosité en fonction du taux de cisaillement appliqué, le rhéomètre MCR502 de Anton Paar au département de génie chimique de Polytechnique Montréal a été utilisé avec une géométrie de plaque à plaque de 25 mm de diamètre. La température a été fixée à la température d'impression, donc 20 °C pour GelMA 10 % et 24 °C pour GelMA10 %-Gélatine 2 %. Pour chaque test, le matériel est resté à reposer sur la surface de la géométrie au moins 15 minutes avant le début du test avec une distance d'écart de la géométrie de 1 mm. Le taux de cisaillement a varié de 0,1 à 500 s⁻¹ afin d'évaluer la réponse du fluide au cisaillement.

3.4 Imprimabilité

3.4.1 Imprimabilité de structures standard

Afin d'évaluer et d'optimiser l'imprimabilité de l'encre choisie, il a été nécessaire d'établir une table d'imprimabilité principalement en fonction de la pression d'impression et de la vitesse d'impression. La bio imprimante utilisée pour tous les tests d'impression et de bioimpression de ce projet est l'imprimante 3D par extrusion pneumatique Biox6 de Cellink au centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine (Figure 17). L'aiguille utilisée pour les tests d'imprimabilité est une aiguille standard avec une longueur de 0,5 " et un diamètre de 25G (0,53 mm). Pour tous les tests, la surface sur laquelle les structures ont été imprimées a été pré-refroidie à 4 °C. Le modèle des structures à imprimer consiste en des structures en mailles de 1 cm x 1 cm à densité de remplissage de ~20 % avec des pores et le modèle était préinstallé dans le logiciel de l'imprimante. Dans le cas de modèles plus spécifiques, le logiciel Fusion 360 a été utilisé pour réaliser les modèles.

Pour établir une table d'imprimabilité, l'encre de GelMA 10 % a été préparée en dissolvant GelMA dans du PBS. Par la suite, la solution est restée à reposer à la température désirée dans la tête d'impression à température contrôlable (figure 17b) pendant environ

20 minutes. Afin de déterminer une plage d'imprimabilité adéquate en fonction des paramètres de température, pression et vitesse d'impression, une table qualitative a été établie, en considérant une structure comme « bonne », « moyenne » ou « mauvaise ».

3.4.2 Fidélité d'impression

Afin de vérifier la fidélité d'impression, les structures jusqu'à 8 couches ayant une bonne imprimabilité ont été conservées ou imprimées à nouveau suivant les paramètres de la fenêtre de bonne impression sur une surface pré-refroidie. Ces structures ont été imagées à l'aide du microscope EVOS XL Core de Invitrogen au centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine et analysées à l'aide du logiciel ImageJ. Par la suite, afin de quantifier la fidélité d'impression, les équations (2) et (3) ont été utilisées (Ouyang, Yao, Zhao, & Sun, 2016; C. Zhang et al., 2022). La fidélité d'impression a alors été quantifiée selon la circularité des pores obtenues lors de l'impression. En se rapprochant de pores de forme carré ou rectangulaire, la fidélité d'impression (Pr) est plus proche de ce qui a été dans le design et se rapproche de 1, indiquant une bonne fidélité d'impression. En se retrouvant avec des pores ressemblant davantage à un cercle, on s'éloigne du design, diminuant ainsi la fidélité d'impression. Dans les formules, Pr représente la fidélité d'impression, C représente la circularité, A est l'aire de la surface des pores et L est le périmètre de la surface des pores. La figure 16 schématise les différents paramètres retrouvés aux équations 2 et 3.

$$Pr = \frac{\pi}{4} * \frac{1}{C} \quad (2)$$

$$C = \frac{4\pi A}{L^2} \quad (3)$$

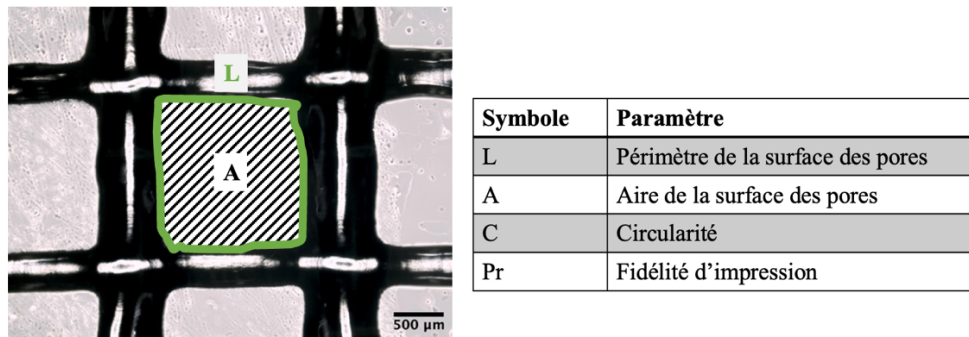


Figure 16. Schéma représentant les différents paramètres nécessaires au calcul de la fidélité d'impression (Pr)

3.5 Imprimabilité de structures coaxiales

Étant donné que les paramètres de l'impression coaxiale étaient difficilement contrôlables, une large plage de valeurs d'imprimabilité a été définie de la même manière que pour l'imprimabilité pour les structures standards. C'est-à-dire, une plage de structures imprimables définie en fonction de la vitesse et la pression d'impression. L'aiguille coaxiale utilisée a été achetée de Ramé-Hart et est en acier inoxydable, avec un diamètre de 16G-20G avec 20G comme diamètre interne (0,584 mm) et 16G comme diamètre externe (1,19 mm) avec une longueur de 25 mm. L'aiguille utilisée est montrée à la figure 17. Des encres de GelMA 10 % ou GelMA 10 %/gélatine 2 % ont été utilisées avec LAP 0,5 % comme encres externes. Une encres de gélatine 5 % a été utilisée pour imprimer les canaux internes des structures. Suite à l'impression de structures, elles ont été réticulées pendant 60s à 4 cm de distance de la source à l'aide du module UV de 405 nm. N'étant pas réticulée, la gélatine a ensuite pu être dissoute dans une étape d'incubation à 37 °C après la réticulation complète de la structure.

Afin de vérifier la présence de canaux vides, les structures ont été perfusées avec de l'eau contenant du colorant alimentaire. Pour ce faire, le protocole d'impression a été suivi et la structure imprimée a été retirée de l'incubateur 3 heures après le début de l'incubation. Par la suite, une aiguille de diamètre de 30G (0,31 mm) a été utilisée avec de l'eau mélangée à un colorant alimentaire afin de perfuser manuellement les structures.

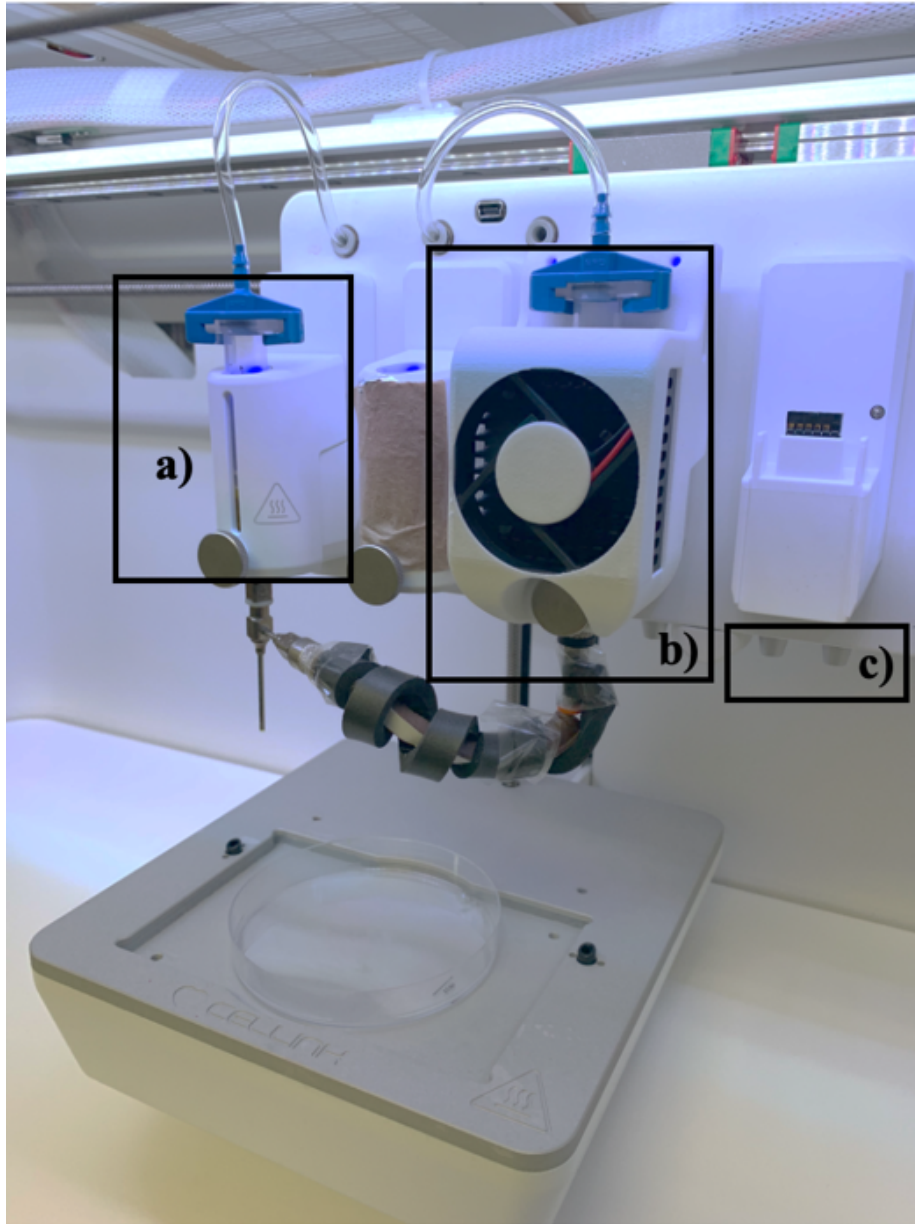


Figure 17. Montage de la bioimprimante BioX6 de Cellink au centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine pour l'impression coaxiale de structures. a) tête d'impression standard; b) tête d'impression à température contrôlable; c) modules UV.

3.6 Viabilité cellulaire

Afin de déterminer la biocompatibilité du matériel, des fibroblastes de souris de ligne NIH 3T3 ont été préparés de la même manière pour tous les tests. Brièvement, les cellules ont été décongelées et incubées dans une flasque t75 dans un média DMEM supplémenté avec 10 % de *calf bovine serum*, CBS, et 1 % de pénicilline. Par la suite, lorsqu'une confluence de 70-80 % a été atteinte, 2mL de 0,25% de trypsine a été utilisé afin de détacher les cellules de la flasque et de réaliser les différents tests de viabilité cellulaire : l'encapsulation manuelle et la bioimpression.

De plus, la méthode générale de calcul de la viabilité cellulaire a été la même pour tous les tests de viabilité et de bioimpression. Cela consiste en l'utilisation d'un kit de LIVE/DEAD (L3224, Invitrogen) aux jours 1 et 7 de culture cellulaire. Brièvement, en suivant les recommandations du fournisseur, 10 mL de DPBS a été préparé en ajoutant 20 µL de ethidium homodimer-1 et 5µL de calcein AM en mélangeant la solution après l'ajout de chaque composant. La solution a été conservée dans un environnement sombre jusqu'à son utilisation, au maximum dans la même journée. Les structures ou puits testés pour la viabilité ont été lavés au DPBS 3 fois avant d'introduire le volume approprié de solution de LIVE/DEAD et ont été incubés de 30 à 45 minutes dans un environnement sombre. Par la suite, les puits ont été observés au microscope à fluorescence inversé Leica DMi8 au centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine aux jours 1 et 7. Les filtres de rhodamine et GFP ont été utilisés afin de détecter les cellules mortes et vivantes. À l'aide des images obtenues identifiant soit les cellules viables ou les cellules mortes, la viabilité a par la suite été calculée à l'aide du logiciel Image J en suivant l'équation suivante (4):

$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = \frac{\text{cellules viables}}{(\text{cellules viables} + \text{cellules mortes})} * 100\% \quad (4)$$

Afin d'analyser les valeurs de viabilité cellulaire, la viabilité a été mesurée à trois points différents sur chaque puit testé pour avoir un minimum de 3 échantillons. Par la suite,

la moyenne et l'écart-types ont été déterminés et l'analyse statistique a été réalisée comme indiqué à la section 3.7.

3.6.1 Encapsulation manuelle

Afin de vérifier la biocompatibilité des matériaux utilisés, du temps de réticulation utilisé et de la concentration de l'agent de photoréticulation, LAP, les cellules ont été encapsulées dans les gels. Pour ce faire, les matériaux ont été préparés en mélangeant une solution de GelMA 5 % ou 10 % à LAP 0,25 % ou 0,5 % dans du PBS. Les solutions ont été mélangées à l'aide d'un aimant agitateur magnétique sur plaque chauffante à une température ~ 35 °C jusqu'à dissolution (~ 3 heures). Par la suite, dans des conditions stériles et dans un environnement sombre, pour la stérilisation, les solutions ont été filtrées à l'aide d'un filtre à seringue de 0,2 microns. Par la suite, les solutions ont été mélangées aux cellules à densité de 1×10^6 cellules/mL à l'aide d'une pipette et transférées dans des plaques à 48 puits. Les puits ont ensuite été réticulés à l'aide du module à UV 405 nm à 4 cm de la source (intensité ~ 30 mW/cm²) dans le Biox6 pour le temps spécifique testé. Par la suite, le milieu de culture a été ajouté aux puits et les plaques ont été placées dans un incubateur à 37 °C avec un supplément de 5 % de CO₂. Par la suite, comme expliqué précédemment, le kit de LIVE/DEAD a été utilisé pour évaluer la viabilité aux jours 1 et 7 de culture. Pour les échantillons en culture pour 7 jours, le média a été changé aux 2 jours.

3.6.2 Bioimpression standard

Afin d'évaluer l'effet de la bioimpression sur la viabilité cellulaire, des structures de 2 à 4 couches ont été imprimées à l'aide de la bioimprimante Biox6 de Cellink. Pour la bioimpression, des fibroblastes 3T3 ont été mélangés à une encre de 10 % GelMA et 0,25 % ou 0,5 % LAP stérilisée par un filtre seringue à 0,2 microns et préchauffée. La méthode utilisée est la même que celle expliquée dans la section de l'encapsulation manuelle. Entre-temps, la chambre de la bioimprimante a été stérilisée et le filtre HEPA activé. Une fois la bioencre préparée, elle a été transférée dans une cartouche de 3 mL compatible avec la

bioimprimante et insérée dans la tête d'impression à température contrôlable. La température a été fixée à 20 °C et l'encre est restée à reposer environ 20 minutes avant le début du test afin de permettre le refroidissement. Par la suite, le test d'impression a eu lieu à l'aide d'une aiguille stérile de 25G de diamètre et de 0,5 " de longueur, sur une surface pré-refroidie à 4 °C. Les paramètres d'impressions ont été déterminés selon la plage d'imprimabilité préétablie. À la suite de la bioimpression, la structure a été réticulée pendant 60s. Le milieu de culture a ensuite été ajouté à la plaque et les structures ont été transférées dans un incubateur à 37 °C supplémenté en 5 % de CO₂. Par la suite, comme expliqué précédemment, le kit de LIVE/DEAD a été utilisé pour évaluer la viabilité aux jours 1 et 7 de culture. Pour les échantillons en culture pour 7 jours, le média a été changé aux 2 jours.

3.6.3 Bioimpression coaxiale

Afin de bioimprimer une structure composée de filaments creux, une encre de 10 %/2 % GelMA/gélatine et LAP 0,5 % et une encre de 5 % gélatine ont été préparées en dissolvant les concentrations appropriées de GelMA et gélatine dans du PBS à ~35 °C pendant 3 heures. Par la suite, pour des fins de stérilisation, les encres ont été filtrées par un filtre seringue de 0,2 microns, comme mentionné précédemment dans la méthode de l'encapsulation manuelle. Après la filtration, la seringue stérile de 3 mL contenant la solution de gélatine a été mise de côté alors que les fibroblastes NIH 3T3 ont été ajoutés à la bioencre de GelMA/gélatine. Les bioencres, préalablement préchauffées, sont restées à reposer à température pièce, 24 °C, pendant 30 minutes avant le début des tests. La seringue coaxiale et son câble connecteur (16G-20G) ont été stérilisés en passant de l'éthanol suivi de PBS dans les canaux. Par la suite, la même procédure que celle utilisée pour la bioimpression standard a été utilisée afin de quantifier la viabilité cellulaire.

