



**HAL**  
open science

# Formulation de nanosystèmes biocompatibles pour l'ingénierie tissulaire par impression 3D (bioprinting)

Guillaume Bouguéon

► **To cite this version:**

Guillaume Bouguéon. Formulation de nanosystèmes biocompatibles pour l'ingénierie tissulaire par impression 3D (bioprinting). Biomatériaux. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0006 . tel-03582003

**HAL Id: tel-03582003**

**<https://theses.hal.science/tel-03582003v1>**

Submitted on 21 Feb 2022

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE**

**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ PHYSICO-CHIMIE DE LA MATIÈRE CONDENSÉE

Par Guillaume BOUGUÉON

Né le 08/04/1988 à Pont l'Abbé (29)

**Formulation de nanosystèmes biocompatibles pour l'ingénierie  
tissulaire par impression 3D (bioprinting)**

Sous la direction du Pr Sylvie CRAUSTE-MANCIET

Sous la co-direction du Dr Tina KAUSS

Soutenue le 22 janvier 2020

Membres du jury :

Pr Johann Clouet	PU-PH, Université de Nantes	Président-Rapporteur
Pr Valérie Sautou	PU-PH, Université Clermont Auvergne	Rapporteur
Pr Frédéric Lagarce	PU-PH, Université d'Angers	Examineur
Dr Magali Szlosek-Pinaud	MCU, Université de Bordeaux	Examineur
Pr Philippe Barthélémy	PU, Université de Bordeaux	Invité
Pr Raphaël Devillard	PU-PH, Université de Bordeaux	Invité
Pr Sylvie Crauste-Manciet	PU-PH, Université de Bordeaux	Directeur
Dr Tina Kauss	MCU, Université de Bordeaux	Co-directeur



Unité de recherche

# CHEMBIOPHARM

Laboratoire ARNA, ChemBioPharm, U1212 INSERM - UMR 5320 CNRS,

Université de Bordeaux Collège et département des sciences de la santé - UFR Sciences pharmaceutiques site Carreire

146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Tel : +33(0)5.57.57.47.19

<http://chembiopharm.fr/>



université  
de BORDEAUX

Projet réalisé en partenariat avec



Bioingénierie Tissulaire (BioTis), Inserm U1026

Université Bordeaux, 146 rue Léo-Saignat 33076 BORDEAUX cedex - France

Tél. : +33 (0)5 57 57 14 88 <http://www.biotis-bordeaux.com/>



Centre de Résonance  
Magnétique des Systèmes  
Biologiques (CRMSB)

UMR 5536  
146 rue Léo Saignat  
Bâtiment 4A – Zone Nord  
Entrée Hôpital Pellegrin  
33076 Bordeaux Cedex -  
France  
Tél : +33 (0)5.57.57.10.40  
<https://www.rmsb.u-bordeaux.fr/>



Biothérapie des Maladies  
Génétiques Inflammatoires  
et Cancers (BMGIC)

U1035 INSERM  
Université de Bordeaux  
146 rue Léo-Saignat  
33076 BORDEAUX Cedex -  
France  
Tél : +33 (0)5.57.57.13.74  
<https://u1035-insERM.fr/fr/institution>



Coh@bit, FabLab

IUT de Bordeaux  
15 rue Naudet  
Bâtiment 10A – CS 10207  
Tél : +33 (0)5.56.84.79.61  
33175 GRADIGNAN Cedex-  
France  
<https://www.iut.u-bordeaux.fr/cohabit/>



# Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements

## **Au Professeur Sylvie Crauste-Manciet,**

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée depuis mon arrivée sur Bordeaux, pour ce projet que vous m'avez confié et pour votre accompagnement dans ma carrière professionnelle. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

## **Au Docteur Tina Kauss,**

Je te remercie pour ton encadrement tout au long de cette thèse, ton aide, ton écoute, les conseils que tu as su me prodiguer, ta disponibilité et la confiance que tu m'as accordée. Sois assurée de ma profonde gratitude.

## **Au Professeur Johann Clouet et au Professeur Valérie Sautou,**

Je vous remercie d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail et pour le temps que vous y avez consacré. Soyez assurés de ma profonde considération.

## **Au Professeur Frédéric Lagarce et au Dr Magali Szlosek-Pinaud,**

Je vous remercie grandement d'avoir accepté d'examiner cette thèse. Soyez assurés de ma sincère reconnaissance.

## **Aux professeurs Philippe Barthélémy et Raphaël Devillard,**

Merci à vous de m'avoir accueilli au sein des équipes ChemBioPharm et Biotis et de m'avoir ouvert les portes de ce passionnant domaine qu'est la bioimpression 3D.

Ce travail n'aurait pu être accompli sans vous.

Au Docteur Bérangère Dessane. Merci à toi pour toute l'aide précieuse que tu as apportée à ce travail. Merci pour tous les moments de franche rigolade et la bonne humeur apportée au labo. C'est un grand plaisir pour moi de travailler avec toi. Je te passe désormais le flambeau, prépare une (très) grosse réserve de Granola, elle t'aidera pour affronter ces quatre prochaines années.

Au Docteur Rawen Smirani. Je te remercie pour l'ensemble du travail que nous avons accompli ensemble. En souvenir des très nombreuses heures passées devant l'imprimante, aux durs échecs et aux petites victoires. Ce fut un plaisir de travailler à tes côtés. Bon courage à toi dans la poursuite de tes projets.

Au Docteur Ahlem Aberkane. Merci à toi pour le travail que tu as effectué et la collaboration que nous avons eue durant ces six mois.

Aux membres de l'équipe ChemBioPharm,

Sébastien, je te remercie pour tes nombreux conseils, ton aide précieuse, le temps que tu as su m'accorder, les manip que nous avons faites ensemble, et les échanges très enrichissants que nous avons pu avoir. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ton parcours.

Valérie, je te remercie pour ton accueil, tes conseils et ta bienveillance depuis mon arrivée dans l'équipe.

Alexandra, je te remercie pour l'aide apportée à l'accomplissement de ces travaux, notamment en rhéologie.

Merci à Julie, Koffi, Geoffrey, Marc, Claudio, Yannick, Mathias, Pauline, Julien, Agnès et aux autres membres de l'équipe qui animent chaque jour le laboratoire.

Aux membres de l'équipe Biotis pour leur accueil et leur disponibilité avec un remerciement tout particulier à Murielle Rémy, dit Mumu, pour ses conseils et ses idées qui nous ont sorti de plusieurs impasses et permis de nous faire bien avancer.

Aux membres de l'équipe Coh@bit, pour leur travail accompli avec un remerciement personnel à Joffrey qui nous a permis de booster l'imprimante vers sa seconde version.

Aux membres de l'équipe U1035 et particulièrement à Aurélie Bedel et Isabelle Lamrissi, pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Au Dr Emeline Ribot du CRMSB, pour son accueil, sa gentillesse, et son travail accompli sur l'imagerie IRM.

Un « HU », ne serait rien sans son côté H,

Au Docteur Aude Berroneau, à qui j'adresse mes plus sincères remerciements. Merci pour ton accueil, tous les projets réalisés, nos échanges et la confiance que tu m'as accordée depuis mon arrivée sur le CHU.

À mes co-assistants et aux PH qui font de ma partie hospitalière des moments les plus épanouissants : Benjamin, Jérémy, Faustine, Julie, Alice, Rachel, Michelle, Bénédicte, Caroline, Sophie, Manon, Fabien, Sarah, Mr S, Arnaud, Céline...

À tous les internes que j'ai pu accompagner, et avec qui j'ai eu un très grand plaisir à travailler.

Un remerciement tout particulier à mes « petits M2 », Thomas, Jeanne et Maïté. Pour l'énorme travail accompli auprès d'eux, pour leur bonne humeur (toujours) et pour leurs franches rigolades.

Aux très nombreux « pioux-pioux » (dédicace à Jeanne), qui ont su supporter mon encadrement, et aux plus grands, avec qui j'ai partagé de très bons moments et dont il serait difficile de tous citer: Sophie, Adrien, Lucas, Clara (les pioux-pioux originaux), Romain, Julien, Amélie, Clémence, Justine, Claire, Audrey, Lucie, Marin, Nicolas, Aasfa, Céline, Léa, Marine, Arthur, Ghislaine, Stéphanie....

Aux rencontres faites et aux amitiés nouées, un grand remerciement à Hélène et Kévin pour les très bons moments passés auprès d'eux.

À tous les préparateurs, Vivi, Emilie, Sophie, Bruno, Thomas, Karl, Adrien, Olive, Valérie, Fabienne, Isabelle qui font de la plongée dans la bulle de HL un moment toujours aussi agréable. Merci également à Maxime pour nos échanges chaleureux, sa disponibilité, sa bonne humeur et aux projets que nous pouvons mener à ses côtés.

A Jennifer et Nadine pour leur grande disponibilité et leur gentillesse.

Aux préparateurs de l'équipe de Pellegrin avec qui j'ai eu la chance de travailler et que je viens toujours revoir avec grand plaisir dans les profondeurs du tripode : Anthony, Carole, Sandy, Ophélie, Mélissa, Elodie, Florian, Marjorie, Martial, à leur cadre Béatrice.

À tous ceux qui font en sorte que les échanges au sein du CHU permettent de rapprocher les membres de cette grande famille. Une dédicace spéciale à tous les membres du CHUS plongée qui me font partager leur passion et explorer un monde qui m'a toujours fasciné.

À mes yeux, le bonheur est un juste équilibre entre une vie professionnelle passionnante, une vie sociale et familiale rayonnante et une vie sentimentale comblée. Aussi, ce travail n'aurait pu être accompli sans vous.

À mes amis et à leurs enfants, Perrine, Hubert, Nicolas, Jennifer, Clémence, Juan-Pablo, Geoffrey, Marion, Cécile, Julie, Ludo, Elise, Meredith, Renaud, Audrey, Stéphano, Marie, Aländji (Clovis et Réjane), Justine, Yoan ( et Victoire) que j'ai eu la chance de rencontrer et qui font que chaque instant passé ensemble soit toujours épanouissant.

Un grand merci au groupe des Bordelais, Morgane, Alex, Jeanne, Julie, Rachel, Ben, Marion, Chloé, Vincent, Justine, Lucas, Charlène, Keyvan et la petite Coline. Cette histoire a débuté à l'internat autour de la piscine, des cocktails et des soirées jeux. A tous ces supers souvenirs passés et aux meilleurs à vivre auprès de vous.

À tous les membres de ma famille, mes parents, beaux-parents, grands-parents, frère et sœurs, beau-frère, belles-sœurs et cousins pour leur enseignement, leurs valeurs, leur présence, leur amour et leur soutien. A la mémoire de ceux partis trop tôt.

J'aurais voulu débiter par vous trois, mais je vous fais l'honneur de terminer mes remerciements.

Un grand merci à toi Anne-Sophie. Merci de faire en sorte que chaque jour soit encore meilleur que le précédent. Merci pour ton soutien et ta patience durant ces derniers mois. Promis, il n'y aura pas de troisième thèse ! À nos 13 années passées ensemble et aux suivantes.

À toi, ma petite Jeanne qui m'a fait découvrir la joie d'être père. La combativité que tu as exprimée malgré ton arrivée précipitée me sert d'exemple. Elle me fait chaque jour me recentrer vers les instants les plus simples de la vie, mais au combien les plus essentiels.

À toi Grippy, à nos batailles mais aussi au réconfort apporté lors des (très) longues soirées de rédaction.

A tous ceux pour lesquels j'aurais eu la maladresse de ne pas les citer (la fatigue et mon naturel tête en l'air n'aidant en rien à l'achèvement de ces quatre pages de remerciements).

A tous ceux qui ne se seraient pas reconnus dans ces éloges et à qui je dois beaucoup.

A vous tous, un grand merci.

**A force de croire en ses rêves, l'homme en fait une réalité**

**Georges Rémi, dit Hergé (1907-1983)**

# Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>10</b>
<b>Table des illustrations</b> .....	<b>14</b>
I. Figures et images.....	14
II. Tableaux .....	17
<b>Table des Annexes</b> .....	<b>18</b>
I. Figures Annexes.....	18
II. Tableaux Annexes.....	19
III. Documents Annexes.....	19
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>20</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>22</b>
<b>Travaux antérieurs</b> .....	<b>23</b>
I. La bioimpression 3D .....	24
I.1 Introduction : de la transplantation d'organes à la bioimpression 3D.....	24
I.2 Les étapes du processus de bioimpression .....	33
I.3 Principales techniques de bioimpression .....	34
I.3.1 La bioimpression par jet d'encre .....	34
I.3.2 La bioimpression laser .....	36
I.3.3 La bioimpression par extrusion .....	37
I.3.4 La bioimpression par stéréolithographie .....	39
I.3.5 Avantages et inconvénients des principales techniques de bioimpression .....	41
I.4 Exemples d'applications de la bioimpression 3D .....	42
II. Les encres de biomatériaux et bioencres.....	50
II.1 Introduction.....	50
II.1.1 Définitions : encres de biomatériaux, bioencres, concept d'échafaudages et encres sacrificielles .....	50
II.1.2 Evolution des encres de biomatériaux et des bioencres.....	52
II.1.3 Propriétés idéales des bioencres.....	53

II.2 Hydrogels polymériques et matrices extracellulaires utilisés en bioimpression .....	56
II.2.1 Mécanisme de gélification des hydrogels .....	56
II.2.2 Hydrogels naturels.....	58
II.2.3 Hydrogels synthétiques .....	62
II.2.4 Matrice extracellulaire décellularisée .....	64
II.3 Les hydrogels supramoléculaires dans la formulation de bioencres .....	64
II.3.1 Les hydrogels supramoléculaires .....	64
II.3.2 Mécanisme de gélification .....	65
II.3.3 Gels supramoléculaires dérivés des bases nucléiques : utilisation potentielle dans la formulation des bioencres .....	68
II.3.3.1 Les nucléolipides .....	68
II.3.3.2 Les glycoside nucléolipides.....	74
II.3.4 Les hydrogels supramoléculaires utilisés dans la formulation des bioencres.....	80
II.4 Cellules et cellules souches incorporées aux bioencres.....	82
II.5 Nano et micro-objets utilisés en bioimpression 3D .....	84
III. Caractérisation des hydrogels pour la formulation des encres et bioencres.....	92
III.1 Inspection visuelle de la formation d'un gel .....	92
III.2 La rhéologie appliquée à la caractérisation des gels.....	92
III.2.1 Contraintes, déformation et vitesse de cisaillement .....	92
III.2.2 Viscosité.....	94
III.2.3 Comportements élastiques et visqueux d'un gel .....	95
III.2.4 Rhéomètre et caractérisation rhéologique d'un gel .....	97
III.3 Microscopie .....	101
III.4 Détermination de la dimension des mailles du réseau fibreux.....	102
III.5 Analyse de la composition et des interactions moléculaires .....	103
III.6 Imprimabilité des encres et bioencres lors d'une impression par extrusion .....	103
<b>Travaux personnels.....</b>	<b>107</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>108</b>
<b>Matériel et Méthode .....</b>	<b>112</b>