3.7 Analyse statistique

Les données présentées sont toutes exprimées en fonction de leur déviation standard \pm SD, lorsqu'applicable. Les tests statistiques utilisés étaient les tests ANOVA et t-Student réalisés avec un seuil de $p=0,05$. Les valeurs inférieures à 0,05 étant considérées statistiquement significatives. Les tests statistiques ont été effectués pour les données des modules de Young et de viabilité cellulaire. Les tests ont été réalisés à l'aide du logiciel SPSS. Pour chaque graphique de la section des résultats, le terme N représente le nombre total de tests différents réalisés et n représente le nombre minimal d'échantillon réalisé par test.

4 Résultats et discussion

4.1 Synthèse de GelMA

L'analyse par $^1\text{HNMR}$ a permis d'obtenir les spectres présentés aux figures 18 et 19. À partir de ceux-ci, il est possible de repérer le pic caractéristique qui indique la présence de lysine sur le spectre de gélatine (Fig.18b) aux points 2,8-2,95 ppm. Ce pic est également présent dans le spectre de GelMA (Fig. 19c), mais il est possible de remarquer que son intensité est fortement réduite. Cela est explicable par le fait que ce groupement de lysine est le groupement qui a été substitué lors de la réaction.

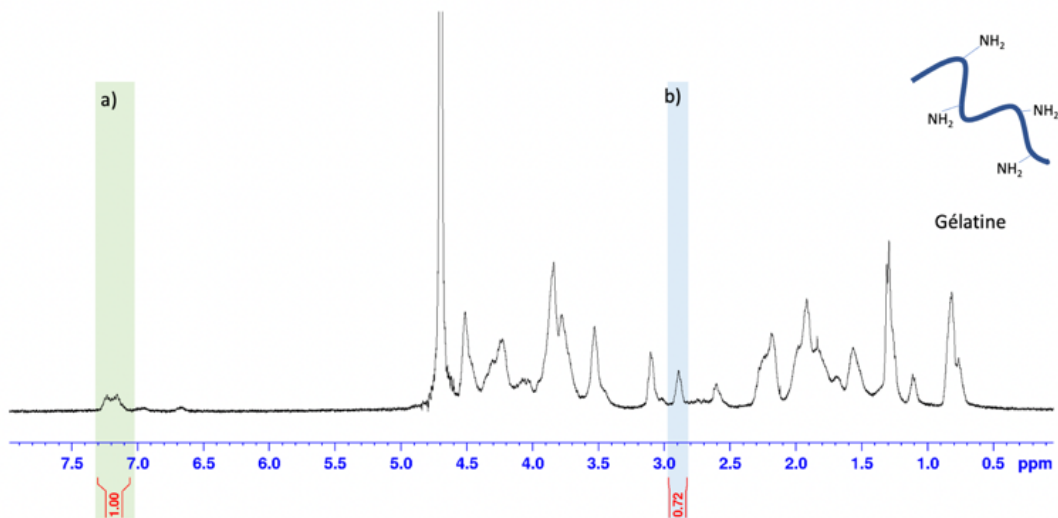


Figure 18. Spectre $^1\text{HNMR}$ de la gélatine porcine de type A. Représentation du pic caractéristique de phénylalanine (a); et du pic de lysine (b)

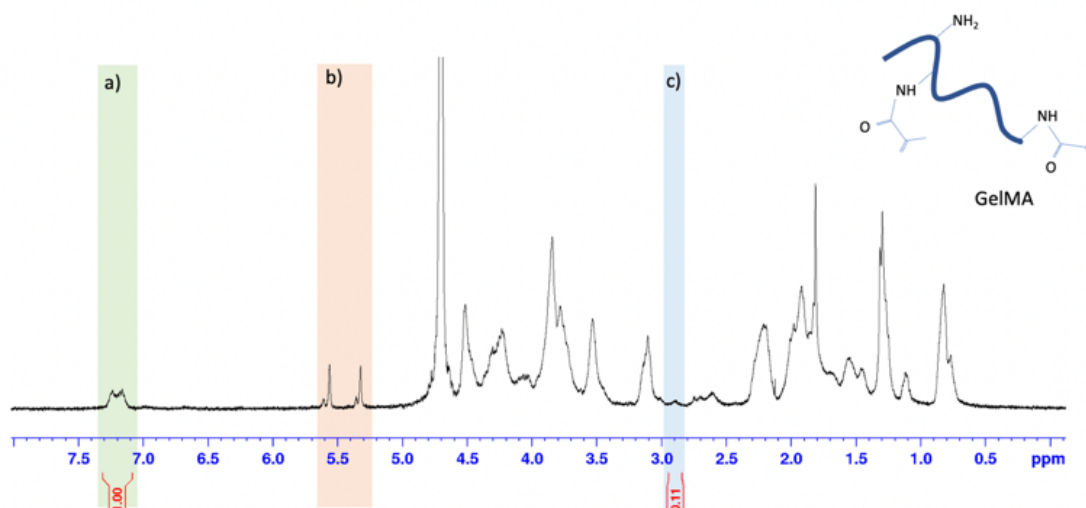


Figure 19. Spectre 1HNMR de GelMA synthétisé. Représentation du pic de caractéristique de phénylalanine (a); des pics de groupements méthacrylates (b); et du pic de lysine (c).

De plus, la méthacrylation peut être confirmée par l'observation des pic caractéristiques des protons de vinyle méthacrylate présents autour de 5,5 ppm (Ning et al., 2020) sur le spectre de GelMA (Fig.19b) alors qu'ils sont absents du spectre de la gélatine. En plus de la présence de ces pics, il a été possible de calculer le DoM de plusieurs lots de GelMA, qui se retrouve au tableau 1. Ainsi, il est possible de remarquer qu'avec le protocole utilisé, il a été possible d'obtenir un DoM assez répétable de 89 ± 2 % pour l'ensemble des lots synthétisés.

Tableau 1. Degré de méthacrylation (DoM) pour plusieurs lots de GelMA synthétisés

Lot de GelMA	1	2	3	4
DoM calculé (%)	88	91	89	87

4.2 Propriétés mécaniques

Afin de déterminer quels sont les paramètres d'impression les plus appropriés pour avoir une structure finale ayant des propriétés similaires à celles du tissu cardiaque, les propriétés mécaniques ont été évaluées, plus précisément, le module de Young. Les paramètres qui peuvent affecter les propriétés mécaniques sont la concentration de matériel, GelMA et LAP, et le temps de photo réticulation utilisé. Les figures 20 et 21 indiquent les résultats obtenus pour des concentrations de 5 % et 10 % de GelMA respectivement avec une concentration de LAP de 0,25 % et 0,5 % à des temps de réticulation de 30s et 60s.

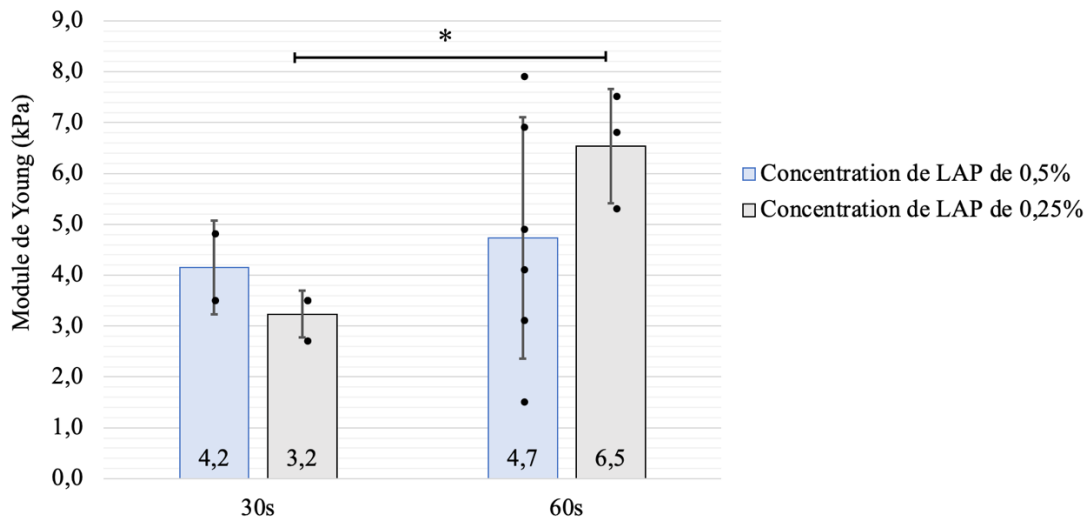


Figure 20. Modules de Young pour GelMA 5 % pour des temps de réticulation de 30s et 60s. * Indique une différence statistiquement significative pour un test t-Student à un seuil $p < 0,05$ entre les groupes de LAP 0,25% à 30s et 60s ($N=2$, $n \geq 2$).

La figure 20 présente les résultats de module de Young pour une structure à base de 5 % de GelMA. Ainsi, les modules de Young obtenus sont de $4,2 \pm 0,9$ kPa, $4,7 \pm 2,4$ kPa pour 0,5 % LAP à respectivement 30s et 60s de réticulation et $3,2 \pm 0,5$ kPa et $6,5 \pm 1,1$ kPa pour 0,25 % LAP à respectivement 30s et 60s de réticulation. Or, on remarque que pour une concentration de 5 % de GelMA, peu importe le temps de réticulation, 30s ou 60s, le module de Young maximum obtenu est de $6,5 \pm 1,1$ kPa, ce qui n'est pas suffisant pour une

application dans le tissu cardiaque. En effet, selon la littérature, un module de Young autour de 5 à 50 kPa serait plutôt adéquat (Bejleri et al., 2018; Reis et al., 2016).

Pour les modules de Young de GelMA, 5% il n'y a pas de différence significative générale pour l'ensemble des groupes, ce qui indique que le changement du temps de réticulation et/ou de la concentration de LAP n'ont pas eu d'effet sur la valeur du module de Young obtenue. Or, avec des valeurs de LAP à 0,25 %, une différence significative est reportée lors de l'augmentation du temps de réticulation. Or, cette différence n'étant pas perçue dans les autres groupes, est insuffisante pour conclure que le temps de réticulation affecte significativement le module de Young.

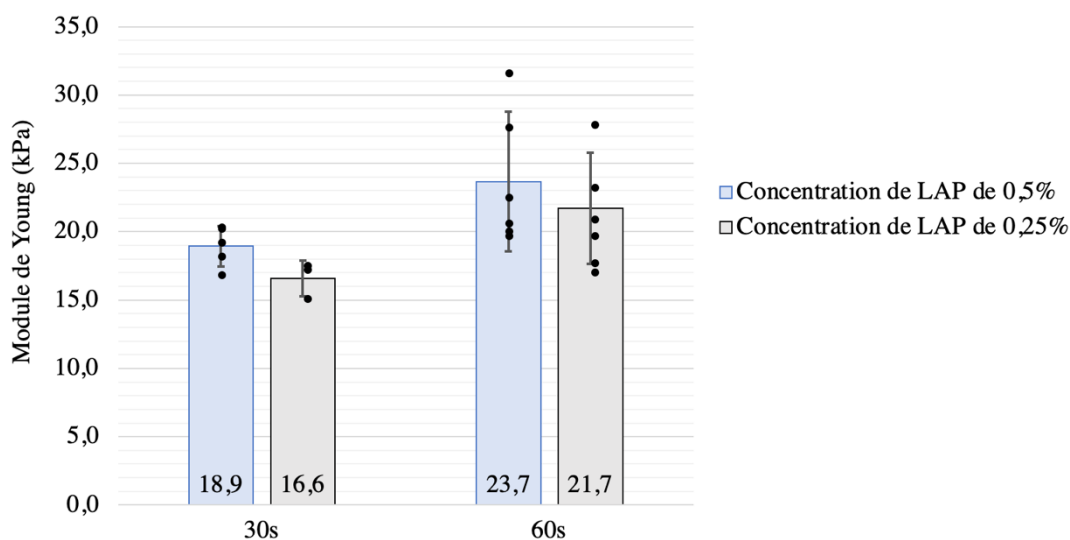


Figure 21. Modules de Young pour GelMA 10 % pour des temps de réticulation de 30s et 60s. Pas de différence statistiquement significative au seuil $p < 0,05$ avec le test t-Student ($N = 2, n = > 3$).

Par contre, il est possible de remarquer que pour la figure 21, qui présente le module de Young d'un gel de 10 % GelMA, il est possible d'obtenir un module de Young assez élevé pour être utilisé pour les applications d'ingénierie tissulaire du cœur. En effet, à un temps de réticulation de 30s, on obtient des valeurs de $18,9 \pm 1,5$ kPa et $16,6 \pm 1,3$ kPa pour 0,5 % LAP et 0,25 % LAP respectivement. Or, les valeurs obtenues avec une concentration de photo initiateur, LAP, de 0,25 % et de 0,5 % avec un temps de réticulation de 60s se rapprochent davantage des valeurs visées. Puisque les modules sont respectivement de $21,7 \pm 4,1$ kPa et $23,7 \pm 5,1$ kPa pour 0,25 % et 0,5 % de LAP, une encre de GelMA 10 % à 60s de réticulation sera utilisée pour la suite.

Il est également possible de remarquer, suite à l'étude statistique de l'ensemble des données de 5 % et 10 % GelMA, qu'il y a une différence statistiquement significative sur le module de Young lors du changement de concentration de GelMA entre 10% et 5% ($p < 0,001$). Ainsi, la concentration de GelMA entraîne une différence significative sur le module de Young.

4.3 Biocompatibilité

Afin d'évaluer la biocompatibilité de l'encre utilisée, des fibroblastes NIH 3T3 ont été encapsulés dans les gels de 5 % et 10 % GelMA et réticulés jusqu'à un maximum de 120s. Ainsi, il a été possible de confirmer qu'avec des temps allant jusqu'à 120s de réticulation, la viabilité cellulaire restait élevée. En effet, en se basant sur les images microscopiques de LIVE/DEAD des gels encapsulés pour différents temps de réticulation, présentées aux figures 22, 24 et 26, il a été possible de déterminer le pourcentage de viabilité des cellules dans les gels, présenté aux figures 23, 25 et 27.

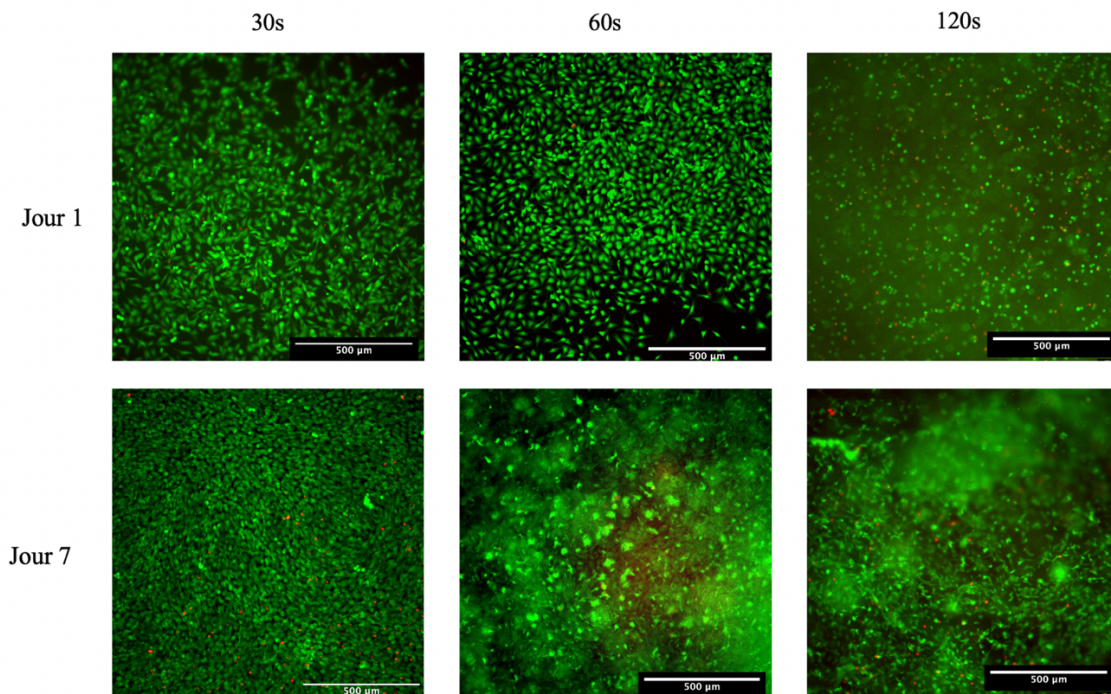


Figure 22. Images de LIVE/DEAD de fibroblastes 3T3 encapsulés dans un gel de GelMA 5% avec du LAP 0,5 %. La fluorescence verte indique les cellules viables et la fluorescence rouge, les cellules mortes.

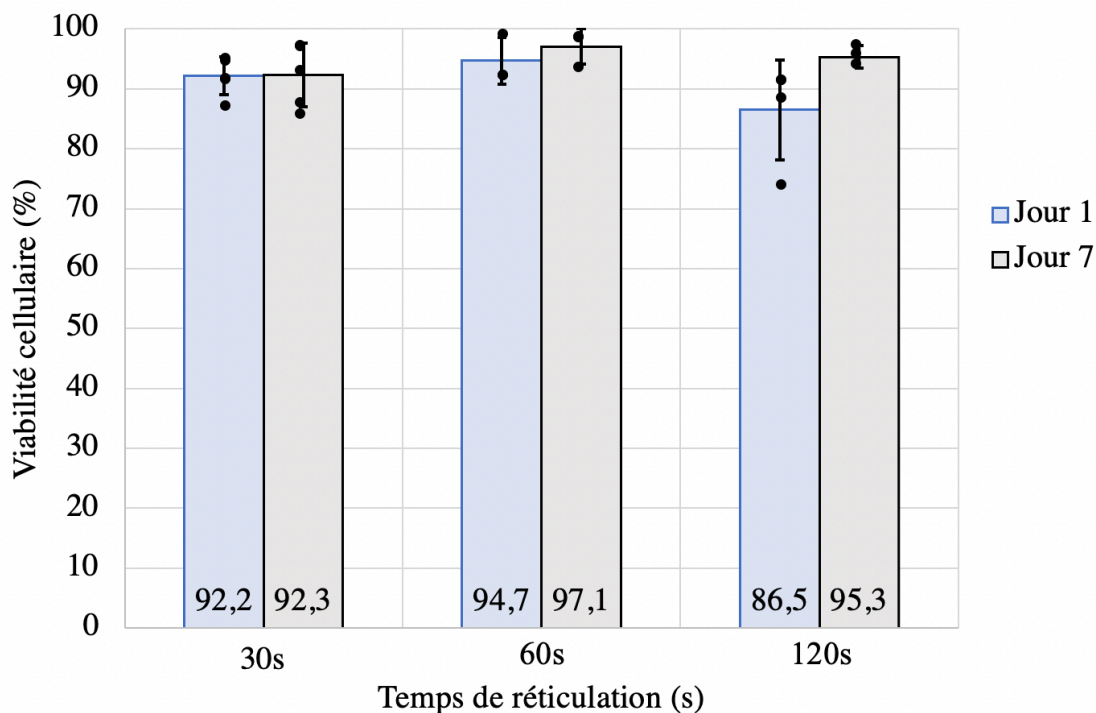


Figure 23. Viabilité des fibroblastes 3T3 encapsulés dans des gels de 5 % GelMA, 0,5 % LAP avec un temps de réticulation de 30s à 120s aux jours 1 et 7 de culture cellulaire. Pas de différence statistiquement significative avec le test ANOVA, $p > 0,05$ ($N = 1$, $n = 3$).

Ainsi, à la figure 23, il est possible de remarquer que même avec une augmentation du temps de réticulation, jusqu'à 120s, il ne semble pas y avoir de réduction de la viabilité cellulaire lors de l'utilisation d'une bioencore contenant 0,5 % de LAP. En effet, en comparant les valeurs de viabilités les plus basses obtenues pour chaque temps de réticulation, $92,2 \pm 3,2$ %, $94,7 \pm 3,9$ % et $86,5 \pm 8,4$ % respectivement pour les jours 1 de 30s, 60s et 120s de temps de réticulation, il ne semble pas y avoir de réduction en termes de viabilité. Cette tendance est également observable pour l'encapsulation manuelle dans une encre de GelMA 10 %, LAP 0,5 %, comme montré à la figure 25.

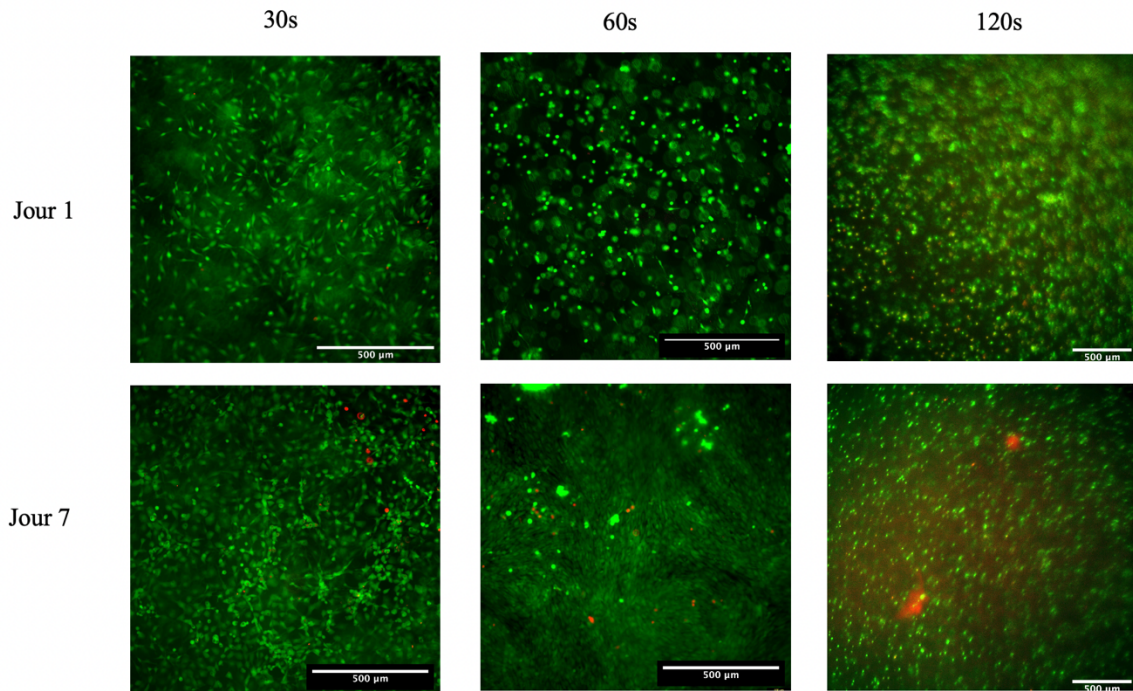


Figure 24. Images de LIVE/DEAD de fibroblastes 3T3 encapsulés dans un gel de GelMA 10 % avec du LAP 0,5 %. La fluorescence verte indique les cellules viables et la fluorescence rouge, les cellules mortes.

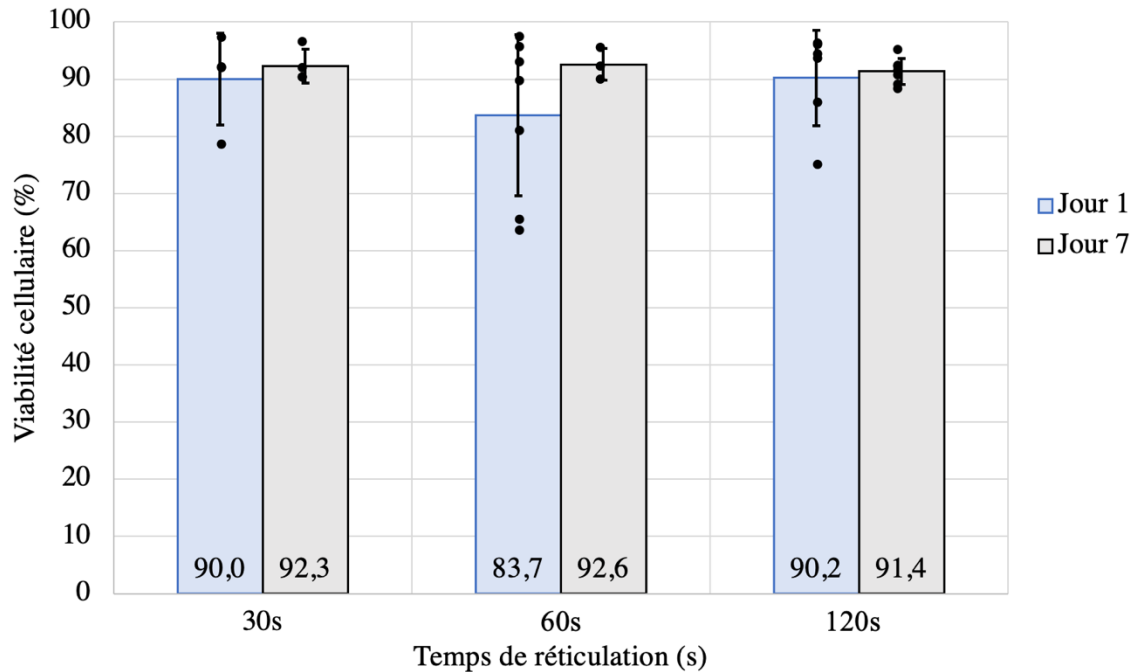


Figure 25. Viabilité de fibroblastes 3T3 encapsulés dans des gels de 10 % GelMA et 0,5 % LAP pour des temps de réticulation de 30s à 120s aux jours 1 et 7 de culture. Pas de différence statistiquement significative avec le test ANOVA, $p > 0,05$ ($N = 2$, $n = 3$).

En comparant les viabilités cellulaires obtenues pour des gels de 5 % GelMA et 10 % GelMA, figures 23 et 25 respectivement, il est possible de remarquer qu'il n'y a pas de réduction de viabilité lors de l'utilisation d'une plus grande concentration de GelMA (10 % vs 5 %) à ces concentrations. Par exemple, en comparant les viabilités obtenues à un temps de réticulation de 60s au jour 1, pour GelMA 5 %, on a une valeur de $94,7 \pm 3,9$ % alors que pour GelMA 10 %, on a une valeur de $83,7 \pm 14,1$ %, ce qui rentre dans la même plage de viabilité. Cette tendance est également observable pour les autres temps de réticulation aux jours 1 et 7. En effet, les valeurs de viabilité pour GelMA 10 % sont de $90,0 \pm 8,0$ %, $83,7 \pm 14,1$ % et $90,2 \pm 8,3$ % respectivement pour les temps de 30s, 60s et 120s au jour 1 de culture et pour GelMA 5 %, de $92,2 \pm 3,2$ %, $94,7 \pm 3,9$ % et $86,5 \pm 8,4$ % pour les temps de 30s, 60s et 120s au jour 1 de culture. Alors que pour le jour 7 de culture, pour GelMA 10 %, les valeurs de viabilité sont de $92,3 \pm 2,9$ %, $92,6 \pm 2,8$ % et $91,2 \pm 2,3$ % respectivement pour des temps de réticulation de 30s, 60s et 120s alors que la viabilité est de $92,3 \pm 5,3$ %, $97,1 \pm 3,0$ % et $95,3 \pm 1,9$ % pour GelMA 5 %.

De plus, en comparant l'évolution de la viabilité cellulaire de manière temporelle, aux jours 1 et 7, aux figures 23 et 25, il est possible de voir qu'il y a une viabilité élevée pour tous les cas, autant pour une concentration et GelMA de 5 % que de 10 %.

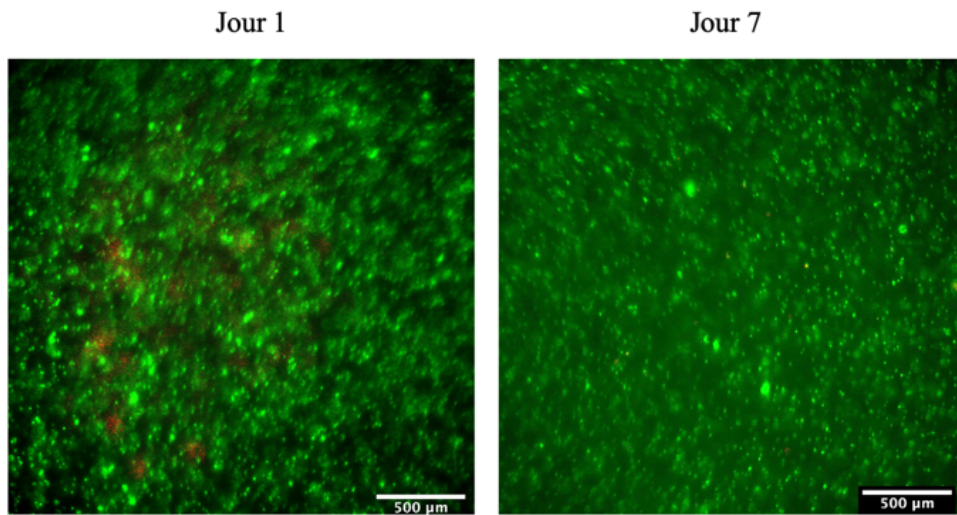


Figure 26. Images de LIVE/DEAD de fibroblastes 3T3 encapsulés dans un gel de GelMA 10 % avec du LAP 0,25 % pour un temps de réticulation de 30s. La fluorescence verte indique les cellules viables et la fluorescence rouge, les cellules mortes.

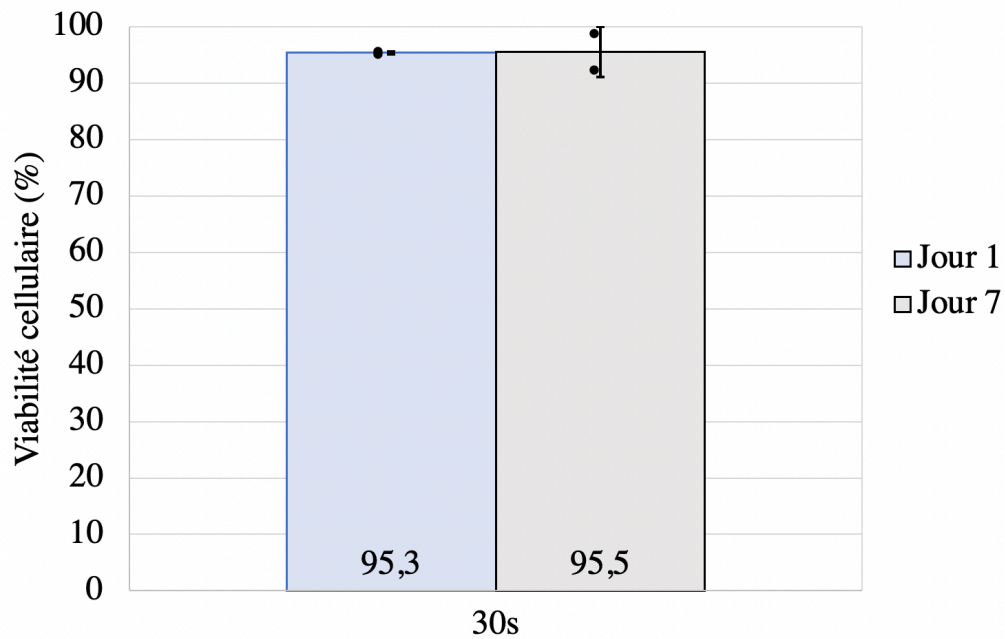


Figure 27. Viabilité des fibroblastes 3T3 encapsulés dans des gels de GelMA 10 % et LAP 0,25 % pour le temps de réticulation de 30s aux jours 1 et 7 de culture. (N = 1, n=2).