I. Matériel .....	112
II. Formulation d'encre à base d'hydrogels supramoléculaires .....	112
II.1 GNL et NL .....	112
II.2 Protocole de formation des encres .....	113
III. Formulation des bioencres .....	114
III.1 Cellules .....	114
III.1.1 Provenance des cellules .....	114
III.1.2 Extraction des FGh et des SCAPs .....	115
III.2 Culture cellulaire .....	115
III.3 Protocole de formation des bioencres .....	116
IV. Caractérisation des encres et bioencres .....	116
IV.1 Détermination des propriétés rhéologiques .....	116
IV.2 Osmolalité .....	117
IV.3 Mesure du pH .....	118
IV.4 Microscopie électronique en transmission .....	118
IV.5 Test d'extrusion manuel et par pousse-seringue .....	118
IV.6 Test d'extrusion par bioimprimante .....	119
IV.6.1 Première version de la bioimprimante et principe d'utilisation .....	119
IV.6.2 Seconde version de la bioimprimante .....	122
IV.6.3 Paramètres d'impression utilisés .....	122
IV.7 Caractérisation des grilles imprimées .....	123
IV.8 Etude de stabilité des encres .....	125
IV.9 Détermination de la viabilité cellulaire : test LIVE/DEAD® .....	125
IV.10 Détermination de l'activité cellulaire : test d'AlamarBlue® .....	125
IV.11 Test <i>in vivo</i> .....	126
V. Formulation de liposomes, caractérisation .....	127
V.1 Formation de liposomes par hydratation de film .....	127
V.2 Détermination de la taille et du potentiel zêta .....	127
V.3 Incorporation des liposomes aux encres .....	128

VI. Statistiques.....	128
<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>129</b>
Partie 1 : Glycoside nucléolipides et nucléolipides pour la conception d'une encre de bioimpression 3D par extrusion .....	130
I. Formulation d'encres de biomatériaux à partir de GNL et NL .....	131
I.1 GNF .....	131
I.2 GNBA-BU .....	134
I.3 GNBA-BE .....	137
I.4 diC <sub>16</sub> dT .....	140
I.5 diC <sub>16</sub> dC.....	148
I.6 diC <sub>16</sub> dG.....	152
II. Choix d'une molécule gélatrice: comparaison des encres formulées.....	154
Partie 2 : La diC <sub>16</sub> dT dans la formulation d'encre et bioencre .....	159
I. Caractérisation de l'encre de diC <sub>16</sub> dT DMEM@+ et de son impression.....	160
II. Impact du changement de milieu de culture dans la formulation d'encres de diC <sub>16</sub> dT.....	165
III. Impact de la variation de la concentration de la molécule gélatrice sur les propriétés rhéologiques de l'encre de diC <sub>16</sub> dT .....	168
IV. Etude <i>in vitro</i> de la bioencre .....	171
V. Etude de la tolérance et de la biodégradabilité <i>in vivo</i> .....	177
VI. Etude de faisabilité de l'incorporation de liposomes .....	180
VI.1 Formation de liposomes par hydratation de film .....	180
VI.2 Incorporation des liposomes aux encres .....	182
<b>Discussion générale .....</b>	<b>191</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>196</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>198</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>219</b>

# Table des illustrations

## I. Figures et images

Figure 1: Illustrations des principales techniques d'impression 3D.....	27
Figure 2: Fabrication par impression 3D de différentes formes galéniques médicamenteuses.....	27
Figure 3: Exemples de dispositifs médicaux fabriqués par impression 3D.....	28
Figure 4: Du positionnement de cellules à la bioimpression 3D.....	29
Figure 5: Evolution du nombre de publications scientifiques dans les domaines de recherche de la bioimpression 3D et de l'ingénierie tissulaire.....	30
Figure 6: Illustration schématisée du concept de bioimpression.....	31
Figure 7: Illustration du concept de bioassemblage de fibres cellulaires.....	32
Figure 8: De la médecine régénérative à l'impression 3D et la biofabrication.....	32
Figure 9: Illustration des étapes du process de bioimpression.....	33
Figure 10: Principe de la bioimpression par jet d'encre.....	36
Figure 11: Principe de la bioimpression laser.....	37
Figure 12: Principe de bioimpression par extrusion.....	38
Figure 13: Principe de bioimpression par stéréolithographie.....	40
Figure 14: Bioimpression de constructions tissulaires cardiaques sous forme de patches.....	43
Figure 15: Bioimpression de patches cardiaques et preuve de concept de bioimpression d'un coeur.....	44
Figure 16: Cœur bioimprimé.....	44
Figure 17: Biofabrication d'un modèle pulmonaire.....	45
Figure 18: Bioimpression osseuse.....	46
Figure 19: Bioimpression de peau.....	48
Figure 20: Bioimpression osseuse <i>in situ</i> .....	49
Figure 21: Distinction entre bioencre ( <i>bioink</i> ) et encre de biomatériaux ( <i>biomaterial ink</i> ).....	51
Figure 22: Modalités des différents processus de bioimpression et exigences vis à vis des bioencres.....	54
Figure 23: Illustrations schématisées de la formation d'hydrogels polymériques.....	57
Figure 24: Illustrations de bioimpressions d'hydrogels naturels.....	60
Figure 25: Structure chimique ou protéique des hydrogels naturels rentrant dans la composition des encres de bioimpression.....	61
Figure 26: Illustrations de bioimpressions d'hydrogels synthétiques.....	62
Figure 27: Structure chimique ou protéique des hydrogels synthétiques rentrant dans la composition des encres de bioimpression.....	63
Figure 28: Illustration des deux approches permettant la formation de gels supramoléculaires.....	65
Figure 29: Illustration de la formation d'hydrogels supramoléculaires.....	66
Figure 30: Bases nucléiques et interactions non covalentes mises en œuvre.....	67
Figure 31: Interactions non covalentes impliquées dans la formation des gels supramoléculaires.....	67
Figure 32: Représentation schématique de la structure chimique des nucléolipides et des glycosides nucléolipides développés par l'équipe ChembioPharm.....	68

Figure 33: Structure générale d'un nucléolipide .....	69
Figure 34: Structure chimique de la diC <sub>16</sub> dT .....	70
Figure 35: Structure fibreuse des gels de diC <sub>16</sub> dT .....	71
Figure 36: Caractérisation rhéologique d'un gel de diC <sub>16</sub> dT 3% dans du NaCl 0,9%.....	72
Figure 37: Injection <i>in vivo</i> d'un gel de diC <sub>16</sub> dT 6% formé dans du NaCl 0,9%. .....	72
Figure 38: Structures chimiques des dérivés de la diC <sub>16</sub> dT et tests de gélification .....	74
Figure 39: Principe de synthèse des GNL par réaction double-clic .....	74
Figure 40: Structure chimique du GNF et observation en imagerie TEM .....	75
Figure 41: Culture cellulaire dans des hydrogels de GNF ou composites de GNF/collagène .....	77
Figure 42: Etude du GNBA-BE comme milieu de culture de cellules souches .....	78
Figure 43: Structure du GNBA Carbamate .....	79
Figure 44: Structure chimique des Bola bis-urée et bis-amide .....	79
Figure 45: Propriétés mécaniques de différents tissus du corps humain .....	83
Figure 46: Exemples de différents types de nanoparticules utilisées pour des applications d'ingénierie tissulaire .....	86
Figure 47: Formes pharmaceutiques, matrices et supports imprimés et potentiellement imprimables .....	88
Figure 48 : Illustration du test d'inversion d'un tube.....	92
Figure 49: Représentation lamellaire d'un matériau et mouvement laminaire de cisaillement .....	93
Figure 50: Exemple de rhéogramme .....	94
Figure 51: Rhéogrammes des fluides newtoniens et non newtoniens .....	95
Figure 52: Illustrations du principe d'une mesure de cisaillement oscillatoire de faible amplitude .....	97
Figure 53: Rhéomètre et caractérisation d'un échantillon .....	98
Figure 54: Expression d'un domaine linéaire de viscoélasticité (LVER) et d'un comportement thixotrope sur un rhéogramme .....	100
Figure 55: Représentation schématique d'une méthode d'évaluation de l'imprimabilité d'une encre par extrusion .....	105
Figure 56: Corrélation entre imprimabilité des encres et paramètres d'extrusion.....	105
Figure 57: Illustration du projet Multiprint et rôles des différents partenaires .....	108
Figure 58: Représentation schématisée du projet de thèse .....	110
Figure 59: Protocole de formation des hydrogels .....	114
Figure 60: Première version de la bioimprimante à extrusion .....	120
Figure 61: Représentation schématique des grilles imprimées .....	121
Figure 62: Hauteur des couches imprimées.....	121
Figure 63: Seconde version de la bioimprimante à extrusion.....	122
Figure 64: Détermination de la longueur des brins, de la distance inter-brins et de la dimension des pores	124
Figure 65: Détermination du volume des pores .....	124
Figure 66: Formation de gels de GNF et observation en microscopie TEM .....	132
Figure 67: Test de formation en seringue et impression par imprimante du GNF 1% DMEM .....	134
Figure 68: Formation de gels de GNBA-BU et imagerie TEM .....	135
Figure 69: Tests d'extrusion et d'impression de gels de GNBA-BU.....	136

Figure 70: Formation de gels de GNBA-BE 1,5% et observations en TEM .....	138
Figure 71: Formation en seringue de gels de GNBA-BE et tests d'injection manuel .....	139
Figure 72: Impression d'un gel de GNBA-BE 1,5% eau Milli-Q® .....	139
Figure 73: Formation de gels de diC <sub>16</sub> dT et test d'injection .....	141
Figure 74: Observation en imagerie TEM de fibres de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ .....	142
Figure 75 : Caractérisation rhéologique des gels de diC <sub>16</sub> dT 3% NaCl 0,9% à 25°C .....	144
Figure 76: Caractérisation rhéologique des gels de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ à 25°C .....	145
Figure 77: Etude de stabilité de gels de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ extrudés .....	146
Figure 78: Impression d'une grille à partir d'une encre de diC <sub>16</sub> dT 3% NaCl 0,9% .....	146
Figure 79: Impression étape par étape de la 1ère couche d'une grille à partir d'une encre de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ .....	147
Figure 80: Formation et extrusion de gels de diC <sub>16</sub> dC 2% DMEM@+ .....	148
Figure 81: Impression d'un gel de diC <sub>16</sub> dC 3% DMEM@+ .....	151
Figure 82: Test de stabilité de gels de diC <sub>16</sub> dC et dT extrudés .....	152
Figure 83: Essais de gélification d'échantillons de diC <sub>16</sub> dG .....	153
Figure 84: Caractérisation rhéologique des gels de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ extrudés à 25°C et 37°C .....	161
Figure 85: Caractérisation rhéologique des gels de diC <sub>16</sub> dT 3% NaCl 0,9%, extrudés à 25°C .....	162
Figure 86: Evaluation de la reproductibilité d'impression de grilles à partir d'encre de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ .....	164
Figure 87: Formation de gels de diC <sub>16</sub> dT 3% dans différents milieux .....	165
Figure 88: Formation de gels de diC <sub>16</sub> dT DMEM@+ à des concentrations de 4,5 et 6% .....	169
Figure 89: Mise en culture de la bioencre de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ chargée en FGh, non extrudée .....	172
Figure 90: Exemples de grilles bioimprimées de 3 niveaux à partir d'encre de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ chargées en FGh (1.-2.) ou SCAPs (3.-4.) .....	172
Figure 91: Tests LIVE/DEAD® réalisés sur des grilles bioimprimées à partir de bioencres de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ chargée en FGh ou en SCAPs .....	174
Figure 92: Représentation graphique des tests de viabilité cellulaire et d'AlamarBlue® d'encres bioimprimées de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ contenant des FGh et des SCAPs .....	175
Figure 93: Suivi de la diminution du volume (%) des encres injectées chez des souris de J0 à J24 .....	177
Figure 94: Suivi par technique IRM du devenir des encres injectées <i>in-vivo</i> .....	178
Figure 95: Structure chimique de la DOPC et du Cholestérol .....	181
Figure 96: Observation de gels de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ avant et après ajout d'une solution de liposomes ..	183
Figure 97: Observation en TEM de liposomes seuls et incorporés à des gels de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ .....	185
Figure 98: Impression de l'encre de diC <sub>16</sub> dT 3% liposomes fluorescéine 1% .....	188

## II. Tableaux

<b>Tableau I: Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients des quatre techniques principales de bioimpression</b> .....	41
<b>Tableau II: Caractérisation rhéologique des gels de GNF/DMEM à 1 et 3% à 25°C</b> .....	133
<b>Tableau III: Caractérisation rhéologique des gels de GNBA-BU 1,5% / eau Milli-Q® et DMEM à 25°C et 37°C</b>	137
<b>Tableau IV: Mesures de l'osmolalité de diverses préparations de DMEM</b> .....	141
<b>Tableau V: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9% et DMEM@+ à 25°C et 37°C</b> .....	143
<b>Tableau VI: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dC 1,5% NaCl 0,9% et DMEM@+ à 25°C</b> .....	149
<b>Tableau VII: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dC 2% NaCl 0,9% et DMEM@+ à 25°C</b> .....	150
<b>Tableau VIII: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dC 3% NaCl 0,9% et DMEM@+ à 25°C</b> .....	150
<b>Tableau IX: Récapitulatif des manipulations réalisées pour la sélection d'une molécule candidate</b> .....	158
<b>Tableau X : Caractérisation rhéologique des encres de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9% et DMEM@+ après extrusion</b>	160
<b>Tableau XI: Mesure de l'osmolalité du milieu de culture Stemspan</b> .....	166
<b>Tableau XII: Mesure de pH d'un gel de diC<sub>16</sub>dT 3% StemspanC</b> .....	166
<b>Tableau XIII : Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% formés dans le StemspanC@+ et le mélange D<sub>50</sub>SC<sub>25</sub>l<sub>25</sub> @+ à 25°C</b> .....	167
<b>Tableau XIV: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 4% DMEM@+, avant et après extrusion, à 25°C et 37°C</b> .....	170
<b>Tableau XV: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 5% DMEM@+, avant extrusion, à 25°C et 37°C</b> .....	170
<b>Tableau XVI: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 6% DMEM@+, avant extrusion, à 25°C et 37°C</b> .....	171
<b>Tableau XVII: Caractérisation rhéologique des bioencres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ chargées en cellules</b> .....	176
<b>Tableau XVIII : Mesure de pH des hydrogels de diC<sub>16</sub>dT 3%</b> .....	176
<b>Tableau XIX: Taille et potentiel zêta de formulations de liposomes de DOPC</b> .....	182
<b>Tableau XX: Etude de stabilité des formulations de liposomes de PBS</b> .....	182
<b>Tableau XXI: Détermination de la taille des liposomes de PBS contenus dans une encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+</b> .....	183
<b>Tableau XXII: Mesure de pH de solutions de liposomes et d'encres chargées en liposomes</b> .....	184
<b>Tableau XXIII: Caractérisation rhéologique des encres de diC<sub>16</sub>dT chargées en liposomes</b> .....	186

# Table des Annexes

## I. Figures Annexes

Figure Annexe 1: Caractérisation rhéologique (CR) des gels de GNF 1% DMEM à 25°C .....	220
Figure Annexe 2: CR des gels de GNF 3% DMEM à 25°C .....	221
Figure Annexe 3: CR des gels GNBA-BU 1,5% eau Milli-Q® à 25°C.....	222
Figure Annexe 4: CR des gels GNBA-BU 1,5% eau Milli-Q® à 37°C.....	223
Figure Annexe 5: Température sol-gel GNBA-BU 1,5% eau Milli-Q® .....	224
Figure Annexe 6: CR des gels GNBA-BU 1,5% DMEM à 25°C.....	225
Figure Annexe 7: CR des gels GNBA-BU 1,5% DMEM à 37°C.....	226
Figure Annexe 8: Température sol-gel GNBA-BU 1,5% DMEM.....	227
Figure Annexe 9: Mesure de thixotropie d'un gel de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ à 25°C .....	227
Figure Annexe 10: CR des gels de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ à 37°C.....	228
Figure Annexe 11: CR des gels de diC <sub>16</sub> dC 1,5% NaCl 0,9% à 25°C .....	229
Figure Annexe 12: CR des gels de diC <sub>16</sub> dC 1,5% DMEM@+ à 25°C.....	230
Figure Annexe 13: CR des gels de diC <sub>16</sub> dC 2% NaCl 0,9% à 25°C .....	231
Figure Annexe 14: CR des gels de diC <sub>16</sub> dC 2% DMEM@+ à 25°C.....	232
Figure Annexe 15: CR des gels de diC <sub>16</sub> dC 3% NaCl 0,9% à 25°C .....	233
Figure Annexe 16: CR des gels de diC <sub>16</sub> dC 3% DMEM@+ à 25°C.....	234
Figure Annexe 17: Détermination de la viscosité des gels de diC <sub>16</sub> dT 3% formés dans le NaCl 0,9% et le DMEM@+ à 25°C et 37°C. Comparaison des mesures à J1 et J21. ....	236
Figure Annexe 18: CR des gels de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+, extrudés, à 37°C.....	237
Figure Annexe 19: CR des gels de diC <sub>16</sub> dT 4% DMEM@+, non extrudés, à 25°C et 37°C.....	240
Figure Annexe 20: CR des gels de diC <sub>16</sub> dT 4% DMEM@+, extrudés à 25°C et 37°C.....	241
Figure Annexe 21: Détermination des propriétés thixotropes des gels de diC <sub>16</sub> dT 4% DMEM@+, extrudés à 25°C et 37°C .....	242
Figure Annexe 22: CR des gels de diC <sub>16</sub> dT 5% DMEM@+, non extrudés, à 25°C et 37°C.....	243
Figure Annexe 23: CR des gels de diC <sub>16</sub> dT 6% DMEM@+, non extrudés, à 25°C et 37°C.....	244
Figure Annexe 24: Détermination des propriétés thixotropes des gels de diC <sub>16</sub> dT 6% DMEM@+, non extrudés, à 25°C et 37°C. ....	245
Figure Annexe 25 : CR des bioencres de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ contenant 1 millions de cellules, à 37°C.....	246
Figure Annexe 26: CR des gels de diC <sub>16</sub> dT 3% StemsSpanC@+ à 25°C.....	248
Figure Annexe 27: CR des gels de diC <sub>16</sub> dT 3% D <sub>50</sub> SC <sub>25</sub> l <sub>25</sub> @+ à 25°C .....	249
Figure Annexe 28: CR des encres de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ chargées en liposomes de PBS à 25°C .....	250
Figure Annexe 29: CR des encres de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ chargées en liposomes de PBS à 37°C .....	251
Figure Annexe 30 : Mesure de viscosité de l'encre de diC <sub>16</sub> dT DMEM@+chargée en liposomes de PBS.....	251
Figure Annexe 31: CR des encres de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ chargées en liposomes de fluorescéine à 25°C ..	252
Figure Annexe 32: CR des encres de diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ chargées en liposomes de fluorescéine à 37°C ..	253

## II. Tableaux Annexes

Tableau Annexe I : Composition des milieux de culture utilisés .....	235
Tableau Annexe II : Distance moyenne entre chaque brin vertical et horizontal pour 5 grilles et analyse statistique .....	238
Tableau Annexe III: Calcul du volume des pores, de la porosité des grilles et analyse statistique réalisée sur 5 grilles imprimées .....	239
Tableau Annexe IV: Suivi du volume des gels de diC <sub>16</sub> dT DMEM@+ (exprimé en mm <sup>3</sup> ) injectés chez des souris en fonction du temps. ....	247
Tableau Annexe V: Suivi de la dégradation des gels de diC <sub>16</sub> dT DMEM@+ (exprimé en %) injectés chez des souris en fonction du temps. ....	247

## III. Documents Annexes

Document Annexe 1: Micro- and nano-formulations for bioprinting and additive manufacturing .....	254
Document Annexe 2 : Nucleotide lipid-based hydrogel as a new biomaterial ink for biofabrication.....	254

## Liste des abréviations

2D : 2 dimensions	FGh: fibroblastes gingivaux humains
3D : 3 dimensions	FLT3l: <i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
AgNP : nanoparticules d'argent	FTIR : <i>fourier transform infra-red</i>
ADN : acide désoxyribonucléique	GelMA : gélatine méthacrylée
ARN : acide ribonucléique	GNBA : glycoside nucléolipides bola amphiphiles
ARNm : acide ribonucléique messenger	GNBA-BA : glycoside nucléolipides bola amphiphiles-bis amide
ASCs: <i>adipose tissue derived stem cells</i>	GNBA-BE : glycoside nucléolipides bola amphiphiles-bis éther
AuNP: nanoparticules d'or	GNBA-BU : glycoside nucléolipides bola amphiphiles-bis urée
BCP: <i>biphasic calcium phosphate</i>	GNF: <i>glycosyl-nucleosyl-fluorinated</i>
BMP : <i>bone morphogenic protein</i>	GNL: glycoside nucléolipides
c.a.d : c'est-à-dire	HA: acide hyaluronique
CAD : <i>computer aided design</i>	HAp: hydroxyapatite
CAO : conception assistée par ordinateur	HASC: <i>human adipose stromal cells</i>
CaP : phosphate de calcium	hESC: <i>human embryonic stem cells</i>
CR : caractérisation rhéologique	HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Cryo-TEM : microscopie électronique en transmission cryogénique	HUVEC: <i>human umbilical vein endothelial cells</i>
CSE : cellules souches endothéliales	IPSCs: <i>induced pluripotent stem cells</i>
CSH : cellules souches hématopoïétiques	IL: interleukines
CSM : cellules souches mésenchymateuses	IMDM : <i>iscope's modified dulbecco's medium</i>
DINH : N'-dodecanoyl-isonicotino-hydrazide	IRM : imagerie par résonance magnétique
DLS: <i>dynamic light scattering</i>	LAB: <i>laser-assisted bioprinting</i>
DMEM: <i>dulbecco's modified eagle medium</i>	LIFT: <i>laser-induced forward transfer</i>
DOPC: 1,2-deioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	LMWG: <i>low molecular weight hydrogelators</i>
DMPC: 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	LVER: <i>linear viscoelastic region</i>
DPPC: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	MEC : matrice extracellulaire
DSC: <i>differential scanning calorimetry</i> ,	MECd : matrice extracellulaire décellularisée
EBM : encres de biomatériaux	nHAP : nanohydroxyapatite
ESC : <i>embryonic stem cells</i>	NL : nucléolipides
DMSO : diméthyle sulfoxyde	NTC : nanotubes de carbone
EthD-1 : homodimère d'éthidium	

PBS: *phosphate buffered saline*  
PCL: polycaprolactone  
PEG : polyéthylène glycol  
PEGDA : polyéthylène glycol diacrylate  
PEG-MA : polyéthylène glycol méthacrylate  
PEGTA: polyéthylène glycol tetra-acrylate  
PLA : acide polylactique  
PLGA : acide polylactique-co-glycolique  
PVA-MA : polyvinyl-alcool methacrylate  
RGD : arginine-glycine-acide aspartique  
RMN: résonance magnétique nucléaire  
SAFIN: *self-assembled fibrillar network*  
SANS: *small-angle neutron scattering*  
SAS: *small-angle scattering*  
SAXS: *small-angle x-ray scattering*  
SCAPs: *stem cells from apical. papilla*  
SCF: *stem cell factor*  
SEM: *scanning electron microscopy*  
SLN: *solid lipid nanoparticle*  
SR1: stemregenin 1  
StemspanC: stemspan complet  
StemSpan SFEM: *serum-free medium for culture and expansion of hematopoietic cells*  
.stl : format de fichier de stéréolithographie  
SVF : sérum de veau fœtal  
TCP : phosphate tricalcique  
TEM: *transmission electron microscopy*  
TDM: tomodensitométrie  
TPO: thrombopoïétine  
VEGF: *vascular endothelial growth factor*  
VPA : acide valproïque

# Introduction générale

La bioimpression est une branche récente de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire faisant appel aux techniques d'impression 3D. A travers l'impression de matrices de support et de cellules, elle vise à reproduire *in vitro* des tissus et organes. Cette approche souhaite ainsi pallier le manque de greffons utilisés pour remplacer des fonctionnalités perdues ou endommagées chez l'homme.

Les bioimpressions sont réalisées au moyen d'une bioencre composée majoritairement de molécules gélatrices, d'origine naturelle ou synthétiques, et de cellules. Elles peuvent également incorporer des nano ou micro-objets afin de conférer aux bioencres des fonctionnalités particulières. Au cours de ces dernières années, un large éventail de biomatériaux ont été développés pour rentrer dans la formulation des bioencres. Cependant, rares sont ceux combinant à la fois des propriétés mécaniques et biochimiques leur permettant d'être favorables à la croissance cellulaire, d'être imprimées, de concevoir des bioimpressions stables dans le temps et d'offrir une capacité de greffe au sein d'un organisme vivant. C'est pourquoi, la recherche de nouveaux biomatériaux et le développement de nouvelles encres s'avèrent indispensables.

Au sein des molécules gélatrices, permettant la formation d'hydrogels supramoléculaires, les nucléolipides et glycoside nucléolipides ont démontré des propriétés très intéressantes et offrent un potentiel non négligeable pour la formulation d'encres de bioimpression 3D. L'objectif principal du travail de thèse présenté ci-dessous sera de formuler une encre de bioimpression à partir de ces molécules. Le présent manuscrit rapportant les travaux menés dans ce but se divise en deux grandes parties.

La première, nommée « Travaux Antérieurs », a pour but de définir la bioimpression 3D, ses modalités, et de montrer sa place au sein des domaines de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire. Dans un premier temps, les différentes techniques de bioimpression 3D seront évoquées. Dans un second temps, les encres, bioencres, leur conception et leurs différents contenus (molécules gélatrices, cellules, nano-objets) seront décrits. Enfin, les moyens utilisés dans la caractérisation des hydrogels seront abordés.

La seconde partie de ce manuscrit sera consacrée aux travaux qui ont été menés dans le cadre du projet Multiprint et ayant pour objectif la formulation d'une bioencre à partir de molécules gélatrices bioinspirées. Les choix qui ont conduit à la sélection parmi 6 candidats de la molécule de diC<sub>16</sub>dT, les expérimentations menées sur cette encre puis sur la bioencre, ainsi que les travaux préliminaires menés dans le but d'améliorer cette formulation seront détaillés.

# Travaux antérieurs

## I. La bioimpression 3D

### I.1 Introduction : de la transplantation d'organes à la bioimpression 3D

#### **Transplantation d'organes et préparation *in vitro* de tissus et d'organes**

L'homme, confronté à des malformations congénitales, des traumatismes, des maladies et au vieillissement peut perdre la fonction de ses tissus et organes. Contrairement à certains organismes, comme les amphibiens, le corps humain a un faible potentiel de régénération. Les avancées réalisées par les techniques chirurgicales et les thérapies immunosuppressives depuis le milieu du 19<sup>ème</sup> siècle ont conduit au succès de la **transplantation d'organes**, permettant de remplacer des parties endommagées et malades du corps. Cependant, le déséquilibre entre l'offre et la demande se creuse de plus en plus. Il était estimé qu'en 2018, entre 30 et 45% des patients enregistrés sur la liste d'attente des réseaux international et européen pour un don d'organe furent transplantés. Chaque jour 20 personnes décèdent dans l'attente d'une transplantation. Ces chiffres soulignent dramatiquement le besoin et la nécessité d'améliorer la recherche dans ce domaine (1,2). Malgré de nombreux progrès réalisés sur les techniques de stockage et de conservation des greffons (2), ou la maîtrise des problèmes d'histocompatibilité entre tissu greffé et hôte (3,4), de nouvelles stratégies s'avèrent nécessaires pour concevoir des sources sûres et fiables d'organes. L'objectif absolu serait de pouvoir **produire *de novo* des organes personnalisés** pour chaque patient qui en serait dans l'attente.

Au cours des dernières décennies, les domaines étroitement liés que sont la **médecine régénérative** et l'**ingénierie tissulaire** ont évolué dans ce sens et offrent différentes approches à la préparation *in vitro* de tissus et d'organes. En effet, la médecine régénérative vise à restaurer, maintenir, ou améliorer la structure et la fonction de tissus ou d'organes endommagés. Elle s'est développée notamment grâce aux progrès des techniques d'ingénierie tissulaire (1). Le principe de l'ingénierie tissulaire repose sur l'assemblage de constructions tissulaires fonctionnelles par l'utilisation d'**échafaudages** (*scaffolds* en anglais) servant de support à des cellules. Le développement de ces structures et leur maturité est ensuite initié par le biais de molécules biologiquement actives afin d'obtenir des tissus pour des applications *in vitro* aussi bien qu'*in vivo* (5,6). L'étude des cellules souches et la maîtrise de leur différenciation (7,8), la création de nouveaux biomatériaux (9–11) et la conception d'échafaudages favorisant la croissance cellulaire (12,13) ont contribué à son développement.

La médecine régénérative et l'ingénierie tissulaire couvrent des **domaines d'application très variés**. Il n'est pas exagéré de dire qu'aujourd'hui tout tissu et organe du corps humain fait l'objet de recherches pour leur recréation en laboratoire.