Ainsi, les résultats obtenus et présentés aux figures 23 et 25 ont été en mesure de montrer que l'utilisation d'une concentration de LAP de 0,5 % n'affecte pas la viabilité cellulaire négativement. De plus, il est possible de remarquer en observant la figure 27 que la viabilité suite à l'encapsulation dans une encre contenant 0,25 % LAP, reste également élevée. Il ne semble pas y avoir de différence en termes de viabilité cellulaire, comparativement à une concentration de LAP de 0,5 %. Par exemple, en comparant la viabilité à 30s pour le jour 1, de $95,3 \pm 0,2$ % et de $90,0 \pm 8,0$ % pour respectivement 10 % GelMA à 0,25 % et à 0,5 % LAP (figures 24 et 26), la plage de viabilité reste la même. Cela est également le cas pour le jour 7 de culture avec une viabilité de $95,5 \pm 4,5$ % et $92,3 \pm 2,9$ % pour respectivement 10 % GelMA à 0,25 % et 0,5 % LAP.

Plusieurs concentrations de GelMA ont été utilisées dans la littérature pour la bioimpression de cellules ou pour la post-culture de cellules sur une structure imprimée. Les articles utilisant ce matériel pour la bioimpression rapportent habituellement les viabilités obtenues post impression de structures encapsulant des cellules. Or, peu d'articles rapportent les valeurs de viabilités obtenues suite à un test de biocompatibilité de matériau seul, sans impression, comme effectué ici. Or, de manière générale, il est rapporté qu'une concentration plus faible de GelMA, de moins de 5 % offre une plus forte viabilité et prolifération cellulaire que les encres des concentrations élevées de GelMA, supérieures à 10 % (Shao et al., 2020; Y. Wang et al., 2019; Yin et al., 2018). Alors que pour des concentrations élevées de GelMA, l'imprimabilité est grandement améliorée, au détriment de la viabilité cellulaire (Yin, Yan et al. 2018). Or, certains rapportent que c'est plutôt l'utilisation de concentrations plus élevées que 10 % de GelMA qui permet la croissance de certains types cellulaires (Shao et al., 2020). Alors que d'autres auteurs rapportent ne pas voir de différence en terme de viabilité pour des structures de 5 % et 10 % GelMA (Ning et al., 2020). C'est pourquoi, certains auteurs, optent pour tester la biocompatibilité générale de chaque type cellulaire avant d'imprimer les structures (Shao et al., 2020). C'est justement ce qui est réalisé ici. Or, il est à noter que pour l'utilisation d'un autre type cellulaire, un test de biocompatibilité devra être réalisé à nouveau.

De plus, en ce qui concerne l'utilisation de photoinitiateurs, certains auteurs rapportent choisir des concentrations plus faibles avec une concentration de 0,1 % de LAP puisque l'augmentation de concentration de photoinitiateur augmente généralement les effets cytotoxiques sur les cellules (O'Connell et al., 2020). Or, plusieurs auteurs utilisent des concentrations plus élevées de LAP, jusqu'à 0,5 % pour des temps de réticulation allant jusqu'à 300s d'exposition sans remarquer d'effets négatifs sur la viabilité cellulaire (Koti et al., 2019; Shao et al., 2020). Il a alors été nécessaire de confirmer l'utilisation de telles concentrations ici.

Ainsi, en prenant compte des résultats obtenus dans les sections précédentes, il est possible de conclure qu'une encre de GelMA 10 % est la plus adaptée pour l'impression de tissu cardiaque avec un temps de réticulation de 60s autant au niveau des propriétés mécaniques qu'en terme de viabilité cellulaire. De plus, une plage de concentration de photoinitiateur LAP de 0,25 % à 0,5 % peut être utilisée puisque cela n'affecte pas négativement la viabilité cellulaire pour un temps de réticulation de 60s.

4.4 Rhéologie

Puisque GelMA est un matériel sensible à la température, il est nécessaire de déterminer son point de gélification afin de l'utiliser comme encre pour l'impression 3D. De cette manière, il est possible de s'assurer que la viscosité de l'encre est suffisamment élevée pour être imprimée, sans être trop élevée pour entraîner l'utilisation d'une pression d'impression trop grande. Pour ce faire, un balayage en température a été effectué en rhéométrie et est retrouvé à la figure 28.

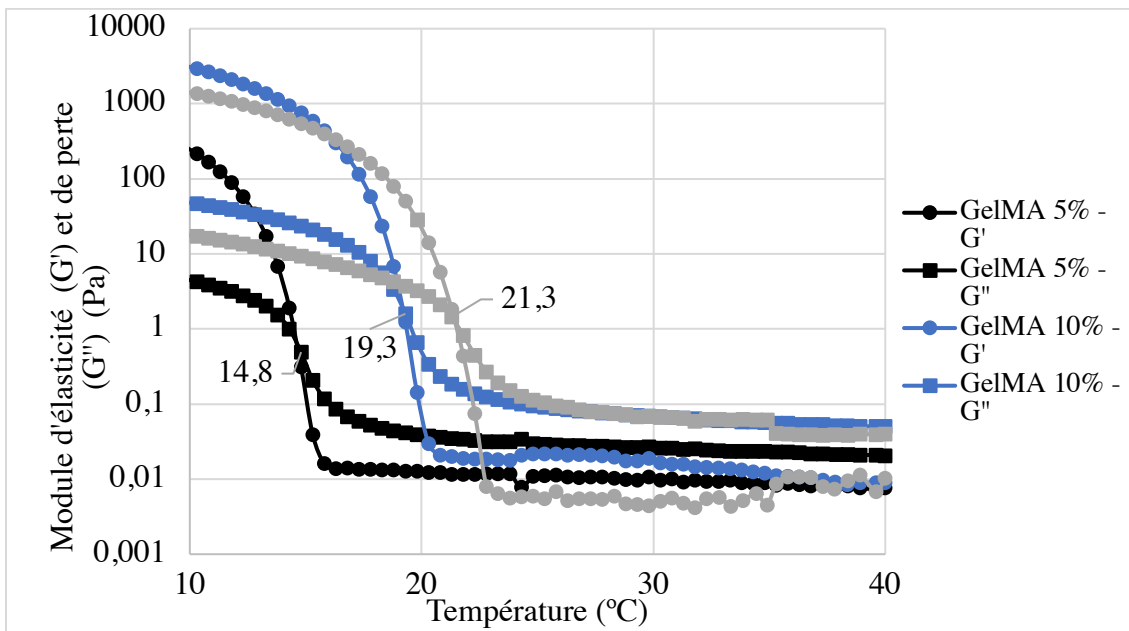


Figure 28. Balayage de température de la gélatine 5 % et GelMA 5 % et 10 %.

En observant le graphique de balayage en température, il est possible de remarquer qu'à des températures élevées, les solutions de GelMA et gélatine ont une valeur du module de perte, G'' , plus élevée que celle du module d'élasticité, G' . Ceci indique que les solutions se comportent de manière qui a tendance à être plus liquide, alors qu'en diminuant la température, le module d'élasticité, G' , devient plus élevé, ce qui résulte en une solution qui se comporte comme un gel. Ainsi, ce changement de comportement s'effectue au point de gélification qui se trouve au croisement entre les courbes de G' et de G'' (Yin et al., 2018). La figure 28 montre un balayage en température permettant de repérer un point de gélification à 19,3 $^{\circ}\text{C}$ pour GelMA 10 % et 14,8 $^{\circ}\text{C}$ pour une solution de GelMA 5 %. Il s'agit d'un résultat attendu qui concorde avec ce qui est obtenu dans la littérature (Ning et

al., 2020; Yin et al., 2018). Ainsi, afin de rester dans cette plage où la viscosité du matériel est élevée, pour la suite des tests d'impression, les températures utilisées sont autour du point de gélification, c'est-à-dire, autour de 19,3 °C. Or, il est à noter qu'il est tout de même nécessaire de tester la température pour les premières impressions puisque le point de gélification n'est qu'un indicateur d'une bonne température à utiliser lors de l'impression et peut varier.

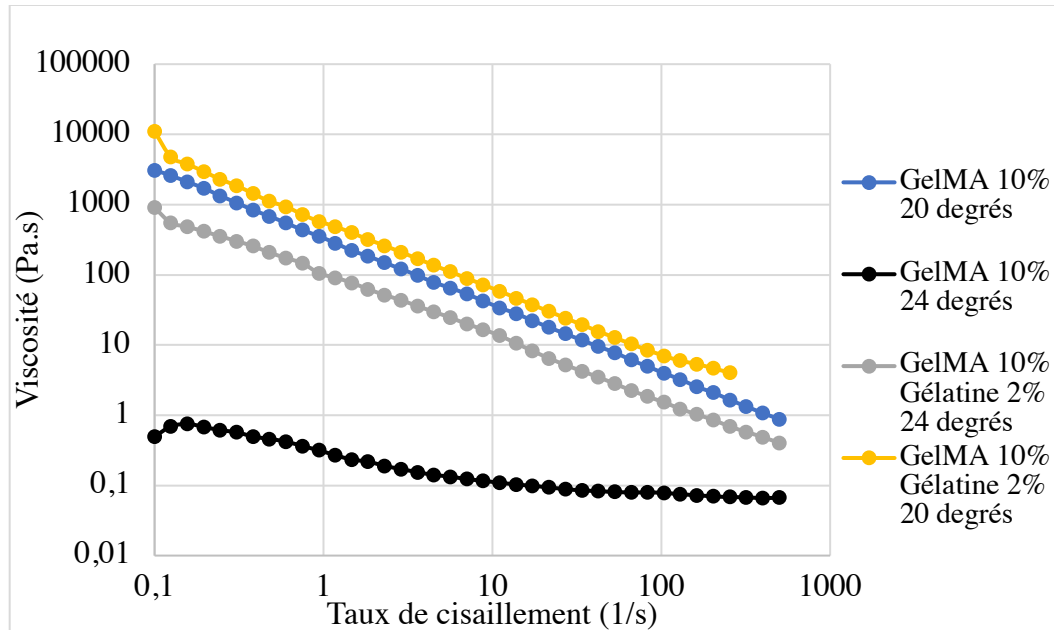


Figure 29. Viscosité des encres de GelMA 10 % et GelMA 10 %-gélatine 2 % lors de l'écoulement à différentes températures.

Par la suite, il a été possible de réaliser un test afin d'observer l'effet du taux de cisaillement sur la viscosité des encres, présenté à la figure 29. Il est ainsi possible de remarquer que pour toutes les solutions testées, la viscosité diminue avec l'application d'un plus grand taux de cisaillement. Ainsi, toutes les solutions réagissent de manière non-Newtonienne avec un comportement rhéofluidifiant. De plus, il est possible de remarquer que la viscosité de GelMA 10 % seul à température de 20 °C est beaucoup plus élevée que la viscosité à température de 24 °C, ce qui confirme les résultats obtenus à la figure 28 et indique qu'il serait davantage idéal d'imprimer GelMA autour de sa température de gélification plutôt qu'à une température supérieure. De plus, il y a également concordance avec la littérature, par rapport au fait que la viscosité de GelMA diminue avec l'augmentation de la température (Y. Wang et al., 2019; Yin et al., 2018).

Or, un élément intéressant à observer est qu'avec l'addition de 2 % de gélatine dans une encre de 10 % GelMA, il est possible d'augmenter énormément la viscosité, comme observable pour les courbes à 24 °C de la figure 29 où la viscosité initiale est augmentée par un facteur de 10^4 . L'augmentation générale de viscosité pour une même température lors de l'ajout de gélatine au mélange est également cohérent avec ce qui est reporté dans la littérature (Y. Wang et al., 2019; Yin et al., 2018). De plus, les valeurs de viscosité pour ces solutions sont similaires à ce qui est reporté dans la littérature (Y. Wang et al., 2019).

4.5 Imprimabilité

4.5.1 Imprimabilité de structures standard

Afin de posséder une base pour l'impression 3D de structures désirées, il a été nécessaire de déterminer en premier la plage de vitesses d'impression et pressions dans laquelle il est possible d'imprimer une encre de GelMA 10 %.

Pour ce faire, un premier tableau a pu être établi en testant différentes températures d'impressions, toujours en se situant autour du point de gélification déterminé à l'aide des tests rhéologiques. Le tableau 2 récapitule les différentes températures d'impression testées. Dans ce cas, il s'agit d'évaluer visuellement si l'encre est assez visqueuse pour être imprimée en maintenant un filament stable. Lorsque ce n'est pas le cas, le tableau est marqué par un « X » et lorsque c'est possible, le tableau est marqué par un « O ».

Tableau 2. Imprimabilité d'une encre de GelMA 10 % du lot 1 pour différentes températures d'impression.

Température (°C)	26	25	24	23
Imprimabilité	X	X	X	O

À partir du tableau 2, une température initiale d'impression de 23 °C a été sélectionnée. Par la suite, la pression d'impression et la vitesse ont été modifiées afin d'obtenir des structures visuellement imprimables. Les résultats sont présentés au tableau 3. Des exemples représentatifs pour la qualification de chaque section, bonne, moyenne et mauvaise sont présentés aux figures 30 et 31. Suite à ces tests, une vitesse de 5 mm/s a été sélectionnée.

Tableau 3. Imprimabilité de GelMA 10 % du lot 1 à une température de 23 °C. Par observation visuelle, le vert représente une bonne structure, le jaune, une structure moyenne et le rouge, une mauvaise structure.

Vitesse (mm/s) \ Pression (kPa)	5	8	10
150	Red	Red	Red
190	Red	Red	Red
200	Yellow	Red	Red
210	Green	Green	Green
220	Green	Green	Green
230	Green	Green	Green
240	Yellow	Green	Green
250	Yellow	Yellow	Green

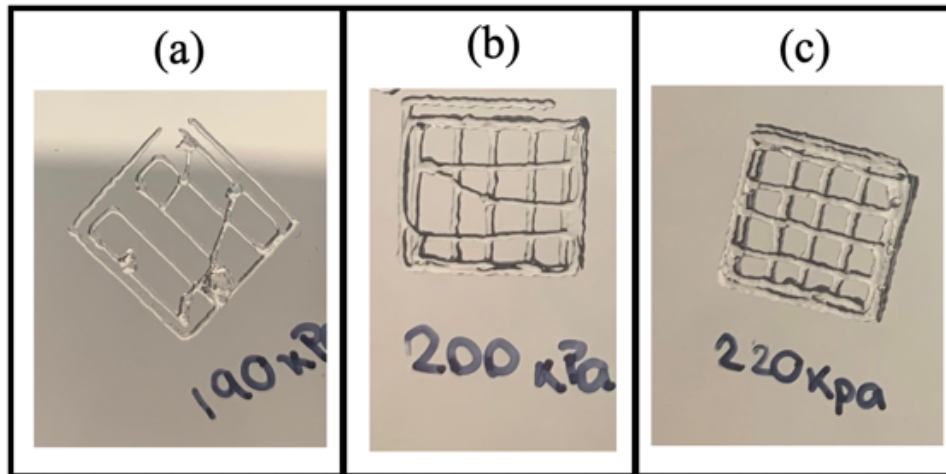


Figure 30. Images représentatives de l'échelle visuelle d'impression. a) représente une mauvaise figure (rouge); b) représente une figure moyenne (jaune) et; c) représente une bonne figure (vert). Les structures imprimées sont de 1 cm x 1 cm.

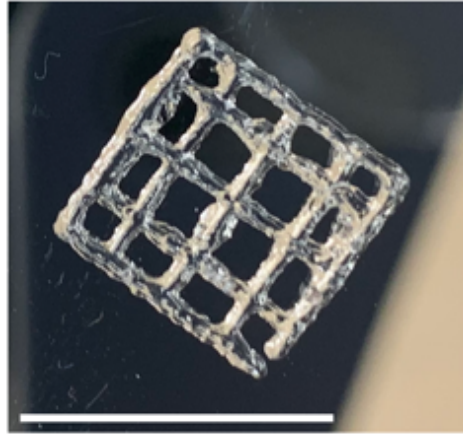


Figure 31. Impression d'une structure de GelMA 10 % dans la plage de bonne impression. Structure de taille 1x1cm. Échelle: 1 cm.