Ainsi, dans l'ingénierie des **tissus cutanés**, des greffons autologues de cellules épithéliales sont reconstruits à partir de kératinocytes prélevés sur la peau saine du patient ; des substituts cutanés

appliqués sur les plaies et les brûlures agissent comme une couche protectrice temporaire favorisant l'accélération des processus de cicatrisation (14). La **reconstruction osseuse *in vivo*** est envisagée par plusieurs stratégies : l'utilisation de biomatériaux ostéoinducteurs ou «intelligents» (céramiques, polymères naturels et synthétiques) stimulant l'environnement où ils sont greffés ; des échafaudages biodégradables favorisant l'ostéosynthèse et se dégradant progressivement pour laisser place à un tissu osseux natif ; des hydrogels (collagène, gélatine, polyéthylène glycol) couplés à des nanoparticules de verre (*bioglass*) ou des nanotubes de carbone permettent d'amplifier la régénération osseuse (15,16).

Il est également possible de concevoir la création de parties d'organes afin de rétablir des fonctions biologiques défaillantes. Dans le cas du pancréas, l'assemblage **d'îlots pancréatiques** humains autologues, formés à partir de cellules souches pluripotentes, pourraient permettre de constituer une source intrinsèque d'insuline dans le traitement du diabète (17,18). Les mêmes cellules souches pluripotentes dans des conditions favorables comme l'encapsulation dans des billes d'alginate, permettent également de reproduire des **hépatocytes humains** capables de produire de l'albumine et de l'urée et supportant une implantation *in vivo* (19,20).

La longévité d'un organe synthétique ne peut cependant s'envisager sur le long terme qu'en présence d'un système vasculaire efficient et parfaitement intégré à celui de l'hôte. La création de **vaisseaux sanguins** en ingénierie tissulaire recourt la plupart du temps à des techniques au cours desquelles un tissu vasculaire recrée à partir de cellules souches pluripotentes (différenciées en cellules endothéliales et musculaires) et d'une matrice à base de collagène et d'élastine, est enroulé autour d'un mandrin. Une fois le tissu mature, le mandrin est extrait pour laisser place à un vaisseau qui devra faire preuve d'une résistance mécanique élevée afin de supporter la pression sanguine physiologique (21).

Ces exemples ne sont qu'une infime partie des possibilités offertes par la recherche en médecine régénérative et en ingénierie tissulaire. Il est cependant essentiel de noter que la cohésion cellulaire puis l'expansion des tissus formés sur un plan en 2 dimensions (2D), mais aussi en 3 dimensions (3D), est indissociable de l'utilisation d'une **matrice extracellulaire** (MEC) adaptée.

### **Matrice extracellulaire et développement d'échafaudages matriciels**

Naturellement sécrétée par les cellules, la MEC forme une **matrice architecturale en 3D** et fournit de nombreux signaux moléculaires pour améliorer l'organisation des cellules entre elles puis la formation d'une structure tissulaire. L'influence mécanique et chimique qu'exerce la MEC sur les cellules est à l'origine de changements dans leur expression génique. Elle stimule leur développement mais peut aussi altérer le phénotype cellulaire et entraîner leur différenciation. Ces observations ont conduit à

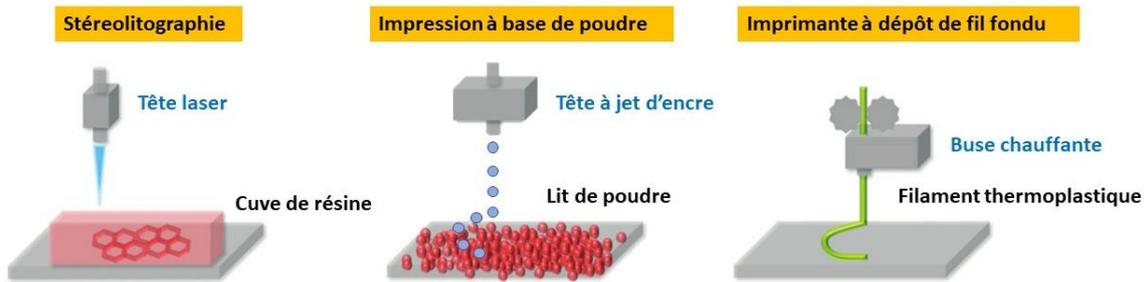
une meilleure appréciation de ce qui est appelé le « **microenvironnement cellulaire** » ou plus particulièrement les « **niches cellulaires** » dans le cas des cellules souches (3,22,23).

La **matrice architecturale 3D naturelle** correspond en ingénierie tissulaire au concept d'échafaudage évoqué précédemment. Recréer les **propriétés naturelles** d'un microenvironnement cellulaire pour faciliter l'adhésion et la croissance cellulaire s'avère ainsi un défi majeur. A cet enjeu s'ajoute également la reproduction de la **microarchitecture complexe des tissus**. En effet, la synthèse de tissus et d'organes doit permettre de restituer leur structure et leur morphologie. Ainsi, il est nécessaire de combiner avec précision plusieurs types de cellules et composants, et de reproduire le plus fidèlement possible le microenvironnement approprié *in vivo* pour les cellules (24–27). Bien que prometteuses, les techniques d'ingénierie tissulaires conventionnelles font face à certaines **limites** avec notamment un **placement incontrôlé des cellules**. C'est pourquoi, la transposition des techniques d'impression 3D en ingénierie tissulaire prend tout son sens (28).

### **L'impression 3D et son application dans le domaine médical**

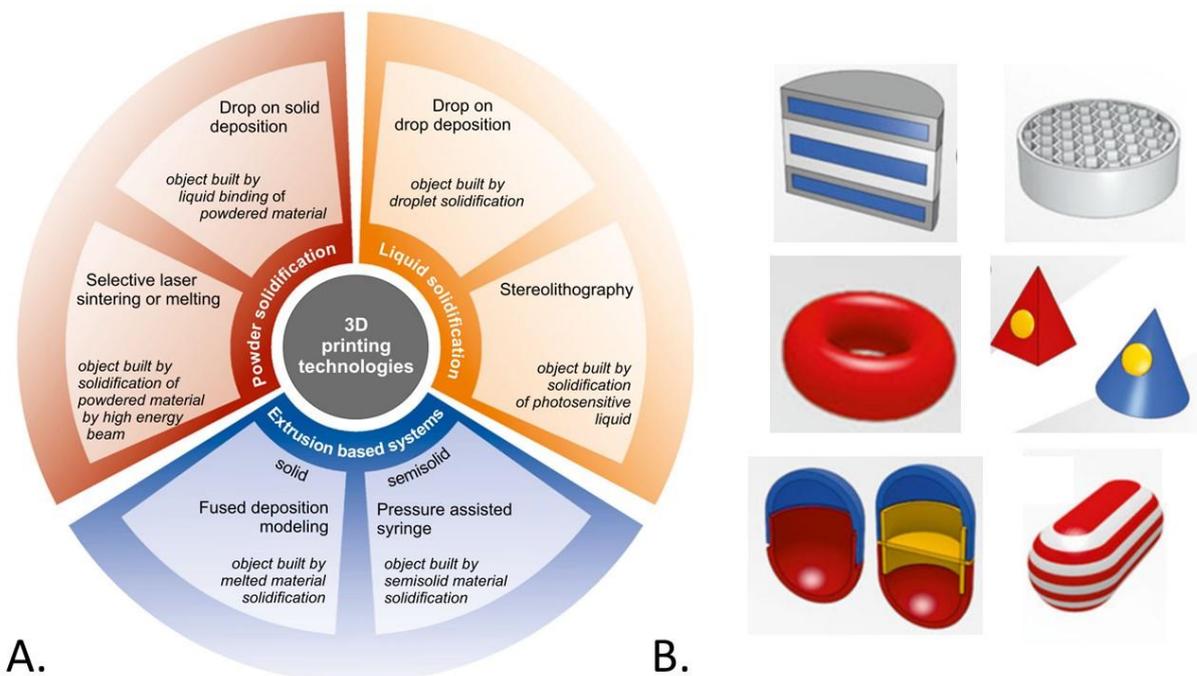
L'**impression 3D ou fabrication additive** est une technique de fabrication dite ascendante, qui procède par ajout de couches successives de matière. Elle s'oppose aux techniques procédant par retrait de matière comme l'usinage (24,29). Sa fonction première est de reproduire des objets, à partir de leur modèle informatique en 3D et de matériaux adaptés à la technique d'impression. Un des pionniers de l'impression 3D est Charles Hull qui inventa en 1986 le procédé de lithographie 3D basé sur la photopolymérisation d'une résine liquide par des rayonnements ultraviolets (**Figure 1**). D'autres procédés furent développés dans les années 90 notamment les procédés de fabrication à base de poudre au cours desquels une tête d'impression à jet d'encre et des liants sont appliqués sur un lit de poudre pour le cimenter ; ainsi que des techniques par extrusion de fils de matériaux thermoplastiques au cours desquels, les fils sont fondus pour être déposés et reprennent en masse à température ambiante (**Figure 1**) (24,30). Peu à peu, la fabrication additive s'est fait une place dans le domaine médical, notamment grâce aux potentiels de création de produits pharmaceutiques et de dispositifs médicaux personnalisés (31).

Dans le **domaine pharmaceutique**, l'impression 3D offre des possibilités de conception de formes galéniques solides (comprimés, gélules, films orodispersibles, implant notamment) de tailles, de formes et de structures plus complexes que par les procédés usuels (**Figure 2**). De nouvelles architectures internes des formes galéniques sont envisagées, dont la répartition des excipients et des substances actives améliore la stabilité et modifie les profils de dissolution et de libération. Les technologies d'impression 3D permettent également d'améliorer le processus de fabrication, en facilitant la répartition et le contrôle plus précis des doses de substances actives au sein des formes galéniques. Elles permettent également d'envisager des petites productions personnalisées et adaptées à des petits groupes de patients particuliers (31).



**Figure 1: Illustrations des principales techniques d'impression 3D**

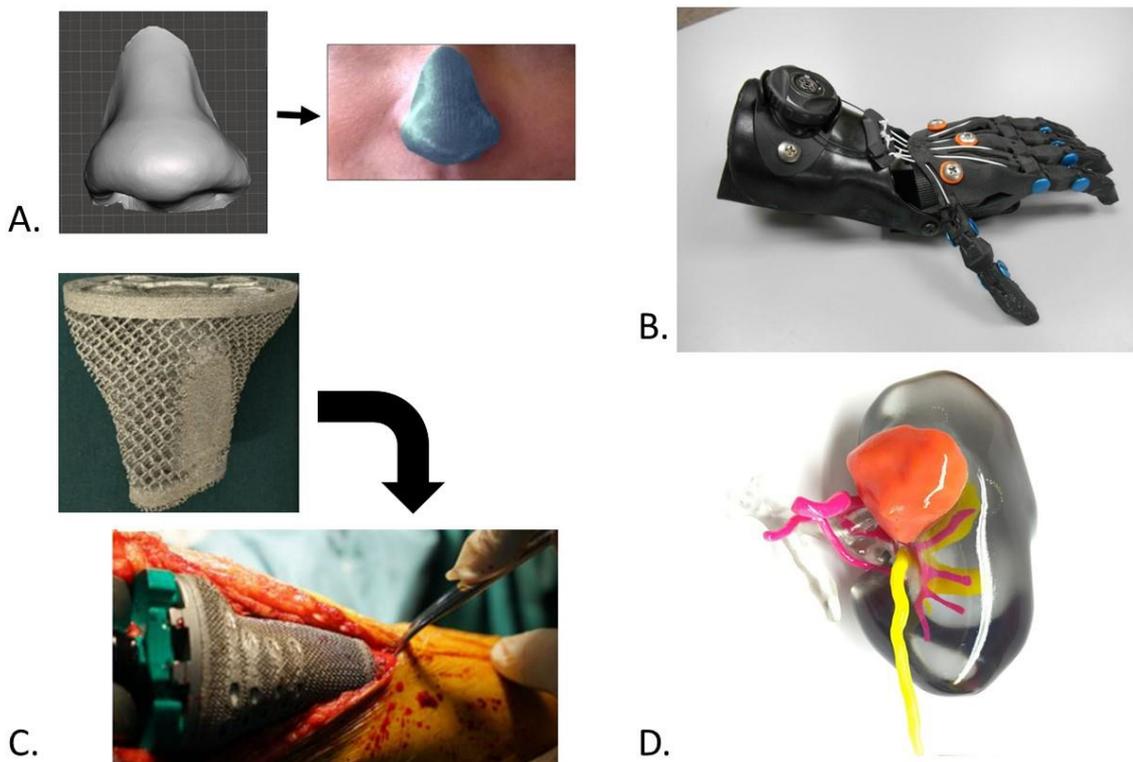
Fabrication d'objets en 3D couche par couche à l'aide de différentes techniques d'impression. De gauche à droite : La stéréolithographie est une technique au cours de laquelle une résine liquide est photopolymérisée par un rayonnement UV ; dans l'impression à base de poudre, un liant est déposé précisément sur un lit de poudre pour la durcir ; l'impression par dépôt de fil fondu chauffe un filament thermoplastique qui devient alors plus malléable avant d'être extrudé. Adapté de Cui et al. (48).



**Figure 2: Fabrication par impression 3D de différentes formes galéniques médicamenteuses**

**A.** Les différentes techniques utilisées pour l'impression 3D de formes pharmaceutiques sont réparties entre les techniques par extrusion, par solidification d'une poudre ou solidification d'un liquide. **B.** Quelques exemples de formes galéniques complexes (comprimés et gélules) qu'il est possible de préparer par impression 3D. Adapté de Jamróz et al. (31).

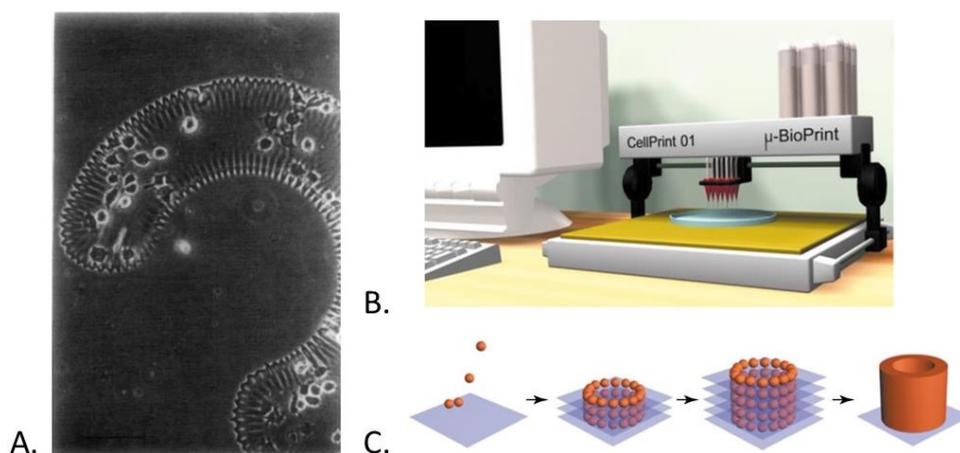
Les technologies d'impression 3D permettent également d'adapter les **dispositifs médicaux** aux besoins spécifiques des patients (**Figure 3 A.-C.**). Il a ainsi pu être développé des pansements adaptés à la morphologie et à l'étendue des blessures ; des prothèses externes fabriquées sur mesure pour remplacer une partie du corps endommagé (pieds, mains, oreilles, nez) suite à des malformations congénitales ou à des déformations traumatiques ; des prothèses implantées orthopédiques de hanches, de genoux ou utilisées en chirurgie maxillo-faciale. La fabrication additive permet également la réalisation de modèles de planification et de formation chirurgicales ou bien la création de fantômes médicaux. Précédemment analysé par des techniques d'imagerie très précises, un organe tuméfié ou métastasé (rein, foie, rate) et ses contours peuvent être fidèlement recréés dans un modèle en résine (**Figure 3 D.**). L'objet 3D permet ainsi un diagnostic plus précis, une meilleure évaluation des changements pathologiques, une meilleure visualisation de l'anatomie spécifique du patient, facilitent considérablement la planification préopératoire et ont une valeur éducative non négligeable (31).



**Figure 3: Exemples de dispositifs médicaux fabriqués par impression 3D**

**A.** Modèle 3D d'un nez puis impression d'un pansement adapté réalisé à partir de polycaprolactone(PCL) couplée à du cuivre (Cu-PCL) (adapté de Muwaffak et al. (32)). **B.** Prothèse de main pédiatrique composée essentiellement de polymères de plastiques (polylactide) (adapté de Zuniga et al. (33)). **C.** Prothèse de genou en alliage de titane réalisée sur mesure puis implantée (adapté de Luo et al. (34)). **D.** Modèle de rein imprimé à l'échelle 1/1 par photopolymérisation de quatre polymères différents (arbre artériel (magenta), système collecteur (jaune), tumeur (orange), parenchyme et veine (translucide) servant d'outil à la programmation des actes chirurgicaux que d'outil éducatif pour le patient (adapté de Bernhard (35)).

Mais c'est surtout dans la **création de novo de tissus et d'organes** que les techniques d'impression 3D prennent toute leur importance. L'utilisation de telles technologies pour le positionnement 3D de cellules a été démontré pour la première fois en 1988 par Klebe sous le terme de cytoscription (36) (**Figure 4 A.**). C'est réellement à partir des années 2000 qu'apparaissent les concepts « **d'impression d'organes** » (24). Ce terme était alors défini comme «une technologie d'impression 3D assistée par ordinateur, basée sur le dépôt couche par couche, de cellules et / ou d'agrégats de cellules dans un gel 3D avec une maturation séquentielle de la construction imprimée en un tissu ou organe vivant perfusé et vascularisé (37) (**Figure 4 B. et C.**). Aujourd'hui, le terme de bioimpression 3D (*3D bioprinting*), également nommée bioimpression (*bioprinting* ou *bio-printing*), prévaut.



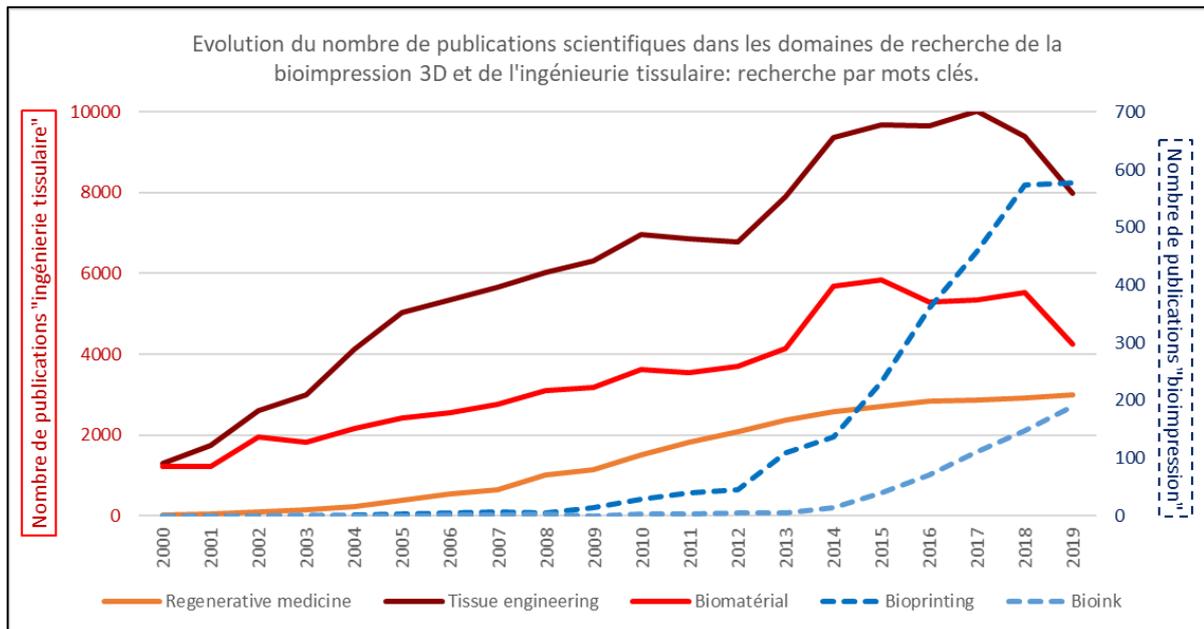
**Figure 4: Du positionnement de cellules à la bioimpression 3D**

**A.** Illustration des travaux de Klebe et al. (36) montrant le positionnement de cellules par technique de cytoscription sur une plaque de verre recouverte de 2% d'agarose. **B.** Illustration des concepts d'impression d'organe par imprimante cellulaire couplée à un ordinateur (adapté de Mironov et al. (37)). **C.** Représentation schématique du principe de la technologie d'impression d'organe: placement des agrégats de cellules couche par couche dans un gel en solidification avec fusion séquentielle des agrégats de cellules et transformation en tube 3D (adapté de Mironov et al. (37)).

### Biofabrication, bioimpression et bioassemblage

La bioimpression 3D est un vaste domaine de recherche actuellement en plein essor. Le nombre de publications scientifiques s'y rapportant est en expansion constante depuis une dizaine d'années (**Figure 5**). De multiples techniques se sont développées dernièrement, dont les plus récentes innovations sont régulièrement rapportées (24,38–42). Néanmoins, l'émergence de différentes techniques au sein de diverses unités de recherche a conduit à une terminologie hétérogène. Ce manque de clarté peut conduire à un mésusage des termes pour de nombreux scientifiques d'horizons différents et travaillant sur un sujet commun. C'est pourquoi, un collectif de spécialistes reconnus dans ce domaine a proposé une approche détaillée de ces définitions (5), et les mets régulièrement à jour

au grès des avancées technologiques (43,44), permettant ainsi de clarifier les relations entre les différents concepts de bioimpression.



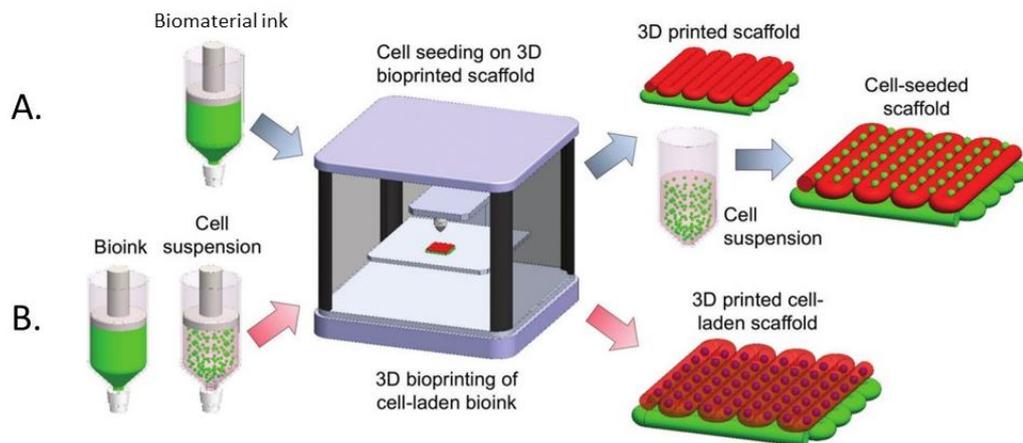
**Figure 5: Evolution du nombre de publications scientifiques dans les domaines de recherche de la bioimpression 3D et de l'ingénierie tissulaire.**

Recherche par mot clés effectuée sur la base de recherche Scopus (mise à jour : 01/11/19). L'échelle de gauche (rouge) rapporte le nombre de publications dans le domaine de l'ingénierie tissulaire ; celle de droite (bleue) se réfère aux publications dans le domaine de la bioimpression 3D.

Il est important de préciser que la bioimpression 3D s'inscrit au sein d'une thématique plus large, qui est le fruit du rapprochement des techniques d'impression 3D et des concepts de médecine régénérative et d'ingénierie tissulaire, nommée **biofabrication** (5). La biofabrication est un processus consistant à disposer des composants cellulaires et non cellulaires dans l'espace afin d'imiter la composition et la fonctionnalité des tissus humains (24). La biofabrication se définit également comme : « la génération automatisée de produits biologiquement fonctionnels avec une organisation structurale à partir de cellules vivantes, de molécules bioactives, de biomatériaux [...], d'agrégats cellulaires tels que des micro-tissus ou des constructions hybrides de matériel cellulaire, par bioimpression ou bioassemblage et tout processus de maturation subséquent » (44). Ainsi, le domaine de la biofabrication peut être abordé par deux stratégies: la **bioimpression** et le **bioassemblage** (44).

La **bioimpression** est définie comme « l'utilisation de processus de transferts assistés par ordinateur pour la structuration et l'assemblage de matériaux vivants et non vivants avec une organisation 2D ou 3D prescrite pour la production de structures bioartificielles utilisées dans les études de médecine régénérative, de pharmacocinétique et de biologie cellulaire de base ». Ainsi, « la fabrication additive d'échafaudages 3D capables d'instruire ou d'induire les cellules à se développer en une structure mimétique de tissu ou analogue de tissu, par exemple par le biais d'une interaction cellulaire distincte,

d'une induction hiérarchique de différenciation ou d'une évolution fonctionnelle des échafaudages fabriqués relève de la bioimpression » (44). La technique de bioimpression permet de déposer avec une haute résolution une encre pour impression, composée d'une matrice, de biomatériaux, de cellules, de biomolécules, avec une précision pouvant imiter la structure du tissu natif. La **Figure 6**, présente une illustration de ce concept. Le choix du type de biomatériaux utilisés et l'incorporation directe ou non des cellules au sein de l'encre varient en fonction de la technique d'impression utilisée. Ces notions seront évoquées plus en détails dans la partie II Les encres de biomatériaux et bioencres, page 50.



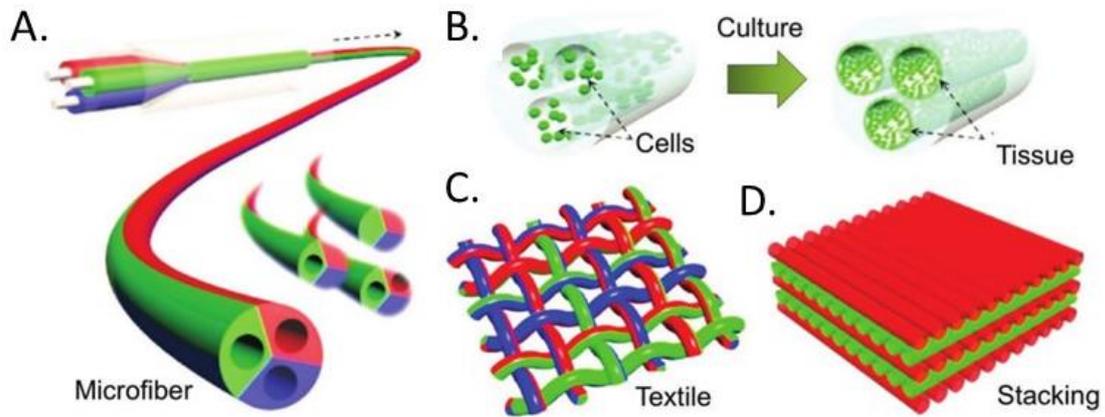
**Figure 6: Illustration schématisée du concept de bioimpression**

*A. Process d'impression avec dépôt de cellules après impression de l'échafaudage. B. Process d'impression avec mélange de l'encre et des cellules. Extrait de Pedde et al. (47).*

Le **bioassemblage** est une technique de biofabrication, alternative à la bioimpression. Elle s'en distingue par le fait que les constructions hiérarchisées en 2D ou 3D sont réalisées par l'assemblage d'unités de fabrication préformées et contenant des cellules. Parmi elles, il est possible de citer les sphéroïdes tissulaires, les pastilles cellulaires ou les fibres et les feuillets cellulaires (**Figure 7**) ou bien des structures plus complexes telles des organoïdes ou des micro-tissus constitués de cellules et de matrices extracellulaires. Ces blocs de construction plus complexes sont formés par auto-organisation cellulaire en culture 3D suivies par des étapes de fusion tissulaire et de maturation (5,44,45).