Il a été possible de remarquer que pour différents lots de GelMA, la plage d'imprimabilité variait quelque peu, comme indiqué au tableau 4, qui présente les différentes conditions d'impression pour un lot de GelMA différent. Cela est également un effet qui est rapporté dans la littérature avec l'utilisation de GelMA seul comme matériel d'impression. En effet, il est rapporté qu'avec l'utilisation de faibles concentrations de GelMA, la reproductibilité peut être limitée (Ning et al., 2020). En effet, plusieurs articles se servent de conditions différentes afin d'obtenir le même résultat d'imprimabilité avec une encre composée de GelMA (S. Lee et al., 2020; Ning et al., 2020; Yin et al., 2018). De plus, d'après les résultats obtenus, il a été possible de remarquer que les conditions d'impression variaient dans le temps avec un besoin d'augmenter de la pression lorsque l'encre est refroidie depuis plus longtemps. Cela peut être dû à plusieurs facteurs, incluant le fait qu'étant dépendant de la température, en imprimant GelMA à une température proche du point de gélification, la viscosité de l'encre pourra changer rapidement lors des impressions. Or, malgré ce fait, il est tout de même possible d'imprimer un grand nombre de structures en une vingtaine de minutes. Ainsi, cela ne pose pas de problème pour l'application visée. Or, afin de limiter ce problème le plus possible, la plage finale d'impression a été élargie et la température d'impression a été réduite à 20 °C.

Tableau 4. Plage de pressions permettant une imprimabilité notée comme « bonne » de GelMA 10 % pour les lots 2 et 3 pour différentes vitesses d'impression.

Vitesse (mm/s)	5	8	10
Lot 3	160-180 kPa	150-190kPa	170-180kPa
Lot 2	210-230kPa	210-240kPa	220-250kPa

Ainsi, une fenêtre d'imprimabilité finale plus large, présentée au tableau 5, a été déterminée afin d'obtenir des structures avec une bonne imprimabilité pour l'ensemble des lots testés pour une encre de GelMA 10 %.

Tableau 5. Conditions permettant d'obtenir une bonne structure imprimable.

Température d'impression (°C)	Température de surface d'impression(°C)	Vitesse d'impression (mm/s)	Pression d'impression (kPa)
20	4	5	160-230

4.5.2 Fidélité d'impression

En utilisant cette fenêtre d'imprimabilité, déterminée au tableau 5 afin d'obtenir des structures imprimées, tel que montré à la figure 32, il a été possible de confirmer la fidélité d'impression des structures obtenues. Il a ainsi été possible d'obtenir un indice d'imprimabilité de $Pr = 0,91 \pm 0,04$ ce qui indique une fidélité d'impression élevée, 1 étant une fidélité d'impression parfaite.

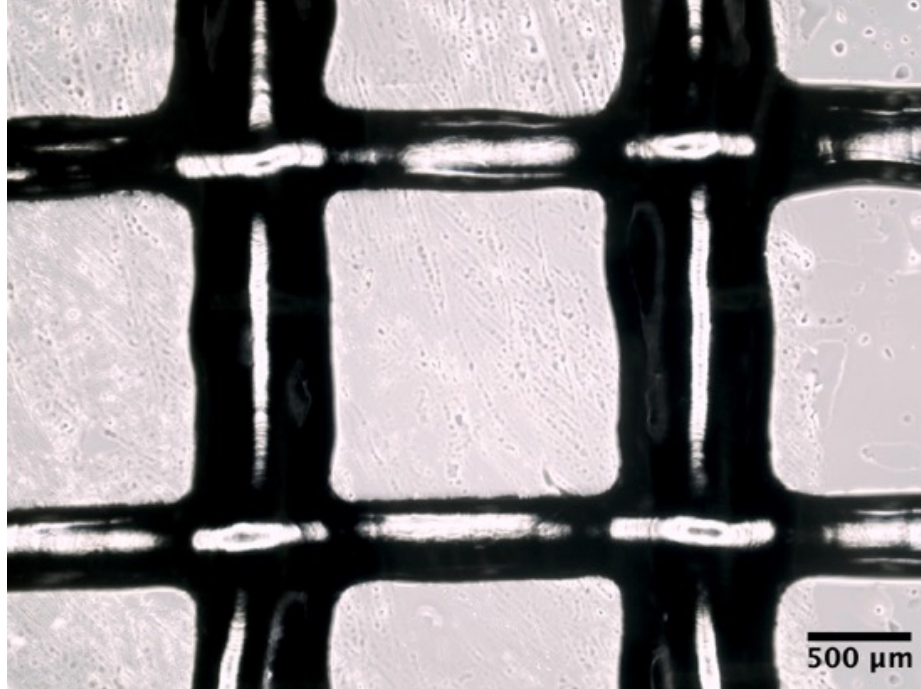


Figure 32. Vue de haut d'une structure imprimée de GelMA 10 % en suivant les conditions d'une bonne plage d'impression.

4.5.3 Imprimabilité coaxiale

Suite au succès de l'impression standard pour une encre de GelMA 10 %, nous avons pu tenter d'utiliser cette encre pour l'impression coaxiale. Or, avec l'appareil utilisé, il n'était pas possible pour le logiciel de reconnaître la tête d'impression à température contrôlable lorsque l'appareil était utilisé en mode coaxial. Cela empêchait le pré-refroidissement de l'encre à 20 °C et la conservation de cette température tout le long du processus d'impression. Ainsi, ne pouvant pas contrôler rigoureusement la température durant le processus, pour l'impression coaxiale, nous avons opté pour le pré-refroidissement des encres à 4°C dans le réfrigérateur suivi de l'impression rapide des encres. Malgré le fait que cette technique ne donne pas une grande fenêtre temporelle d'impression, plusieurs auteurs ont démontré que cette méthode peut être utilisée pour l'impression d'une encre pure de GelMA 5 % (Shao et al., 2020; Y. Wang et al., 2019). Ainsi, en tentant d'optimiser cette nouvelle méthode d'impression, certaines impressions se sont avérées réussies alors que pour d'autres impressions, l'encre sortant de l'aiguille se montrait trop liquide pour maintenir sa forme. Ainsi, avec une concentration de 10 % de

GelMA, cette méthode se montrait très peu répétable. Une des raisons potentielles pourrait être que cela était dû au changement de température rapide qui s'effectue dans l'environnement d'impression. En effet, une fois la seringue sortie du réfrigérateur et insérée dans la machine, elle se trouve à température ambiante, $\sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$, avant de débiter l'impression et tout le long du processus d'impression. De plus, une autre hypothèse était que les forces en jeu lors de l'impression, ainsi que la friction présente dans le système de tubulure coaxial pourraient faire augmenter la chaleur lors de l'impression. Il pourrait également y avoir une augmentation de température lors du temps mort dans le processus d'impression, c'est-à-dire, le temps pendant lequel la solution reste dans le système de tubes liés à l'aiguille coaxiale qui demeure à température ambiante. Ainsi, lors du processus, on passe à une température supérieure au point de gélification, ce qui rend l'encre trop liquide et non imprimable.

Ainsi, afin de résoudre le problème, nous avons tenté de changer le montage utilisé. En effet, tout d'abord, nous avons été en mesure de substituer le montage de manière à inclure la tête d'impression à température contrôlable dans le montage général, comme montré à la figure 17.

Ce changement effectué, quoique suffisant pour permettre de conserver une solution de GelMA semi-gélifiée dans la seringue à une température de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ne s'est pas avérée suffisante pour réduire l'introduction de chaleur dans les autres étapes du processus. Ainsi, le résultat obtenu était similaire, avec l'impression d'une encre trop liquide pour pouvoir former une structure stable sans affaissement constant. Par la suite, nous avons tenté de modifier le montage en ajoutant des gaines conservant la température autour du système de tubes d'impression en plus de pré-refroidir dans le réfrigérateur l'ensemble des aiguilles et tubes. Or, cela s'est également avéré insuffisant pour conserver une basse température lors de l'impression.

Ainsi, il a été possible de remarquer que les modifications effectuées au montage d'impression se montraient insuffisantes pour régler le problème. La prochaine solution visée était alors de modifier l'encre elle-même pour augmenter sa viscosité à température ambiante, afin d'éliminer la nécessité d'avoir un contrôle sur la température lors de

l'impression. En effet, Wang et al., ont utilisé une méthode dans laquelle ils combinaient de la gélatine 8 % et GelMA 8 % et imprimaient dans un bain de glace. Ils notent que l'ajout de gélatine à leur encre permet d'améliorer la fidélité de la forme extrudée (Y. Wang et al., 2019). De plus, Lee et al., ont ajouté de la gélatine à leur encre afin d'agir comme un modificateur rhéologique et ainsi améliorer l'imprimabilité de l'encre (Lee, Sani et al. 2020).

Dans le cas des tests ici, l'ajout de gélatine à l'encre est également la solution qui a été retenue. Ainsi, plusieurs concentrations ont été testées en ajoutant de 1 % à 5 % de gélatine à une encre de GelMA 10 % pour une impression à température ambiante (~ 24 °C). Après avoir testé l'ajout de ces différentes concentrations, une concentration finale de 2 % de gélatine et 10 % de GelMA a été choisie, puisque c'est cette concentration qui permettait une bonne imprimabilité tout en limitant la pression d'extrusion nécessaire (tableau 6). De plus, les paramètres rhéologiques de cette nouvelle encre ont été testés à une température de 24 °C et il a été possible de confirmer l'augmentation de la viscosité de l'encre à température ambiante, comme présenté à la figure 29.

Tableau 6. Pressions nécessaires à l'extrusion d'encres de GelMA 10 % avec plusieurs concentrations de gélatine.

Concentration de gélatine (%)	1	2	3	4	5
Pression (kPa) (externe)	50 Trop liquide	210-280	~380	~550	450 - 550

Suite à la sélection de l'encre de GelMA 10 % et gélatine 2 %, il a été possible d'optimiser à nouveau les paramètres d'impression. Cela est nécessaire puisque les encres sont différentes et les aiguilles utilisées sont également différentes en termes de diamètre et de longueur. Ainsi, la plage d'imprimabilité finale déterminée est présentée au tableau 7. De plus, en imprimant des structures suivant cette plage, il a été possible d'utiliser de l'eau et du colorant alimentaire afin de perfuser les structures obtenues et confirmer la présence de canaux vides, suite à la dissolution de la gélatine des canaux internes. Les résultats obtenus suites à la perfusion manuelle sont présentés à la figure 33, montrant ainsi des canaux remplis de colorants alimentaire rouge.

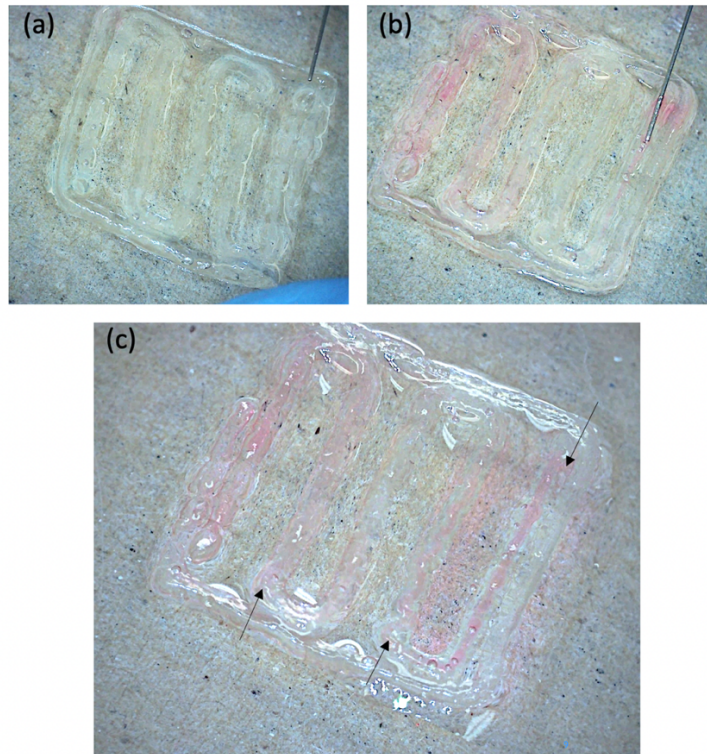


Figure 33. Images tirées d'une vidéo à plusieurs intervalles de temps montrant le processus de perfusion d'une structure de GelMA 10 %, gélatine 2 % et LAP 0,5 %. (a) Structure avec canaux creux. (b) insertion de l'aiguille et début de perfusion. (c) Structure avec canaux creux perfusée, les flèches noires indiquent certains canaux clairement perfusés.

Tableau 7. Conditions permettant d'obtenir une bonne structure coaxiale imprimable.

Vitesse d'impression(mm/s)	Pression interne (gélatine 5 %) (kPa)	Pression externe (gélatine 2 % et GelMA 10 %) (kPa)	Température d'impression (°C)	Température de surface d'impression (°C)
3	140 - 240	150 - 210	24	4

4.6 Viabilité cellulaire

4.6.1 Encapsulation manuelle

Puisque l'encre utilisée pour la bioimpression 3D de structures coaxiales a été complétée avec de la gélatine à 2 %, un test d'encapsulation manuelle a été réalisé afin de reconfirmer la biocompatibilité de l'encre. Les images des gels sont présentées à la figure 34. Alors que les résultats du test de biocompatibilité sont présentés à la figure 35. Ainsi pour ces tests, les gels ont montré une bonne biocompatibilité avec une viabilité cellulaire de $79,8 \pm 10,8$ % et $73,7 \pm 3,9$ % aux temps de 30s et 60s respectivement pour le jour 1 de culture et de $81,6 \pm 7,1$ % et $85,2 \pm 5,4$ % aux temps de 30s et 60s respectivement pour le jour 7 de culture. L'ensemble des résultats sont non statistiquement significatif sauf pour un temps de réticulation de 60s entre les jour 1 et 7, ce qui peut indiquer la présence de prolifération cellulaire avec le temps de culture.

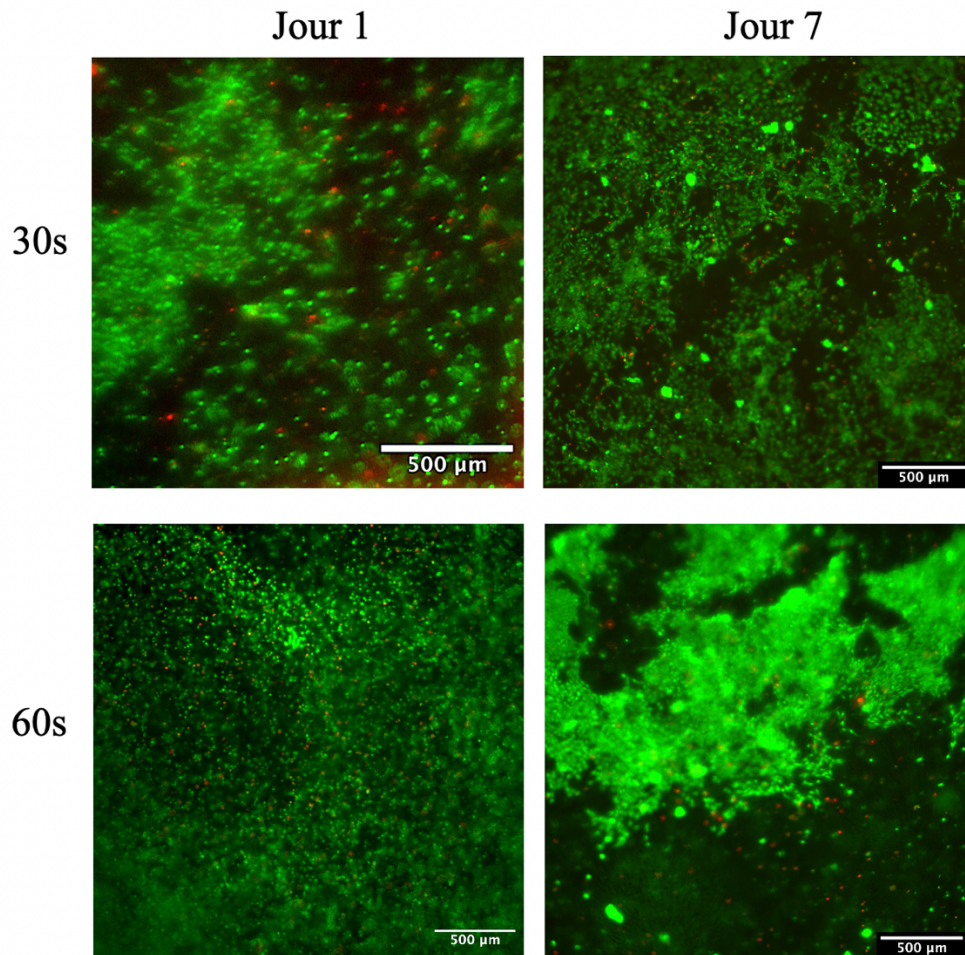


Figure 34. Fibroblastes 3T3 encapsulés dans des gels de 10 % GelMA, 2 % gélatine et 0,5 %LAP pour des temps de 30s et 60s de réticulation aux jours 1 et 7 de culture. La fluorescence verte indique les cellules viables et la fluorescence rouge, les cellules mortes.