Les techniques d'impression 3D adaptées à la biofabrication sont nombreuses et les limites entre bioimpression et bioassemblage ne sont parfois pas aisées à discerner. Certaines techniques peuvent s'adapter autant à la bioimpression qu'au bioassemblage (on pense notamment aux techniques d'extrusion). Par exemple, dans le cas de l'impression de dépôts de sphéroïdes ou de cellules contenant des nanoparticules magnétiques, ces approches sont considérées par certains auteurs comme relevant de la bioimpression (mélange de ces éléments dans une bioencre puis dépôt par une technique d'extrusion). Elles sont cependant catégorisées par d'autres comme relevant du bioassemblage car les unités formées sont précisément placées puis associées entre elles en de plus

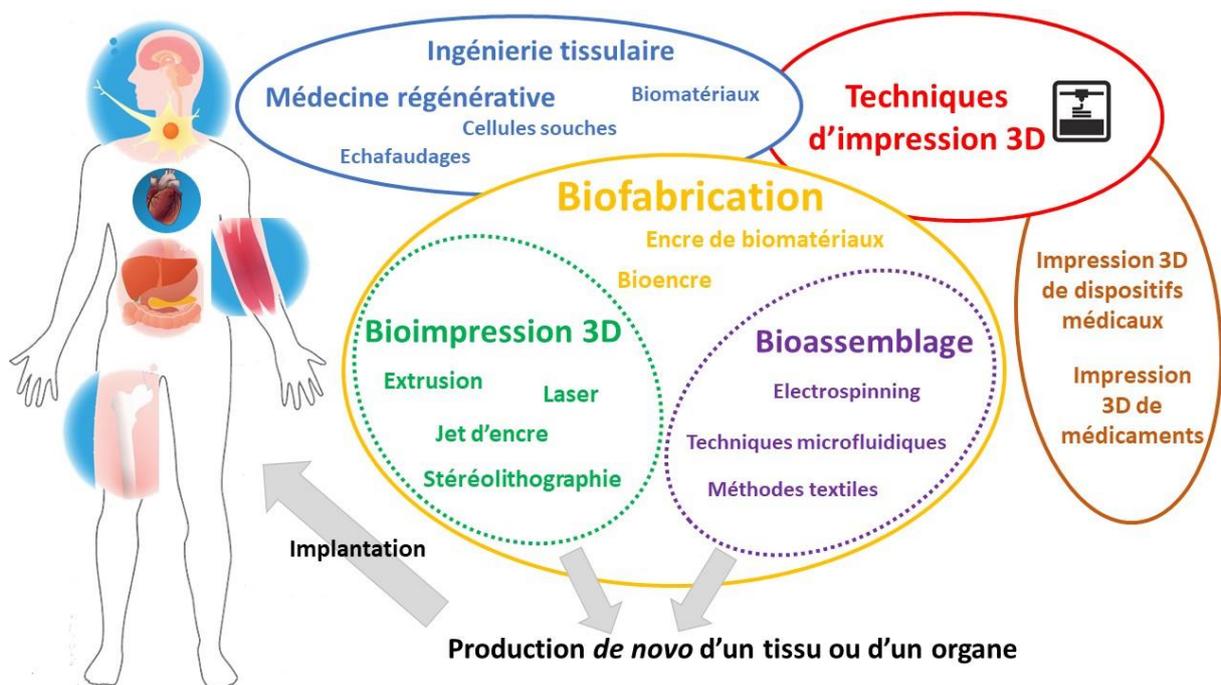
grandes unités (46). D'autres techniques sont cependant plus spécifiques d'une catégorie de biofabrication, comme les techniques adaptées de l'industrie du textile pour le bioassemblage: *electrospinning*, *meltspinning*, *wet spinning* et *microfluidic spinning* (47).



**Figure 7: Illustration du concept de bioassemblage de fibres cellulaires**

*A) Microfibrilles utilisées pour générer B) des vaisseaux biomimétiques et C, D) des échafaudages par C) approches textiles ou D) empilement des microfibrilles. Extrait de Pedde et al. (47).*

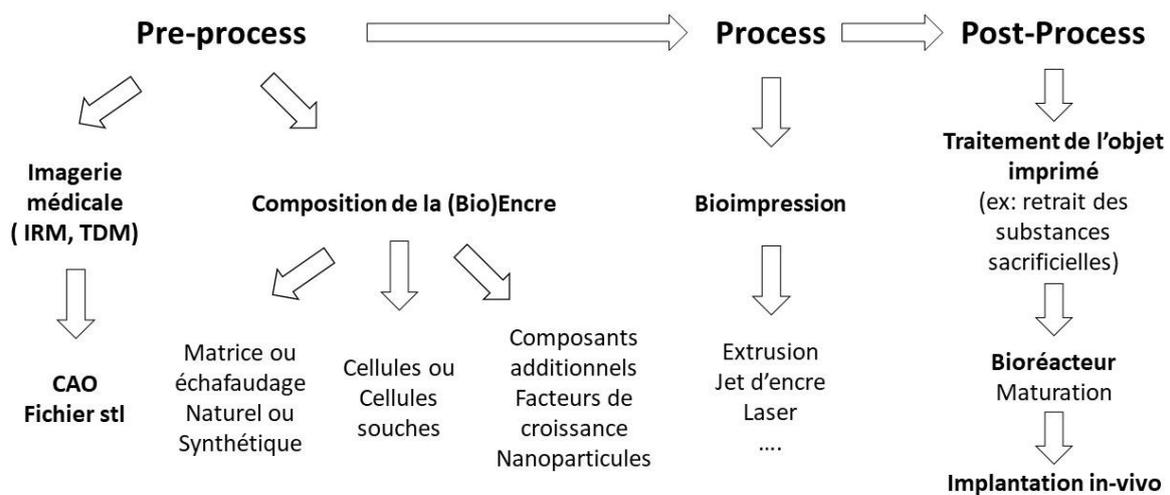
Les différences majeures entre bioimpression et bioassemblage au sein du domaine de la biofabrication ont ainsi été précisées dans cette partie. Connaître les spécificités de chacune de ces notions et la façon dont elles se positionnent les unes par rapport aux autres (**Figure 8**) permet de pouvoir mieux appréhender les techniques et approches utilisées en bioimpression 3D ainsi que la conception des encres et bioencres.



**Figure 8: De la médecine régénérative à l'impression 3D et la biofabrication**

## 1.2 Les étapes du processus de bioimpression

Classiquement, un process de bioimpression est découpé en trois étapes : **pré-process**, **process** et **post-process** (24,48). Le pré-process implique la réalisation d'un modèle 3D numérique obtenu à partir d'images médicales traitées par des logiciels de type CAO (conception assistée par ordinateur ; CAD en anglais pour « *computer aided design* ») et la sélection des matériaux appropriés à l'impression. Après le pré-process, les images conçues sont envoyées au système de biofabrication qui lance l'étape d'impression de l'objet. Enfin, durant la phase de post-process, les constructions imprimées sont transférées dans un bioréacteur pour mettre en route l'étape de maturation des tissus. Un résumé de ces étapes est illustré par la **Figure 9**.



**Figure 9: Illustration des étapes du process de bioimpression**

**Pré-process** : Avant de pouvoir imprimer un tissu ou un organe en 3D, il est nécessaire de créer un fichier numérique contenant les données indispensables à la recréation couche par couche de ces structures. Les informations sur l'anatomie, la structure histologique, la composition et la topologie des organes et tissus sont obtenues en utilisant diverses approches d'imagerie médicale comme l'IRM (imagerie par résonance magnétique) ou la TDM (tomodensitométrie) (49,50). Les images obtenues en 3D par ces techniques sont ensuite divisées en tranches horizontales en 2D. La structure souhaitée des modèles 3D numériques est recrée avec précision à l'aide d'un logiciel de CAO et stockée sous forme de fichiers de stéréolithographie (.stl) (en référence à la toute première technique d'impression 3D). C'est également au cours du pré-process que le choix du type d'encre et sa composition sont faits et tiennent compte de la technique de bioimpression (24,48).

**Process** : au cours de la phase de process, la bioimprimante dépose l'encre, précédemment sélectionnée, selon les informations du fichier .stl en coupe transversale 2D. La structure souhaitée est ainsi imprimée en 3D couche par couche. Les capacités d'impression de l'encre, déterminées par diverses propriétés physiques et chimiques, doivent être optimisées avec la technique d'impression

afin de garantir un dépôt homogène de l'encre. Il est à noter que plusieurs techniques d'impression et plusieurs types d'encres (si l'imprimante est équipée de plusieurs buses) peuvent être utilisées en même temps (24,48).

**Post-Process :** Enfin, l'étape de post-process impliquant le développement de structures biomimétiques, de supports mécaniques et de fonctionnalités biologiques, est une étape essentielle du développement des tissus ou organes matures en vue d'une applications *in vivo*. Des méthodes additionnelles de fabrication sont parfois couplées à la technique de bioimpression, notamment les supports de substrat et les modèles sacrificiels, pour créer des élasticités / des forces mécaniques plus élevées, des structures plus précises ou plus complexes. Plus important encore, une culture *in vitro* dans un bioréacteur (enceinte imitant les environnements *in vivo* des tissus) sera réalisée pour induire et améliorer la maturation de la construction, transformant ainsi les structures en tissus ou organes fonctionnels avant d'être implantée *in vivo*. La bioimpression *in situ* est quant à elle un cas particulier où la bioimpression est directement réalisée sur le sujet vivant sans étape de maturation *ex vivo* (24,48).

### I.3 Principales techniques de bioimpression

Il est courant de retrouver dans la littérature des revues rapportant les dernières avancées en bioimpression avec une classification des techniques en quatre catégories, la plus abordable pour une première approche dans ce domaine : bioimpression par jet d'encre, bioimpression par laser, bioimpression par extrusion et stéréolithographie (24,39,42,51–58). En effet, ces dernières sont les plus couramment utilisées en bioimpression 3D, notamment les techniques d'extrusion.

D'autres techniques moins courantes sont cependant retrouvées dans les travaux de bioimpression et biofabrication et des classifications plus poussées sont proposées (44,47). Ces différentes techniques ont toutes pour but de fabriquer un échafaudage/une matrice favorable à la croissance cellulaire et dont la composition (biomatériaux) mime l'environnement naturel d'un tissu. Elles se distinguent également sur la possibilité de pouvoir imprimer directement des cellules au cours du process d'impression ou non (cf. II. Les encres de biomatériaux et bioencres, page 50). Dans les paragraphes ci-dessous, ne seront évoquées que les quatre techniques principales de bioimpression. Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le **Tableau I**, page 41.

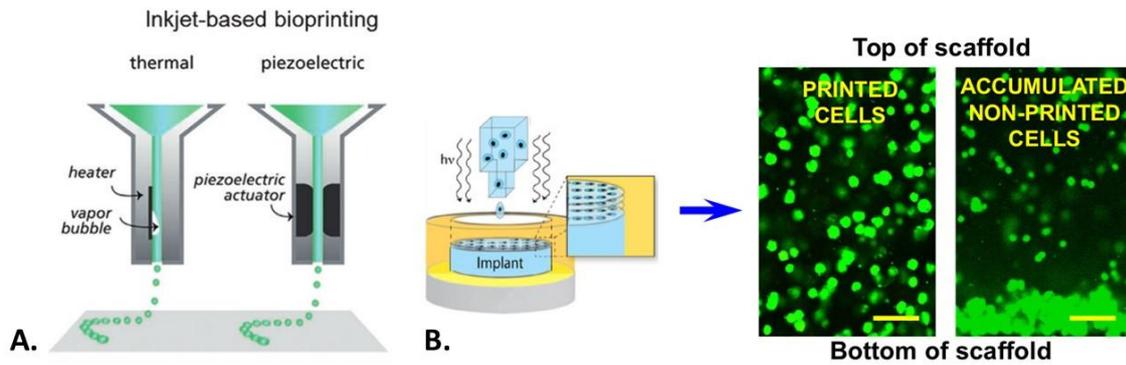
#### I.3.1 La bioimpression par jet d'encre

L'imprimante à jet d'encre a été inventée par la société Hewlett-Packard dans les années 70. 20 ans plus tard, elles ont été modifiées pour permettre le contrôle du dépôt sur l'axe Z et s'adapter aux approches de fabrication additive. La **bioimprimante à jet d'encre** (*inkjet-based bioprinting* ou *droplet-based bioprinting*) produit de petites gouttelettes d'encre (1 à 100 picolitres ; 10 à 50  $\mu\text{m}$  de diamètre).

Les deux méthodes les plus couramment utilisées diffèrent par la méthode de formation des gouttelettes d'encre : système piézoélectrique ou thermique (**Figure 10 A.**). La première utilise des cristaux piézoélectriques pour produire des ondes acoustiques qui génèrent une pression et forcent le passage de l'encre par la buse. Dans la seconde, le chauffage localisé de l'encre entraîne la formation de bulles, exerçant une pression sur l'encre qui est éjectée. Plusieurs études ont démontré que les cellules ne sont pas affectées par la température élevée locale (jusqu'à 300°C) en raison de la très courte période d'exposition (2  $\mu$ s) pendant le process d'impression. A l'inverse, la gamme de fréquences utilisée dans l'impression par système piézoélectrique peut entraîner des dommages cellulaires et une lyse. La bioimpression par jet d'encre thermique apparaît donc plus adaptée à l'impression simultanée de cellules (24). La viabilité des cellules post-impression peut ainsi atteindre 80 à 90% (24,55,58).

Les encres utilisées pour la bioimpression par jet d'encre sont majoritairement constituées d'hydrogels tels que l'alginate, le collagène, la fibrine, la gélatine méthacrylée (GelMA). Elles sont choisies en raison de la facilité d'éjection ou de leurs modalités de réticulation compatibles avec les différentes techniques de bioimpression par jet d'encre (59). La réticulation du gel contenu dans l'encre doit se produire *in situ* après la sortie de la buse et simultanément au processus d'impression (par exemple par photopolymérisation). Si elle se produit trop tôt, à l'intérieur de la tête d'impression, des bouchons peuvent être créés ; si elle ne se produit pas assez rapidement, la solution d'hydrogel non réticulé peut se propager et entraver la formation de la construction. Les contraintes de cisaillement caractéristiques du processus par jet d'encre peuvent influencer négativement la viabilité cellulaire. Les encres pour impression par jet d'encre doivent présenter de faibles viscosités (<10 mPa.s) et des densités cellulaires <10<sup>6</sup> cellules/ml. Une faible viscosité sous-entend que les molécules gélatrices utilisées sont en très faible concentration, ce qui peut influencer sur la stabilité des structures 3D imprimées. Malgré ces inconvénients, les imprimantes à jet d'encre rencontrent un certain succès pour leur facilité d'utilisation, leur résolution élevée (10-50 $\mu$ m), un faible coût, leur rapidité d'impression et la compatibilité avec diverses bioencres (24,55,60).

L'équipe de Gao *et al.* (61,62) a travaillé sur la bioimpression par jet d'encre et a imprimé des cellules souches mésenchymateuses humaines, simultanément avec du verre bioactif et de l'hydroxyapatite polymérisée, dans un échafaudage de poly (éthylène) glycol diméthacrylate (PEGDA). Par rapport au processus d'ingénierie tissulaire par ensemencement, les cellules présentaient une meilleure répartition dans l'échafaudage bioimprimé et évitaient une accumulation des cellules causée par la gravité, dommageable à la genèse de néo-tissus structurés (62) (**Figure 10 B.**).



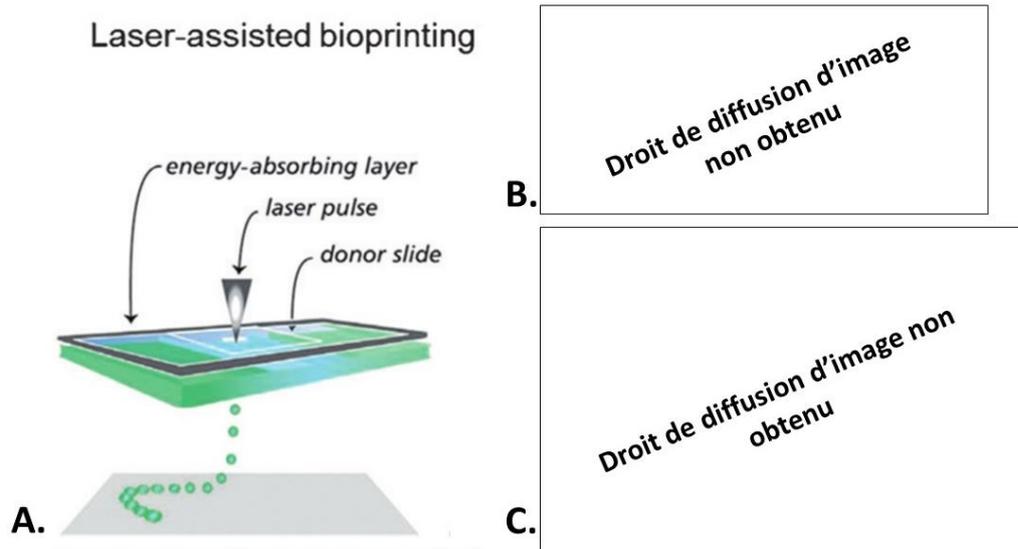
**Figure 10: Principe de la bioimpression par jet d'encre**

A. Représentation schématique des principales techniques d'impression par jet d'encre (Adapté de Pati et al. (39)). B. Illustration des travaux de Gao et al. (62) sur la biofabrication de substituts osseux et l'importance d'une répartition précise des cellules pour la création de nouveaux tissus.

### 1.3.2 La bioimpression laser

La **bioimpression par laser** (*laser-assisted bioprinting* (LAB) ou *biological laser printing*) est également connue sous l'acronyme LIFT (*laser-induced forward transfer*). Au cours de ce procédé, un faisceau laser pulsé est focalisé et balayé sur un substrat donneur qui est recouvert d'une couche métallique à haute absorbance d'énergie (ex : or, titane) et d'une couche d'encre biologique. La focalisation du laser en un point provoque une évaporation locale de la couche absorbante, créant ainsi une bulle sous haute pression qui propulse de petites portions d'encre vers un substrat de collecte. Le jet d'encre s'étend vers le collecteur avant de se séparer du substrat donneur, créant ainsi une connexion temporaire entre les deux substrats (**Figure 11**) (24,55).

Cette technique de bioimpression ne nécessite aucune buse et n'est donc par conséquent pas affectée par des problèmes d'obstruction ni de cisaillement contrairement aux techniques de bioimpression par jet d'encre et de bioimpression par extrusion. La bioimpression par laser est d'une haute résolution, comprise entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  et est également assez précise pour pouvoir déposer une cellule de façon singulière. Elle est influencée par divers facteurs, tels que les paramètres du laser, l'espace entre le substrat donneur et la plateforme du collecteur, l'épaisseur et la viscosité de la couche d'encre. Le LAB convient aux bioencres dont la viscosité est comprise entre 1 et 300 mPa.s et la densité cellulaire moyenne d'environ  $10^8$  cellules  $\text{ml}^{-1}$ . Une large gamme de cellules peut être imprimée dans ce processus et la viabilité des cellules est également bien conservée (95%)(42). Plusieurs types d'encres peuvent être utilisées dont les hydrogels et les céramiques. Pour imprimer des constructions 3D de haute résolution spatiale, la bioencre doit présenter des capacités de réticulation rapide. Parmi les encres compatibles avec la LAB, la réticulation ionique de l'alginate de sodium, la gélification de Matrigel® ou la polymérisation du fibrinogène induite par la température sont fréquemment utilisées.



**Figure 11: Principe de la bioimpression laser**

**A.** Principe de bioimpression par laser (Adapté de Pati et al. (39)) **B. et C.** :Travaux de Catros et al. (63) **B.** (a) et (b) Dépôt de cellules MG63 par technique LAB sur un biopapiers de PCL . **C.** (a) et (b) Test Live/Dead (4j et 48h, échelle 500 et 150 $\mu$ m respectivement) après impression de l'encre, montrant en vert les cellules vivantes, organisées en forme de cercle ; (c) observation de matrice extracellulaire sécrétée par les cellules MG-63 et fibres de PCL observées par SEM (échelle 20 $\mu$ m).

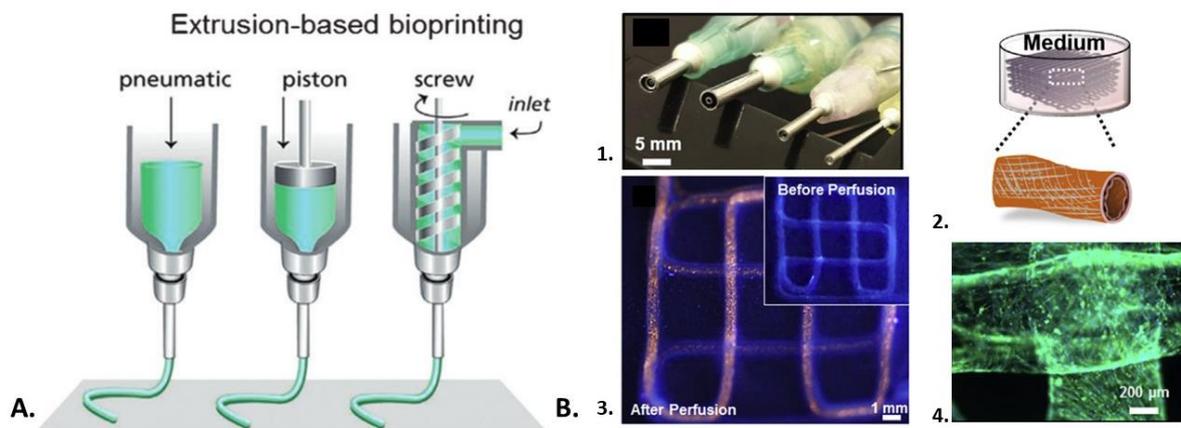
L'impression de plusieurs types cellulaires nécessite une préparation fastidieuse de couches individuelles chargées en cellules. La bioimpression par laser est une procédure assez coûteuse car elle requiert l'utilisation d'une diode laser à haute résolution et haute intensité. Le débit d'impression est également assez faible, rendant le processus d'impression assez long comparé aux autres techniques de bioimpression (24,51,55).

Par exemple, cette technique était utilisée dans les travaux de Catros *et al.* (63) où une bioencre était constituée de cellules MG63 (cellules humaines d'ostéosarcome) et d'alginate 1%. Les dépôts en forme de cercle, réalisés sur des biopapiers de polycaprolactone (PCL) ont présenté une viabilité et une prolifération cellulaire supérieure par rapport aux cellules déposées sans motifs (**Figure 11 B. et C.**). Ces dépôts ont ensuite pu être implantés avec succès chez la souris. Les coupes histologiques réalisées après l'étude ont montré une bonne intégration des implants avec la formation d'une couche fibreuse en leur sein, et une absence de réaction inflammatoire.

### 1.3.3 La bioimpression par extrusion

La **bioimpression par extrusion** est la méthode la plus privilégiée pour la fabrication d'architectures 3D chargées en cellules. L'encre, disposée dans des seringues est extrudée de façon continue soit par un système pneumatique, soit par un système mécanique (piston, vis sans fin) sur un substrat de réception (**Figure 12**). Contrairement aux bioimpressions par laser ou par jet d'encre, la bioimpression

par extrusion ne dispense pas de petites gouttelettes de bioencre, mais des filaments d'hydrogel plus larges (environ 150–300  $\mu\text{m}$  de diamètre), rendant la technique moins précise (résolution de 200-1000 $\mu\text{m}$ ) que la bioimpression par jet d'encre ou laser. Il est possible d'ajuster avec précision les paramètres d'impression appliqués à l'encre, notamment la vitesse de déplacement et la force d'extrusion. Ces imprimantes sont ainsi capables d'extruder de nombreux types d'encres (cf. II. Les encres de biomatériaux et bioencres, page 50), et prennent en charge une large gamme de viscosité, notamment les encres très visqueuses (30mPa.s –  $6 \times 10^7$  mPa.s). La densité cellulaire présente dans l'encre peut également être très élevée ( $>10^8$  cellules/ml) (55). Des études ont également montré que la viabilité des cellules après une bioimpression basée sur une extrusion est généralement modérée, entre 40 et 80% environ, en raison des fortes contraintes de cisaillement subies par les cellules au cours du processus d'extrusion (58).



**Figure 12: Principe de bioimpression par extrusion**

A. Représentation schématique des différents types d'impression par extrusion (Adapté de Pati et al. (39)). Illustration des travaux de Jia et al. (64) sur la bioimpression de structures tubulaires perfusables à l'aide de buses adaptées (1-3) et favorable à la croissance cellulaire de cellules souches mésenchymateuses sur une durée de 21j (4).

En effet, au cours de l'impression par extrusion, la pression exercée sur l'encre et le passage à travers la buse entraînent des contraintes de cisaillement élevées de l'hydrogel. Celles-ci peuvent rompre ou perturber les liaisons interconnectées du réseau moléculaire de l'hydrogel. Cet endommagement de la réticulation de l'hydrogel peut entraîner une baisse de la viscosité et une diminution de la fidélité de l'impression. L'hydrogel doit ainsi posséder des propriétés mécaniques et rhéologiques adaptées à l'impression par extrusion, notamment des propriétés rhéofluidifiantes et thixotropes (cf. III.2 La rhéologie appliquée à la caractérisation des gels, page 92) (42).

Quelques différences sont à noter entre les trois systèmes comme le débit et la capacité d'extrusion. En effet, le système pneumatique peut être sujet à des retards associés à la compression du gaz moteur (correction apportée par des systèmes à valve (58)); le débit est ainsi mieux contrôlé dans un système

à piston. L'extrusion par vis prend en charge plus aisément les encres de très fortes viscosités. Il est possible d'adapter plusieurs modules aux bioimprimantes par extrusion, notamment des modules permettant de réaliser la photoréticulation des gels après extrusion, ou la bioimpression de plusieurs gels en même temps (utilisation simultanée de plusieurs têtes d'impression).

L'impression par extrusion est privilégiée par rapport aux autres techniques pour plusieurs raisons : facilité d'utilisation, faible coût, contrôle aisé des formes, des pores, de la distribution cellulaire de l'échafaudage imprimé. Tous ces avantages contribuent à faire de la technologie de bioimpression par extrusion la technologie d'impression 3D la plus utilisée dans le commerce au cours des dernières années (24,42).

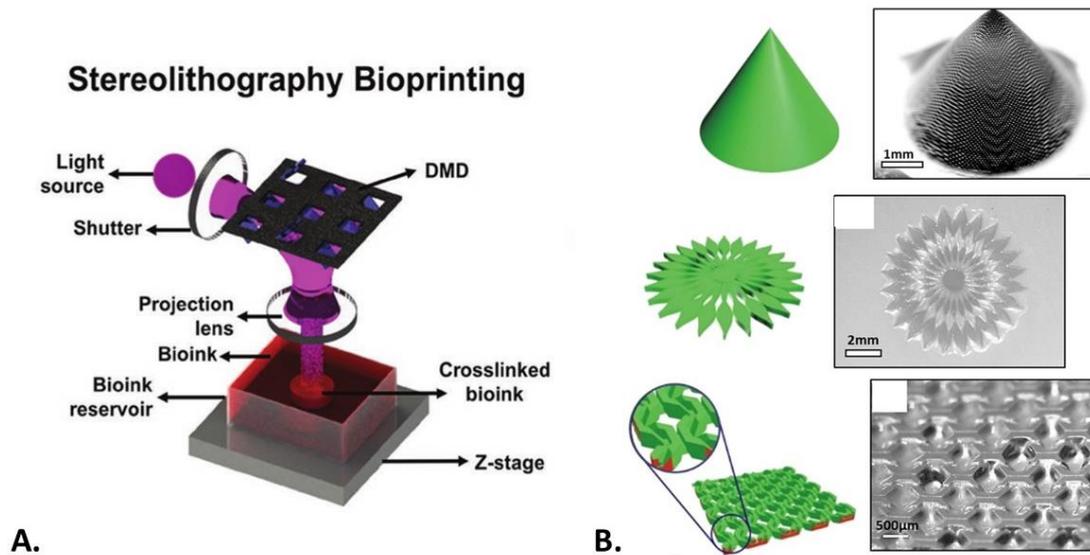
L'inconvénient majeur de la bioimpression par extrusion est sa résolution inférieure (200–1000  $\mu\text{m}$ ) par rapport à la bioimpression à jet d'encre ou laser. Cela peut limiter son application à certaines applications de tissus mous nécessitant de très petites tailles de pores pour une réponse tissulaire optimale. De plus, l'encrassement potentiel des buses et la diminution de la viabilité cellulaire due aux contraintes de cisaillement lors de l'extrusion peuvent également jouer en sa défaveur. Cependant, la sélection du biomatériau adéquat et sa concentration idéale au sein de la bioencre est importante pour la survie des cellules durant le processus d'impression, ainsi que pour le maintien de la viabilité et de la fonctionnalité des cellules à long terme (40,42).

Outre des structures pleines et denses, il est également possible de bioimprimer des structures tubulaires, afin d'envisager la vascularisation et la perfusion de tissus. A l'aide d'une bioencre composée de GelMA, d'alginate et de polyéthylène glycol tetra-acrylate (PEGTA) et de buses adaptées, Jia *et al.* (64) ont bioimprimé plusieurs constructions tubulaires multicouches. Ces structures perfusables ont présenté des propriétés biologiques favorables à l'étalement et la prolifération de cellules souches endothéliales encapsulées dans l'encre.

#### 1.3.4 La bioimpression par stéréolithographie

Les bioimprimantes utilisant la technique de **stéréolithographie** sont basées sur le concept de solidification sélective d'une encre (chargée en cellules ou non) par photopolymérisation (rayonnements UV). Ce processus d'impression couche par couche est contrôlé par un élément mobile sur un axe Z (**Figure 13 A.**). En stéréolithographie, un motif 2D est projeté sur le réservoir d'encre, ce qui permet de générer des structures 3D complexes sans recourir à une tête d'impression se déplaçant selon les axes X et Y. La vitesse de bioimpression est ainsi plus élevée par rapport aux autres imprimantes pourvues d'une buse. La stéréolithographie possède une haute résolution (1  $\mu\text{m}$ ). La réticulation sélective des encres par la lumière n'entraîne aucune contrainte de cisaillement sur les cellules, ce qui permet à ces imprimantes d'obtenir une viabilité cellulaire élevée (> 85%). Néanmoins,

cette viabilité est dépendante du type cellulaire et de sa sensibilité par rapport aux types de rayonnements UV appliqués (24,58).