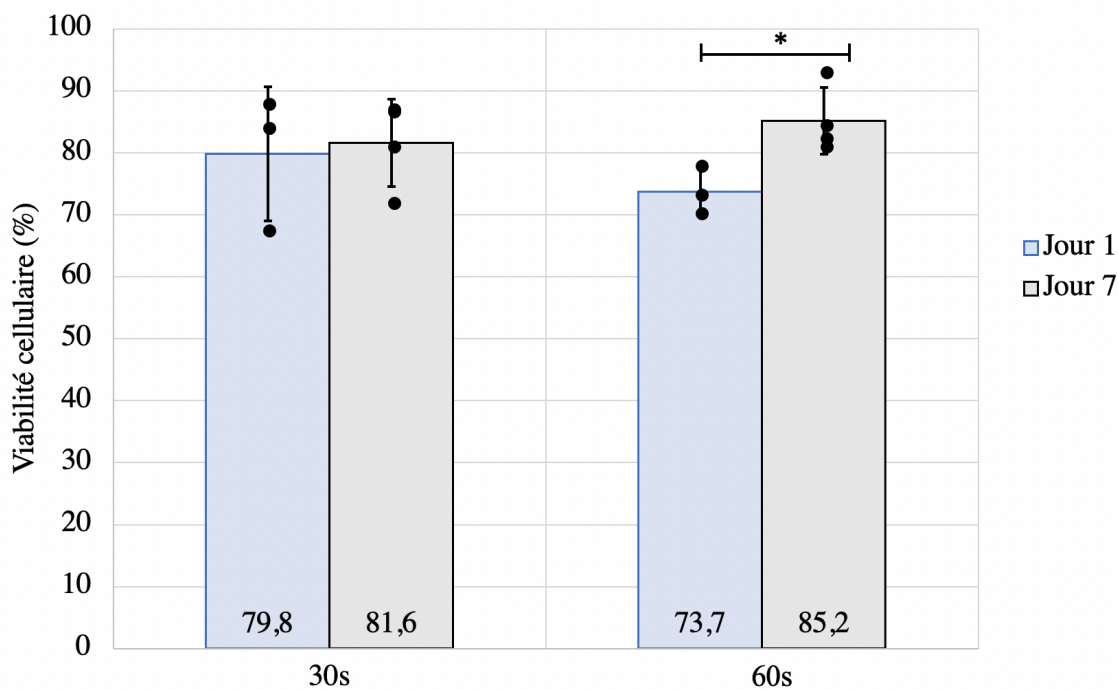


Figure 35. Viabilité de fibroblastes 3T3 encapsulés dans des gels de 10 % GelMA, 2 % gélatine et 0,5 % LAP pour des temps de 30s et 60s de réticulation aux jours 1 et 7 de culture cellulaire.* indique une différence statistiquement significative avec un test de t-Student pour un seuil limite de $p < 0,05$ ($N=1$, $n=>3$).

4.6.2 Bioimpression standard

Suite à la mise en place d'une plage d'imprimabilité permettant d'obtenir des structures standard convenables, des structures encapsulant des fibroblastes 3T3 ont été bioimprimés dans des encres de 10 % GelMA (adéquate en bioimpression standard) avec 0,5 % ou 0,25 % de LAP et réticulés pour 60s. La figure 36 montre une vue de haut de l'impression d'une telle structure à concentration de 0,25 % LAP.

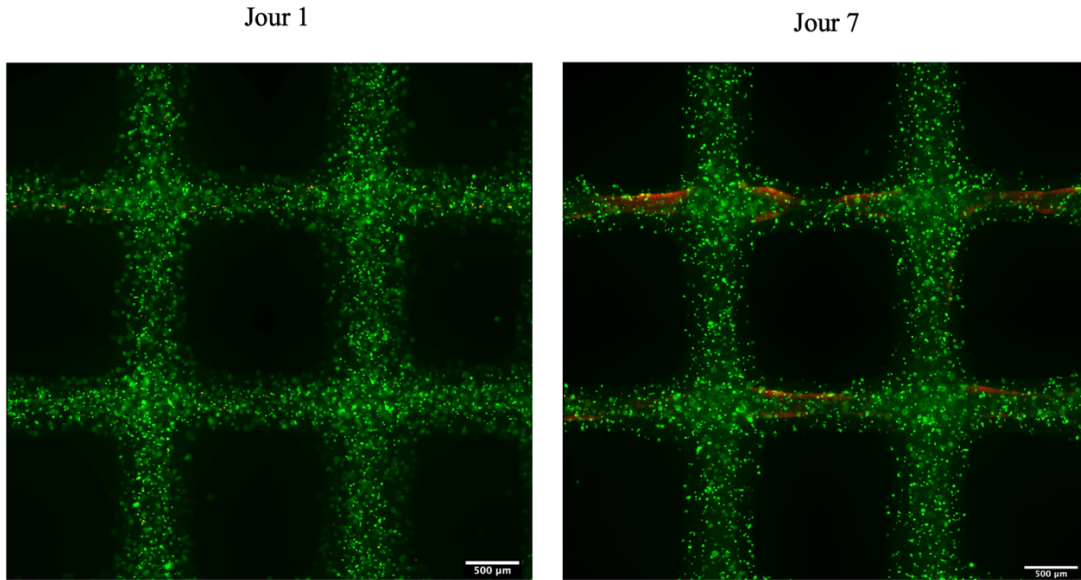


Figure 36. Structures encapsulant des fibroblastes 3T3 bioimprimés en 3D avec une encre de 10 % GelMA et 0,25 % LAP. La fluorescence verte indique les cellules viables et la fluorescence rouge, les cellules mortes.

La viabilité cellulaire a été calculée pour des structures bioimprimées de GelMA 10 % avec 0,25 % et 0,5 % de LAP réticulés pendant 60s afin de s'assurer que la concentration n'aura pas d'effet sur la viabilité lors du processus de bioimpression. La figure 37 présente ces résultats.

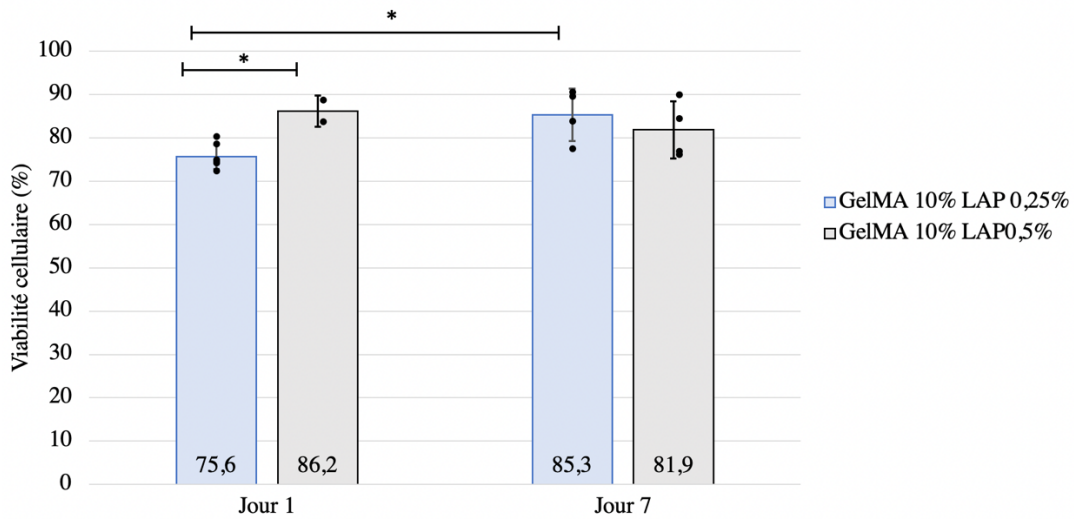


Figure 37. Viabilité cellulaire de fibroblastes 3T3 lors de la bioimpression 3D de 10 % GelMA avec 0,5 % LAP et 0,25 % LAP à un temps de réticulation de 60s aux jours 1 et 7

de culture.* Indique une différence significative par test Student-t à un seuil de $p < 0,05$ ($N = 1, n = > 2$).

Les résultats présentés à la figure 37 indiquent une viabilité de $86,2 \pm 3,6\%$ et $75,6 \pm 2,8\%$ au jour 1 de culture pour des impressions de 10 % GelMA avec 0,5 % et 0,25 % LAP respectivement. Alors qu'au jour 7 de culture, on remarque une viabilité cellulaire de $81,9 \pm 6,6\%$ et $85,3 \pm 6,0\%$ pour les bioencres avec 0,5 % et 0,25 % de LAP respectivement. Cela montre qu'il ne semble pas y avoir d'effet suite à l'augmentation de la concentration de LAP sur la viabilité des structures imprimées. De plus, en comparant ces valeurs à celles de viabilité cellulaire suite à l'encapsulation manuelle présentés à la section 4.3, il ne semble pas y avoir de différence de viabilité cellulaire suivant ce processus d'impression. En effet, en comparant l'utilisation de GelMA 10 % et LAP 0,5 % à un temps de réticulation de 60s, la viabilité obtenue lors de l'encapsulation manuelle au jour 1 est de $83,7 \pm 14,1\%$ et au jour 7, de $92,6 \pm 2,8\%$, ce qui entre ainsi dans la même plage de viabilité des valeurs obtenues pour la bioimpression. Ainsi, la viabilité suite à la bioimpression 3D des structures reste élevée. Par comparaison statistique générale, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les groupes ($p > 0,05$). Or, malgré le fait que pour les jours 1 et 7 de culture avec une concentration de LAP de 0,25 %, il y a différence significative, en considérant l'ensemble des données de manière générale, la concentration de LAP et le jour de culture n'ont pas eu d'effet significatif sur la viabilité cellulaire.

4.6.3 Bioimpression coaxiale

Finalement, à l'aide de deux encres, une de gélatine 5 % et une de GelMA 10 %/gélatine 2 % et LAP0,5 %, il a été possible d'imprimer des structures coaxiales avec des canaux internes vides. La figure 38 présente ces structures.

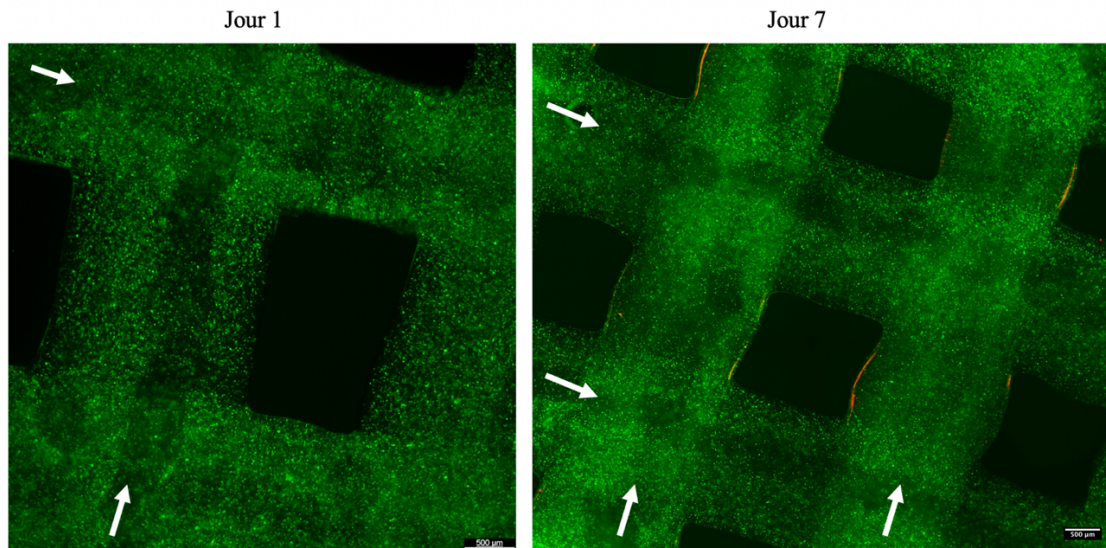


Figure 38. Structures coaxiales avec canal interne vide encapsulant des fibroblastes 3T3 bioimprimés en 3D avec une encre externe de 10 % GelMA, gélatine 2 % et 0,5 % LAP et une encre interne de 5 % gélatine. La fluorescence verte indique les cellules viables et la fluorescence rouge, les cellules mortes. Les flèches blanches indiquent les canaux creux.

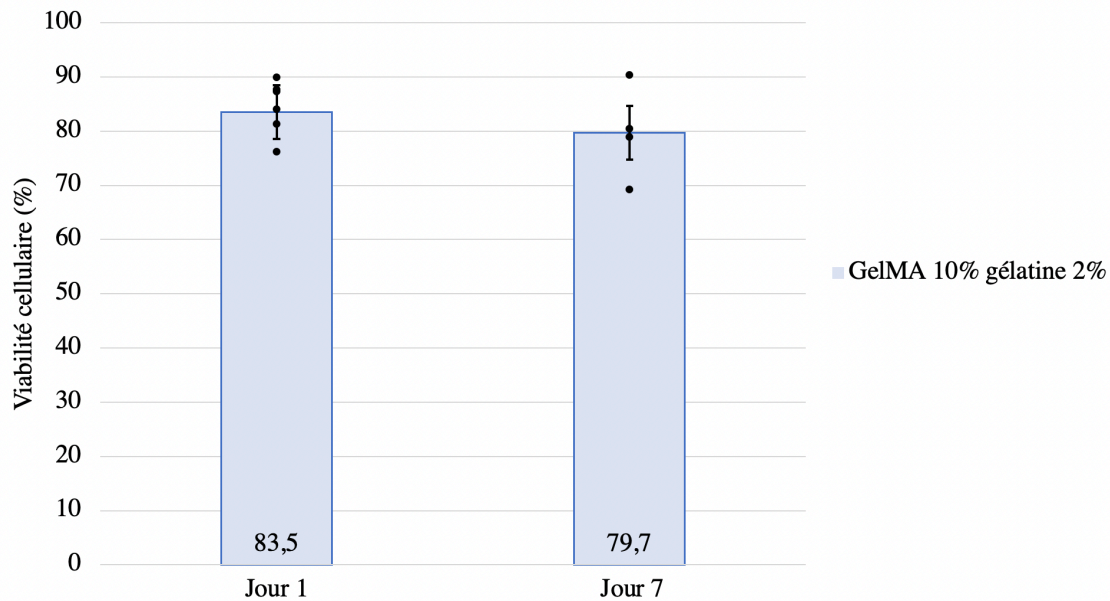


Figure 39. Viabilité cellulaire de fibroblastes 3T3 lors de la bioimpression 3D de structures coaxiales avec une encre externe de 10 % GelMA, gélatine 2 % et 0,5 % LAP et une encre interne de 5 % gélatine à un temps de réticulation de 60s aux jours 1 et 7 de culture. Pas de différence significative avec un test Student-t au seuil $p < 0,05$ ($N=1$, $n \geq 4$).

À la figure 38, il est possible de remarquer que le centre des canaux est d'une couleur fluorescente moins intense que le reste des canaux, mais plus intense que l'absence de fluorescence des pores, ce qui montre la présence de canaux creux (indiqué par des flèches blanches). En effet, puisque le microscope utilisé n'était pas confocal, l'observation des canaux n'était possible qu'en remarquant la différence d'intensité de fluorescence pour chaque image.

De plus, l'impression de telles structures a pu démontrer l'utilisation d'encres de GelMA-gélatine afin de bioimprimer des structures coaxiales à viabilité cellulaire élevée, comme présenté à la figure 39. En effet, avec de telles structures, une viabilité de $83,5 \pm 5,7$ % et $79,7 \pm 8,7$ % a été obtenue aux jours 1 et 7 de culture respectivement. En comparant la viabilité de la bioimpression aux données d'encapsulation manuelle de GelMA 10 %, gélatine 2 % et LAP 0,5 % à 60s de réticulation qui sont respectivement de $73,7 \pm 3,9$ % et $85,2 \pm 5,4$ % pour les jours 1 et 7 de culture, il est possible de dire que la viabilité cellulaire

reste élevée dans tous les cas, sans différence significative entre les jours 1 et 7 de culture cellulaire.

Or, de manière générale, pour la bioimpression 3D de structures, il est possible d'observer davantage de mort cellulaire sur les côtés des structures, ce qui peut potentiellement être expliqué par le fait que c'est la région qui subit le cisaillement le plus intense lors de l'extrusion.

5 Discussion générale

Dans le cadre de ce travail, trois différents objectifs ont pu être réalisés. Tout d'abord, une encre à base de GelMA a pu être synthétisée et caractérisée afin d'être utilisée comme matériau pour imprimer un patch pour le tissu cardiaque. En effet, GelMA a pu être synthétisé avec un DoM élevé, 89 ± 2 %, de manière assez répétable pour plusieurs lots. De plus, étant donné que la modification de la concentration de l'encre, du photo initiateur et des paramètres de photo réticulations utilisés peuvent influencer les propriétés mécaniques de la structure finale (Aldana, Valente, Dilley, & Doyle, 2021; Young et al., 2020), les paramètres idéaux ont pu être déterminés. De plus, puisque certains de ces mêmes paramètres peuvent affecter la viabilité cellulaire en induisant potentiellement un effet toxique pour les cellules, ceux-ci ont été testés afin de s'assurer de la biocompatibilité de l'encre choisie (Koti et al., 2019; Shao et al., 2020; Yin et al., 2018).

Par la suite, après avoir choisi une encre finale de GelMA 10 % pour l'impression standard de structures, l'imprimabilité de l'encre a pu être évaluée et optimisée en fonction de deux paramètres : le comportement rhéologique de GelMA et sa plage d'imprimabilité. Ces paramètres ont également pu être évalués afin d'utiliser GelMA comme encre pour une impression coaxiale. Or, en ce qui concerne l'impression de structures coaxiale, il a été montré avec les résultats obtenus que dû à la variabilité de la viscosité de GelMA avec la température et temporellement, il ne s'avérait pas assez répétable d'utiliser GelMA seul comme matériau pour l'impression coaxiale. De plus, avec l'utilisation d'un montage complexe avec des tubulures plus longues et l'absence de contrôle rigoureux sur la température, la répétabilité diminuait encore plus. Ainsi, en se basant sur des études ayant montré l'efficacité de l'ajout de la gélatine pour améliorer l'imprimabilité d'une encre (S. Lee et al., 2020; Y. Wang et al., 2019), une encre de GelMA 10 % et gélatine 2 % a pu être utilisée afin d'améliorer l'imprimabilité de structures coaxiales à température ambiante. Suite à l'ajout de la gélatine, les paramètres d'impression ont pu être optimisés à nouveau pour obtenir des structures pouvant être perfusées.

Finalement, en utilisant les paramètres d'impression préalablement optimisés, il a été possible de bioimprimer des patches standard et coaxiaux à base, respectivement, de

GelMA 10 % et GelMA 10 %/gélatine 2 % encapsulant des fibroblastes NIH 3T3 à haute viabilité cellulaire.

Il est à noter que dans le cadre de ce travail, le module de Young du matériau seul a été évalué puisque la valeur obtenue a été utilisée afin de déterminer les concentrations de matériaux et paramètres de réticulations qui seront utilisés pour obtenir des valeurs similaires au tissu natif. Or, afin de compléter rigoureusement l'évaluation des propriétés mécaniques des structures imprimées, il pourrait également s'avérer adéquat de réaliser un test d'évaluation du module de Young par compression des structures post impression. De cette manière, les propriétés mécaniques tiennent en compte les pores des patchs résultants. Également, dans le cas des structures coaxiales, la gélatine utilisée autant dans l'encre externe que dans l'encre interne est enlevée de la structure finale par dissolution. Ainsi, cela augmenterait le nombre de pores dans les filaments externes, ce qui combiné aux canaux vides, pourrait affecter les propriétés mécaniques de la structure finale. Cela fait en sorte que l'évaluation des propriétés des structures post impression s'avère particulièrement pertinent. Or, en ajoutant de la gélatine aux encres, ainsi introduisant des pores, il se peut que l'apport en oxygène et nutriments à différents endroits de la structure soit facilitée, ce qui serait favorable à la viabilité cellulaire (Yin et al., 2018).

Également, dans le cas de l'impression de structures coaxiales lors de ce travail, peu de couches ont été imprimées. En effet, l'épaisseur finale du patch visée pouvant être variable, seulement un nombre suffisant de couches ont été imprimées afin de démontrer la possibilité de l'utilisation de cette méthode pour imprimer un patch. Cela est également le cas pour les structures coaxiales, puisque ce travail s'est concentré sur la démonstration et l'optimisation des paramètres permettant d'imprimer des structures à canaux vides. Ainsi, cela ayant pu être démontré, une structure plus épaisse pourra être imprimée par la suite. De plus, il est à noter que pour des fins de première optimisation, une taille assez large de diamètre d'aiguille a été utilisée pour les structures coaxiales (20G-16G), ce qui devra être ajusté pour des utilisations futures puisque la limite de diffusion de l'oxygène est de l'ordre de 200 μm (Shao et al., 2020). Ainsi, afin de s'assurer que toutes les cellules de la structure imprimée soient en contact ou à proximité des canaux, il faudrait avoir des tailles d'aiguilles plus petites permettant la diffusion de l'oxygène à tout endroit de la structure.

Des aiguilles de plus petits diamètres pourraient alors être utilisés suivant ce même processus, mais en modifiant les pressions d'extrusion.

Or, comme il a été montré par Koti et al. les paramètres d'impression utilisés risquent d'avoir un effet plus ou moins prononcé sur certains types cellulaires (Koti et al., 2019). Ainsi, afin de s'assurer de la compatibilité du processus pour le tissu cardiaque, il faudra répéter les tests de biocompatibilité et bioimpression pour les types cellulaires spécifiques tels les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques.

Globalement on observe une viabilité cellulaire aussi élevée pour l'impression 3D de structures que pour l'encapsulation manuelle. Par exemple, la viabilité lors de l'encapsulation manuelle de GelMA 10 % et gélatine 2 % au jour 1 à 60s était de $73,7 \pm 3,9$ % et au jour 7 de $85,2 \pm 5,4$ % alors que la viabilité dans les mêmes conditions pour l'impression coaxiale était de $79,7 \pm 8,7$ % et $83,5 \pm 5,7$ % aux jours 1 et 7 respectivement. Cela consiste en un résultat assez inattendu, puisque la contrainte appliquée aux cellules lors du processus d'impression est généralement rapportée comme augmentant la mort cellulaire (Alonzo et al., 2019; Rider et al., 2018). Une tendance générale observée suite à la bioimpression est que malgré la viabilité cellulaire élevée pour l'ensemble des structures bioimprimées, il y a davantage de mort cellulaire sur les côtés des filaments. Ceci est prévisible considérant la distribution de contrainte de cisaillement dans une aiguille, c'est-à-dire nulle au centre et maximum aux parois. Il est à noter que pour certaines images, il était difficile de repérer adéquatement certaines cellules mortes dans les images de marquage par ethidium homodimer-1 puisque la structure en entier absorbait le colorant, incluant les surfaces sans cellules, ce qui rendait la visibilité difficile. Ainsi, un autre type de test de viabilité cellulaire, tel le test MTT, ou un autre type de marquage pourrait être utilisé pour compléter les résultats obtenus ici.

De plus, à la suite de l'ajout de 2 % de gélatine dans l'encre de 10 % GelMA, il a été possible de remarquer à l'encapsulation manuelle une viabilité cellulaire légèrement inférieure aux valeurs de viabilité cellulaire obtenues pour les tests de biocompatibilités de GelMA seul. En effet, une viabilité de $79,8 \pm 10,8$ % et $73,7 \pm 3,9$ % aux temps de réticulation de 30s et 60s ont été obtenus respectivement pour le jour 1 de culture d'une encapsulation

de GelMA 10 %, gélatine 2 % et LAP0,5 %. Alors qu'une viabilité de $90,0 \pm 8,0$ % et $83,7 \pm 14,1$ % aux temps de réticulation de 30s et 60s ont été obtenus respectivement pour le jour 1 de culture d'une encapsulation de GelMA 10 %, LAP0,5 %. Or, il est rapporté dans la littérature que la gélatine est un matériel favorisant l'adhésion et l'étalement cellulaire (Yin et al., 2018). Ainsi l'inconsistance de ces résultats peut être expliquée par le fait qu'il ait été difficile de quantifier la viabilité cellulaire lors de l'encapsulation, puisque la superposition de beaucoup de cellules sur plusieurs couches d'épaisseur rendait la visibilité au microscope difficile. De plus, la gélatine n'étant pas réticulée, elle peut se dissoudre dans le média et la solution de marquage, ce qui peut embrouiller davantage les images de microscopie.

Au niveau de l'étude statistique réalisée, il est possible de remarquer que pour certains tests, il était difficile d'obtenir un grand nombre d'échantillons, ce qui a pu être causé par plusieurs difficultés telles la quantité limitée de matériel, la contamination cellulaire, etc. Par exemple, pour le test de viabilité des fibroblastes encapsulés dans des gels de GelMA 10% et LAP 0,25% (figure 27), seulement deux échantillons ont pu être testés. Il pourrait ainsi s'avérer pertinent de réaliser à nouveau certaines manipulations dans des travaux futurs pour venir renforcer l'étude statistique. De plus, un autre facteur qui a pu venir influencer le résultat des tests statistique est la large répartition des données (écart-type large) pour certaines valeurs.

Ainsi, en se distinguant de l'étude menée par Shao et al. (2020) l'étude réalisée ici est en mesure de produire des structures coaxiales suivant une méthode légèrement différente et ayant des propriétés adéquates pour le tissu cardiaque. En effet, Shao et al. ont été en mesure d'utiliser une encre externe de GelMA 5 % et une encre interne de gélatine 5 % afin d'obtenir des structures creuses ayant un module de Young de 1 à 6 kPa (Shao et al., 2020). Or, ici, en utilisant des encres strictement composées de gélatine et son dérivé (GelMA), il a été possible d'optimiser un processus permettant d'imprimer des structures coaxiales adéquates pour le tissu cardiaque, avec module de Young plus élevé. De plus, l'étude menée ici se distingue de celle menée par Yin et al. (2018) qui ont utilisé une encre de gélatine 8% et GelMA 5% avec une méthode de double réticulation lumineuse et

thermique combinée afin d'imprimer des structures (Yin et al., 2018). En effet, ici, la principale distinction est que, malgré l'utilisation de mêmes matériaux, à concentrations différentes, nous avons introduit l'utilisation d'un montage coaxial afin d'obtenir des structures avec filament creux essentiel pour la perfusion, ce qui a été réalisé avec succès.

6 Travaux futurs

Puisque la technique optimisée dans le cadre de cette étude s'est montrée réussie, il pourrait s'avérer pertinent de continuer les travaux en imprimant des patchs cardiaques d'épaisseur plus élevée. De plus, comme mentionné précédemment, l'aiguille coaxiale utilisée ne permettait que d'imprimer des structures avec des canaux internes de larges diamètres. Il pourrait ainsi s'avérer pertinent de démontrer l'utilisation de cette même technique utilisée ici en réduisant la taille des aiguilles coaxiales utilisées. Ainsi, une optimisation additionnelle devra être nécessaire.

De plus, ce travail a pu se concentrer sur tout le développement et la caractérisation de matériel afin d'imprimer des patchs qui peuvent être perfusés. Ainsi d'une certaine manière, le travail a permis l'impression de patchs montrant un système de macrovasculature. Or, afin de conclure que les patchs sont bel et bien vascularisés complètement, il s'avère nécessaire d'inclure un système vasculaire créé par les cellules elles-mêmes. Ainsi, afin de continuer ce travail, toujours dans le secteur cardiaque, il pourrait s'avérer nécessaire d'utiliser de multiples types cellulaires dans la bioimpression. Ainsi, des CMs pourraient être inclus dans l'encre externe (GelMA et gélatine) afin de fonctionnaliser le tissu et des HUVECs, CFs et des cellules périvasculaires pourraient être ajoutées à l'encre interne (gélatine). Ces cellules incluent dans l'encre interne permettraient le développement du système vasculaire. Ainsi, il y aurait autant la fonctionnalité cardiaque du tissu que la possibilité de développer un système micro vasculaire complet avec des cellules vasculaires incluses dans l'encre interne et qui viendraient revêtir la paroi interne des canaux créés. Finalement l'utilisation de ces types cellulaires pourraient être caractérisée davantage avec des marquages cellulaires spécifiques tels des marquages de noyaux (DAPI), CD31 et F-actinine afin d'observer plus précisément la morphologie des cellules lors de culture *in vitro*. De plus, l'étape importante de la démonstration de la fonctionnalité de battement des CMs présente en culture *in vitro* pourrait être réalisée.

Par la suite, il sera possible de passer à l'étape de tests *in vivo* avec l'implantation du patch développé dans des modèles animaux afin de caractériser le résultat de l'implantation à moyen et long terme et s'assurer d'une bonne intégration avec le tissu de l'hôte.

7 Conclusion

Dans le cadre de ce travail, il a été possible de démontrer l'utilisation d'une encre synthétisée au laboratoire à base de GelMA afin de bioimprimer des structures pouvant être utilisées comme patches perfusables pour le tissu cardiaque.

Il a été possible de déterminer qu'une encre à formulation de 10 % GelMA et 0,25 % à 0,5 % de LAP était adéquate pour le tissu cardiaque à la suite de l'évaluation des propriétés mécaniques et de la biocompatibilité du matériau. Cette encre a été par la suite investiguée afin de déterminer les paramètres d'impression optimaux. Finalement, cette encre de GelMA 10 % a pu être utilisée afin de bioimprimer des structures encapsulant des fibroblastes 3T3 à une viabilité cellulaire jusqu'à $86,2 \pm 3,6$ % au jour 1 de culture et $85,3 \pm 6,0$ % au jour 7 de culture. Par la suite, cette encre, suivant l'ajout de 2 % de gélatine, a pu être utilisée et optimisée comme encre externe dans un nouveau montage coaxial afin d'imprimer des structures creuses avec une viabilité cellulaire élevée. Pour ce faire, une encre de gélatine 5 % a également été ajoutée comme encre interne dans ce montage coaxial pour permettre la formation de canaux creux, et ainsi permettre la perfusion, suite à sa dissolution post impression. En effet, ayant été en mesure d'imprimer des structures coaxiales avec des canaux vides avec une viabilité de $83,5 \pm 5,7$ % après une semaine de culture pour des fibroblastes 3T3, il a pu être démontré que cette encre, suivant le processus d'impression optimisé, peut être utilisé plus spécifiquement pour une application dans le tissu cardiaque.

Bibliographie

- Adhikari, J., Perwez, M. S., Das, A., & Saha, P. (2021). Development of hydroxyapatite reinforced alginate–chitosan based printable biomaterial-ink. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 25, 100630. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2020.100630>
- Ahadian, S., Savoji, H., & Khademhosseini, A. (2018). Recent advances in hydrogels for tissue engineering. *Chemical Engineering Progress*, 114(5), 56-63.
- Aldana, A. A., Valente, F., Dilley, R., & Doyle, B. (2021). Development of 3D bioprinted GelMA-alginate hydrogels with tunable mechanical properties. *Bioprinting*, 21, e00105. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00105>
- Alonzo, M., AnilKumar, S., Roman, B., Tasnim, N., & Joddar, B. (2019). 3D Bioprinting of cardiac tissue and cardiac stem cell therapy. *Translational Research*, 211, 64-83.
- Ashammakhi, N., Tavafoghi, M., Jafari, A., Kalva, S. N., Augustine, R., Hasan, A., . . . Li, S. (2022). Electrospinning and Three-Dimensional (3D) Printing for Biofabrication. In *Electrospun Nanofibers* (pp. 555-604): Springer.
- Barrs, R. W., Jia, J., Silver, S. E., Yost, M., & Mei, Y. (2020). Biomaterials for Bioprinting Microvasculature. *Chem Rev*, 120(19), 10887-10949. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00027
- Bedell, M. L., Navara, A. M., Du, Y., Zhang, S., & Mikos, A. G. (2020). Polymeric Systems for Bioprinting. *Chemical Reviews*, 120(19), 10744-10792. doi:10.1021/acs.chemrev.9b00834
- Bejleri, D., Streeter, B. W., Nachlas, A. L., Brown, M. E., Gaetani, R., Christman, K. L., & Davis, M. E. (2018). A bioprinted cardiac patch composed of cardiac-specific extracellular matrix and progenitor cells for heart repair. *Advanced healthcare materials*, 7(23), 1800672.
- Birla, R. K., & Williams, S. K. (2020). 3D bioprinting and its potential impact on cardiac failure treatment: An industry perspective. *APL Bioengineering*, 4(1), 010903. doi:10.1063/1.5128371
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307. doi:10.1038/nature10144
- Cooke, M. E., & Rosenzweig, D. H. (2021). The rheology of direct and suspended extrusion bioprinting. *APL Bioengineering*, 5(1), 011502. doi:10.1063/5.0031475
- Cui, H., Liu, C., Esworthy, T., Huang, Y., Yu, Z. X., Zhou, X., . . . Zhang, L. G. (2020). 4D physiologically adaptable cardiac patch: A 4-month in vivo study for the treatment of myocardial infarction. *Sci Adv*, 6(26), eabb5067. doi:10.1126/sciadv.abb5067
- Cui, X., Li, J., Hartanto, Y., Durham, M., Tang, J., Zhang, H., . . . Woodfield, T. (2020). Advances in extrusion 3D bioprinting: a focus on multicomponent hydrogel-based bioinks. *Advanced healthcare materials*, 9(15), 1901648.
- Fakhrudin, K., Razak, S. I. A., Nayan, N. H. M., & Kadir, M. R. A. (2020). 3D Bioprinting of a Tissue Engineered Human Heart. In *Cardiovascular Engineering* (pp. 243-259): Springer.

- French, K. M., Boopathy, A. V., DeQuach, J. A., Chingozha, L., Lu, H., Christman, K. L., & Davis, M. E. (2012). A naturally derived cardiac extracellular matrix enhances cardiac progenitor cell behavior in vitro. *Acta Biomater*, *8*(12), 4357-4364. doi:10.1016/j.actbio.2012.07.033
- Gaetani, R., Yin, C., Srikumar, N., Braden, R., Doevendans, P. A., Sluijter, J. P., & Christman, K. L. (2016). Cardiac-Derived Extracellular Matrix Enhances Cardiogenic Properties of Human Cardiac Progenitor Cells. *Cell Transplant*, *25*(9), 1653-1663. doi:10.3727/096368915x689794
- Gao, G., Schilling, A. F., Hubbell, K., Yonezawa, T., Truong, D., Hong, Y., . . . Cui, X. (2015). Improved properties of bone and cartilage tissue from 3D inkjet-bioprinted human mesenchymal stem cells by simultaneous deposition and photocrosslinking in PEG-GelMA. *Biotechnol Lett*, *37*(11), 2349-2355. doi:10.1007/s10529-015-1921-2
- Gungor-Ozkerim, P. S., Inci, I., Zhang, Y. S., Khademhosseini, A., & Dokmeci, M. R. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials Science*, *6*(5), 915-946. doi:10.1039/C7BM00765E
- Jafari, A., Ajji, Z., Mousavi, A., Naghieh, S., Bencherif, S. A., & Savoji, H. (2022). Latest Advances in 3D Bioprinting of Cardiac Tissues. *Advanced Materials Technologies*, 2101636.
- Jia, W., Gungor-Ozkerim, P. S., Zhang, Y. S., Yue, K., Zhu, K., Liu, W., . . . Khademhosseini, A. (2016). Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials*, *106*, 58-68. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.038>
- Joshi, A., Choudhury, S., Gugulothu, S. B., Visweswariah, S. S., & Chatterjee, K. (2022). Strategies to Promote Vascularization in 3D Printed Tissue Scaffolds: Trends and Challenges. *Biomacromolecules*, *23*(7), 2730-2751. doi:10.1021/acs.biomac.2c00423
- Kim, J. J., Hou, L., & Huang, N. F. (2016). Vascularization of three-dimensional engineered tissues for regenerative medicine applications. *Acta Biomaterialia*, *41*, 17-26. doi:<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.001>
- Koti, P., Muselimyan, N., Mirdamadi, E., Asfour, H., & Sarvazyan, N. A. (2019). Use of GelMA for 3D printing of cardiac myocytes and fibroblasts. *J 3D Print Med*, *3*(1), 11-22. doi:10.2217/3dp-2018-0017
- Lee, A., Hudson, A. R., Shiwarski, D. J., Tashman, J. W., Hinton, T. J., Yerneni, S., . . . Feinberg, A. W. (2019). 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart. *Science*, *365*(6452), 482-487. doi:doi:10.1126/science.aav9051
- Lee, S., Sani, E. S., Spencer, A. R., Guan, Y., Weiss, A. S., & Annabi, N. (2020). Human-recombinant-Elastin-based bioinks for 3D bioprinting of vascularized soft tissues. *Advanced Materials*, *32*(45), 2003915.
- Lee, S. C., Gillispie, G., Prim, P., & Lee, S. J. (2020). Physical and Chemical Factors Influencing the Printability of Hydrogel-based Extrusion Bioinks. *Chemical Reviews*, *120*(19), 10834-10886. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00015
- Liu, F., Chen, Q., Liu, C., Ao, Q., Tian, X., Fan, J., . . . Wang, X. (2018). Natural Polymers for Organ 3D Bioprinting. *Polymers*, *10*(11), 1278. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4360/10/11/1278>

- Liu, W., Zhong, Z., Hu, N., Zhou, Y., Maggio, L., Miri, A. K., . . . Zhang, Y. S. (2018). Coaxial extrusion bioprinting of 3D microfibrinous constructs with cell-favorable gelatin methacryloyl microenvironments. *Biofabrication*, *10*(2), 024102.
- McMahan, S., Taylor, A., Copeland, K. M., Pan, Z., Liao, J., & Hong, Y. (2020). Current advances in biodegradable synthetic polymer based cardiac patches. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *108*(4), 972-983.
- Mota, C., Camarero-Espinosa, S., Baker, M. B., Wieringa, P., & Moroni, L. (2020). Bioprinting: From Tissue and Organ Development to in Vitro Models. *Chemical Reviews*, *120*(19), 10547-10607. doi:10.1021/acs.chemrev.9b00789
- Mousavi, A., Stefanek, E., Jafari, A., Ajji, Z., Naghieh, S., Akbari, M., & Savoji, H. (2022). Tissue-engineered heart chambers as a platform technology for drug discovery and disease modeling. *Biomaterials Advances*, 212916.
- Ning, L., Mehta, R., Cao, C., Theus, A., Tomov, M., Zhu, N., . . . Serpooshan, V. (2020). Embedded 3D bioprinting of gelatin methacryloyl-based constructs with highly tunable structural fidelity. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *12*(40), 44563-44577.
- Noor, N., Shapira, A., Edri, R., Gal, I., Wertheim, L., & Dvir, T. (2019). 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts. *Advanced science*, *6*(11), 1900344.
- O'Connell, C. D., Konate, S., Onofrillo, C., Kapsa, R., Baker, C., Duchi, S., . . . Wallace, G. G. (2020). Free-form co-axial bioprinting of a gelatin methacryloyl bio-ink by direct in situ photo-crosslinking during extrusion. *Bioprinting*, *19*, e00087. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00087>
- Osi, A. R., Zhang, H., Chen, J., Zhou, Y., Wang, R., Fu, J., . . . Zhong, Q. (2021). Three-Dimensional-Printable Thermo/Photo-Cross-Linked Methacrylated Chitosan-Gelatin Hydrogel Composites for Tissue Engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *13*(19), 22902-22913. doi:10.1021/acsami.1c01321
- Osidak, E. O., Kozhukhov, V. I., Osidak, M. S., & Domogatsky, S. P. (2020). Collagen as Bioink for Bioprinting: A Comprehensive Review. *Int J Bioprint*, *6*(3), 270. doi:10.18063/ijb.v6i3.270
- Ouyang, L., Armstrong, J. P. K., Lin, Y., Wojciechowski, J. P., Lee-Reeves, C., Hachim, D., . . . Stevens, M. M. (2020). Expanding and optimizing 3D bioprinting capabilities using complementary network bioinks. *Science Advances*, *6*(38), eabc5529. doi:10.1126/sciadv.abc5529
- Ouyang, L., Yao, R., Zhao, Y., & Sun, W. (2016). Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*, *8*(3), 035020.
- Puluca, N., Lee, S., Doppler, S., Münsterer, A., Dreßen, M., Krane, M., & Wu, S. M. (2019). Bioprinting Approaches to Engineering Vascularized 3D Cardiac Tissues. *Curr Cardiol Rep*, *21*(9), 90. doi:10.1007/s11886-019-1179-8
- Qasim, M., Haq, F., Kang, M.-H., & Kim, J.-H. (2019). 3D printing approaches for cardiac tissue engineering and role of immune modulation in tissue regeneration. *International journal of nanomedicine*, *14*, 1311.

- Qasim, M., Haq, F., Kang, M. H., & Kim, J. H. (2019). 3D printing approaches for cardiac tissue engineering and role of immune modulation in tissue regeneration. *Int J Nanomedicine*, *14*, 1311-1333. doi:10.2147/ijn.S189587
- Reis, L. A., Chiu, L. L., Feric, N., Fu, L., & Radisic, M. (2016). Biomaterials in myocardial tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *10*(1), 11-28.
- Richards, D., Jia, J., Yost, M., Markwald, R., & Mei, Y. (2017). 3D Bioprinting for Vascularized Tissue Fabrication. *Ann Biomed Eng*, *45*(1), 132-147. doi:10.1007/s10439-016-1653-z
- Rider, P., Kačarević, Ž. P., Alkildani, S., Retnasingh, S., & Barbeck, M. (2018). Bioprinting of tissue engineering scaffolds. *Journal of Tissue Engineering*, *9*, 2041731418802090. doi:10.1177/2041731418802090
- Savoji, H., Davenport Huyer, L., Mohammadi, M. H., Lun Lai, B. F., Rafatian, N., Bannerman, D., . . . Radisic, M. (2020). 3D printing of vascular tubes using bioelastomer prepolymers by freeform reversible embedding. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *6*(3), 1333-1343.
- Savoji, H., Mohammadi, M. H., Rafatian, N., Toroghi, M. K., Wang, E. Y., Zhao, Y., . . . Radisic, M. (2019). Cardiovascular disease models: a game changing paradigm in drug discovery and screening. *Biomaterials*, *198*, 3-26.
- Schwab, A., Levato, R., D'Este, M., Piluso, S., Eglin, D., & Malda, J. (2020). Printability and shape fidelity of bioinks in 3D bioprinting. *Chemical reviews*, *120*(19), 11028-11055.
- Shao, L., Gao, Q., Xie, C., Fu, J., Xiang, M., & He, Y. (2020). Directly coaxial 3D bioprinting of large-scale vascularized tissue constructs. *Biofabrication*, *12*(3), 035014. doi:10.1088/1758-5090/ab7e76
- Sharma, D., Ferguson, M., Kamp, T. J., & Zhao, F. (2019). Constructing biomimetic cardiac tissues: a review of scaffold materials for engineering cardiac patches. *Emergent materials*, *2*(2), 181-191.
- Sun, A., He, X., Ji, X., Hu, D., Pan, M., Zhang, L., & Qian, Z. (2021). Current research progress of photopolymerized hydrogels in tissue engineering. *Chinese Chemical Letters*, *32*(7), 2117-2126. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2021.01.048>
- Theus, A. S., Tomov, M. L., Cetnar, A., Lima, B., Nish, J., McCoy, K., . . . Serpooshan, V. (2019). Biomaterial approaches for cardiovascular tissue engineering. *Emergent Materials*, *2*(2), 193-207. doi:10.1007/s42247-019-00039-3
- Unagolla, J. M., & Jayasuriya, A. C. (2020). Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. *Applied Materials Today*, *18*, 100479. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100479>
- Vunjak-Novakovic, G., Tandon, N., Godier, A., Maidhof, R., Marsano, A., Martens, T. P., & Radisic, M. (2010). Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, *16*(2), 169-187. doi:10.1089/ten.TEB.2009.0352
- Wang, X., Ao, Q., Tian, X., Fan, J., Tong, H., Hou, W., & Bai, S. (2017). Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting. *Polymers*, *9*(9), 401. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4360/9/9/401>

- Wang, Y., Kankala, R. K., Zhu, K., Wang, S.-B., Zhang, Y. S., & Chen, A.-Z. (2019). Coaxial Extrusion of Tubular Tissue Constructs Using a Gelatin/GelMA Blend Bioink. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(10), 5514-5524. doi:10.1021/acsbomaterials.9b00926
- Wang, Z., Tian, Z., Menard, F., & Kim, K. (2017). Comparative study of gelatin methacrylate hydrogels from different sources for biofabrication applications. *Biofabrication*, 9(4), 044101. doi:10.1088/1758-5090/aa83cf
- Xu, H., Casillas, J., Krishnamoorthy, S., & Xu, C. (2020). Effects of Irgacure 2959 and lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate on cell viability, physical properties, and microstructure in 3D bioprinting of vascular-like constructs. *Biomedical Materials*, 15(5), 055021. doi:10.1088/1748-605x/ab954e
- Yin, J., Yan, M., Wang, Y., Fu, J., & Suo, H. (2018). 3D bioprinting of low-concentration cell-laden gelatin methacrylate (GelMA) bioinks with a two-step cross-linking strategy. *ACS applied materials & interfaces*, 10(8), 6849-6857.
- You, F., Wu, X., Kelly, M., & Chen, X. (2020). Bioprinting and in vitro characterization of alginate dialdehyde–gelatin hydrogel bio-ink. *Bio-Design and Manufacturing*, 3(1), 48-59.
- Young, A. T., White, O. C., & Daniele, M. A. (2020). Rheological properties of coordinated physical gelation and chemical crosslinking in gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Macromolecular bioscience*, 20(12), 2000183.
- Yue, K., Trujillo-de Santiago, G., Alvarez, M. M., Tamayol, A., Annabi, N., & Khademhosseini, A. (2015). Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*, 73, 254-271.
- Zhang, C., Wang, C.-S., Therriault, D., & Heuzey, M.-C. (2022). Development of aqueous protein/polysaccharide mixture-based inks for 3D printing towards food applications. *Food Hydrocolloids*, 131, 107742. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107742>
- Zhang, K., Fu, Q., Yoo, J., Chen, X., Chandra, P., Mo, X., . . . Zhao, W. (2017). 3D bioprinting of urethra with PCL/PLCL blend and dual autologous cells in fibrin hydrogel: An in vitro evaluation of biomimetic mechanical property and cell growth environment. *Acta Biomaterialia*, 50, 154-164. doi:<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.008>
- Zhang, Y. S., Arneri, A., Bersini, S., Shin, S.-R., Zhu, K., Goli-Malekabadi, Z., . . . Khademhosseini, A. (2016). Bioprinting 3D microfibrillar scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip. *Biomaterials*, 110, 45-59. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.003>