**Figure 13: Principe de bioimpression par stéréolithographie**

**A.** Représentation schématique du système (adapté de Heinrich et al. (58)). **B.** Exemples de constructions de haute résolution imprimées par stéréolithographie. L'hydrogel utilisé dans cet exemple (biorésine à base de poly (vinyl-alcool) méthacrylé (PVA-MA) et de gélatine-méthacrylée (Gel-MA) à 1%) est favorable à l'encapsulation et la survie à long terme de cellules endothéliales humaines (Adapté de Lim et al. (65)).

Une large gamme de matériaux peut être utilisée. Par exemple, les matériaux à base de gélatine, de polypropylène fumarate ou de triméthylène carbonate modifiés chimiquement sont utilisés pour imprimer des implants osseux. Des polymères de haut poids moléculaire, tels que le DL-Lactide et le polyéthylène glycol diacrylate entraînent dans la composition d'échafaudages chargés de cellules. Une limite majeure de la stéréolithographie est la nécessité pour le liquide d'être transparent avec une diffusion limitée des rayonnements afin de permettre une réticulation uniforme. Cela limite la densité cellulaire dans la bioencres à environ  $10^8$  cellules/mL (24,58).

L'équipe de Lim *et al.* (65) a bioimprimé des constructions d'hydrogel à haute résolution (25 à 50 µm) à partir d'une biorésine de poly (vinyl-alcool) méthacrylé (PVA-MA) et de GelMA à 1% (**Figure 13 B.**). Celle-ci supporte l'ajout de cellules encapsulées et permet une survie à long terme (> 90%) jusqu'à 21 jours. De même, la synthèse endogène de tissus osseux et cartilagineux a été confirmée au sein de cette bioencres.

## I.3.5 Avantages et inconvénients des principales techniques de bioimpression

Les avantages et inconvénients des techniques d'impression sont récapitulés dans le **Tableau I**. Les critères de choix d'une technique par rapport à l'autre sont dépendants de la construction à réaliser, notamment de la résolution nécessaire, de la précision du dépôt cellulaire à appliquer, des biomatériaux utilisés et de leur compatibilité avec les techniques d'impression, des moyens financiers et de l'expérience dans ce domaine (certaines techniques étant plus accessibles que d'autres). Il est également possible de s'orienter vers une imprimante commercialisée ou de développer sa propre imprimante.

**Tableau I: Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients des quatre techniques principales de bioimpression**

	<b>Jet d'encre</b>	<b>Laser</b>	<b>Extrusion</b>	<b>Stéréolithographie</b>
<b>Simplicité d'utilisation</b>	Simple	Complexe	Simple	Moyenne
<b>Variété des biomatériaux</b>	Importante	Moyenne	Importante	Limitée
<b>Viscosité des biomatériaux</b>	Très faible < 10 mPa.s	1-300 mPa.s	30- 6x10 <sup>7</sup> mPa.s	Pas de limites
<b>Densité cellulaire</b>	Faible <10 <sup>6</sup> cell/ml	Faible à modérée 10 <sup>8</sup> cell/ml	Elevée >10 <sup>8</sup> cell/ml Compatibilité avec les sphéroïdes	Faible à modérée 10 <sup>8</sup> cell/ml
<b>Résolution</b>	Elevée 10-50µm	Elevée 10-100µm	Moyenne-Faible 200-1000µm	Moyenne-Elevée 100µm
<b>Dépôt unicellulaire</b>	Possible	Possible	Difficile	NC
<b>Vitesse d'impression</b>	Rapide 10 <sup>5</sup> gouttes.s <sup>-1</sup>	Lente - Moyenne 200-1600 mm.s <sup>-1</sup>	Lente 10 µm.s <sup>-1</sup> -700 mm.s <sup>-1</sup>	Rapide
<b>Viabilité cellulaire</b>	>85%	>95%	40-90%	>90%
<b>Coût</b>	Faible	Elevé	Faible-Modéré	Modéré
<b>Verticalité des constructions</b>	Faible	Moyenne	Bonne	Bonne
<b>Inconvénients</b>	Manque de précisions dans la taille et le positionnement des gouttelettes. Nécessité d'une encre à viscosité faible	Technique complexe	L'extrusion entraîne des distorsions cellulaires réduisant la viabilité cellulaire	Nécessite l'utilisation d'encres transparentes et photosensibles. L'utilisation d'UV peut être un frein à la viabilité de certaines cellules

NC= non concerné.

Adapté de (30,55,56,58)

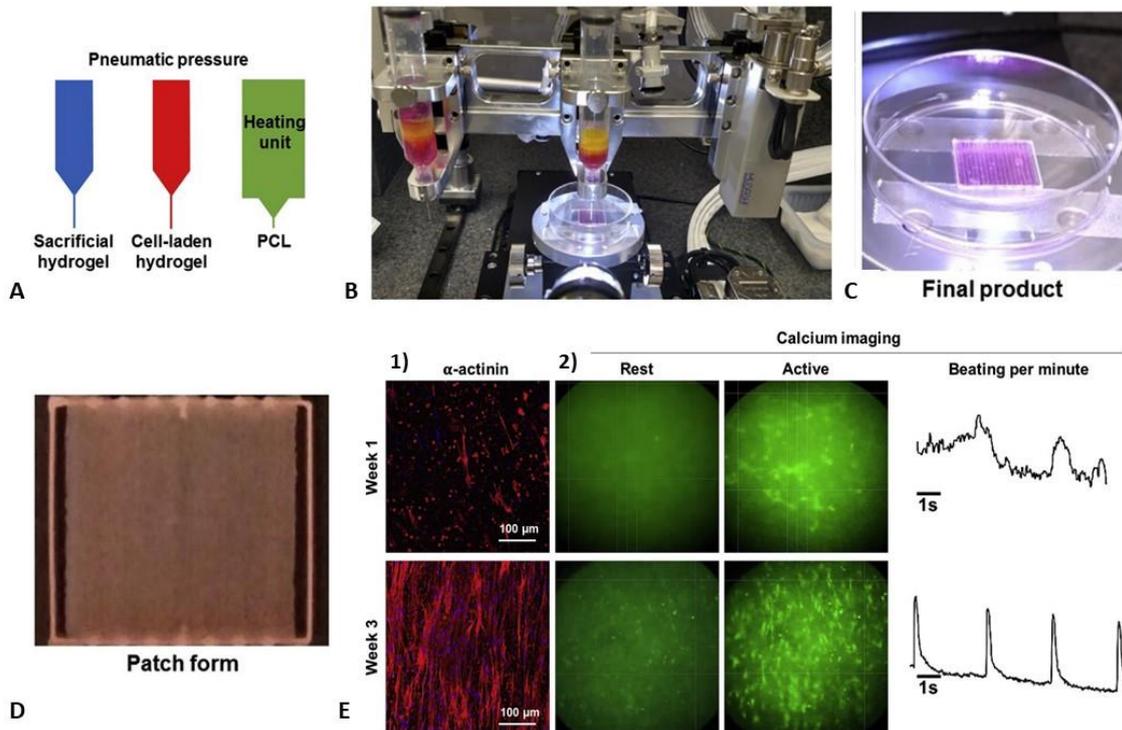
## 1.4 Exemples d'applications de la bioimpression 3D

Les technologies de bioimpression ont constamment évolué. Débutées par l'impression de quelques cellules sur un support adapté, plusieurs équipes ont réussi à bioimprimer des tissus ou des constructions macroscopiques ayant la forme d'un organe. Bien que la bioimpression d'un organe complet, directement implantable et capable de remplacer des fonctions organiques perdues ou endommagées n'a, à ce jour, pas encore été réalisée, de nombreux travaux très prometteurs nous confortent dans l'idée que nous sommes proches de cet objectif. Voici quelques exemples de travaux originaux, orientés par type d'organe imprimé.

### **Bioimpression du cœur**

L'équipe de Wang *et al.* (66) a bioimprimé des cellules cardiaques, organisées en tissus fonctionnels et douées de capacités de contractions synchrones. Cette construction a été réalisée à partir de cardiomyocytes primaires de rat, suspendus dans une bioencre composée de fibrine. Deux autres encres ont été imprimées dans le même process, une encre sacrificielle (composée de gélatine, de glycérol et d'acide hyaluronique (HA)) et une encre de soutien en PCL, par le biais d'une imprimante par extrusion pneumatique personnalisée (**Figure 14 A-D**). Les bioimpressions sous forme de patch cardiaques ont été cultivées *in vitro* durant 4 semaines. Les observations microscopiques par techniques d'imagerie calcique ont montré une bonne organisation cellulaire, avec un alignement uniforme et la formation d'un tissu cardiaque dense. Le développement tissulaire a également été confirmé par dosage de marqueurs spécifiques (l'actinine  $\alpha$  et de la connexine 43) par immunomarquage. Les cellules étaient électrochimiquement couplées, présentaient une contraction spontanée et répondaient à des stimulus chimiques (addition d'épinéphrine pour mesurer la force de contraction) (**Figure 14 E**).

Cette preuve de concept présente un grand potentiel dans la recherche sur la régénération du myocarde et doit démontrer toutes ses capacités d'évolution, notamment la production de constructions de taille et d'épaisseur plus importante (le dépôt a ici été réalisé sur une épaisseur <1mm). L'apport de l'impression 3D par rapport à des techniques d'ingénierie tissulaire classiques, a permis d'améliorer l'alignement cellulaire, essentiel pour favoriser les interactions cellules-cellules et la synchronisation de la contraction tissulaire.



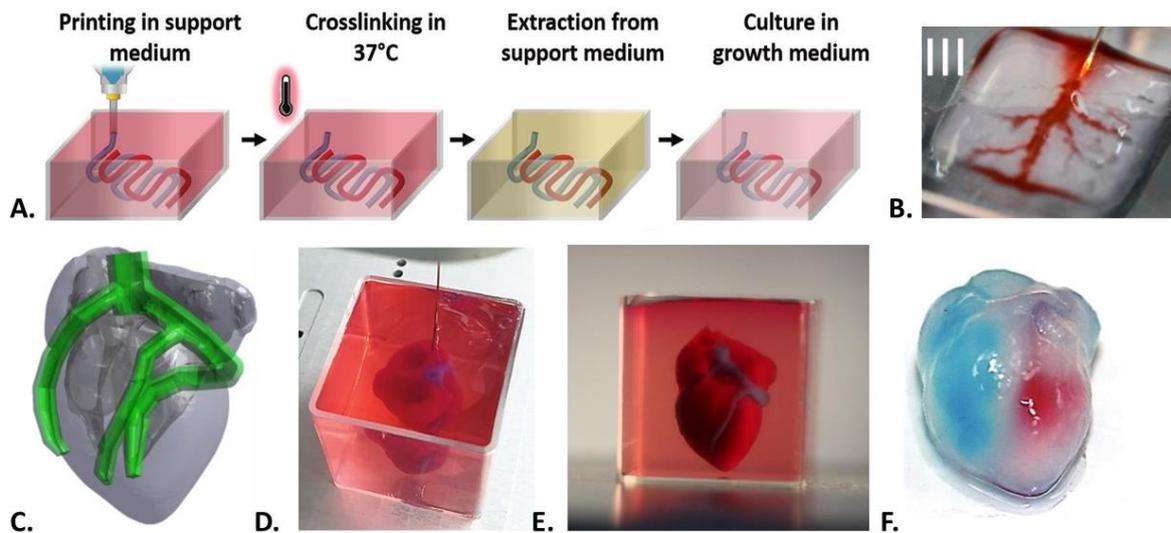
**Figure 14: Bioimpression de constructions tissulaires cardiaques sous forme de patches**

*A. et B. Imprimante personnalisée à trois têtes d'impression contenant trois encres et bioencres. C. et D. Bioimpression sous forme de patches cardiaques. E. Analyse par imagerie calcique des tissus cardiaques une et 3 semaines après bioimpression. 1) Immunofluorescence de l'α-actinine représentant les différents niveaux d'organisation cellulaire de développement (α-actinin (rouge) et du noyau cellulaire (bleu). 2) Analyse par imagerie calcique de la synchronisation des tissus cardiaques bioimprimés. A 3 semaines, le tissu cardiaque montre des contractions cardiaques régulières et synchrones. Extrait de Wang et al. (66).*

Noor *et al.* (67) ont également travaillé sur la formation de patches cardiaques, mais ont réussi à créer un modèle qui soit personnalisable et vascularisé. En effet, à partir d'IPSCs extraites chez l'homme puis isolées, des lignées de cellules endothéliales et de cardiomyocytes ont été produites. Mélangées à une encre élaborée à partir d'omentum (\*) humain à 1% et de gélatine à 10%, les patches ont été imprimés par une technique de bioimpression par extrusion à double tête. L'encre sacrificielle de gélatine, mélangée à des cellules endothéliales, est liquéfiée par chauffage > 37°C pour former la lumière des vaisseaux.

*(\*) l'omentum ou épiploon est une structure péritonéale formée par l'association de deux feuillets de péritoine accolés et reliant deux organes entre eux.*

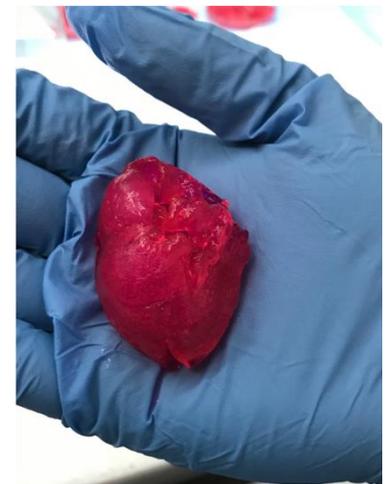
Sur le même principe, la bioencre a également été utilisée pour la construction de modèles tissulaires cardiaques présentant une conformation typique, creuse, et vascularisée. **Figure 15 C-F.** Cependant, dans cette preuve de concept, des étapes restent à franchir pour améliorer l'organisation cellulaire et obtenir une fonctionnalisation complète de ce tissu comme il a pu être observé dans la bioimpression de patches cardiaques.



**Figure 15: Bioimpression de patches cardiaques et preuve de concept de bioimpression d'un cœur**

**A.** Schéma du concept d'impression 3D. La construction est imprimée librement à l'intérieur d'un milieu support, suivie par une incubation à 37°C pour réticuler l'hydrogel. La structure est extraite par un processus de dégradation enzymatique ou chimique du matériau support et transférée dans un milieu de croissance pour mise en culture. **B.** Patch cardiaque imprimé et visualisation de la vascularisation par injection d'un colorant. **C.** Modèle CAD cardiaque. **D.** Modèle cardiaque en cours d'impression. **E.** Modèle cardiaque dans le milieu support à la fin du process d'impression. **F.** Après extraction, les ventricules gauche et droit ont été remplis avec un colorant rouge et bleu respectivement pour démontrer les cavités creuses et la séparation par le septum. Le modèle cardiaque présenté possède une taille d'environ 10x15mm. Adapté de Noor et al. (67).

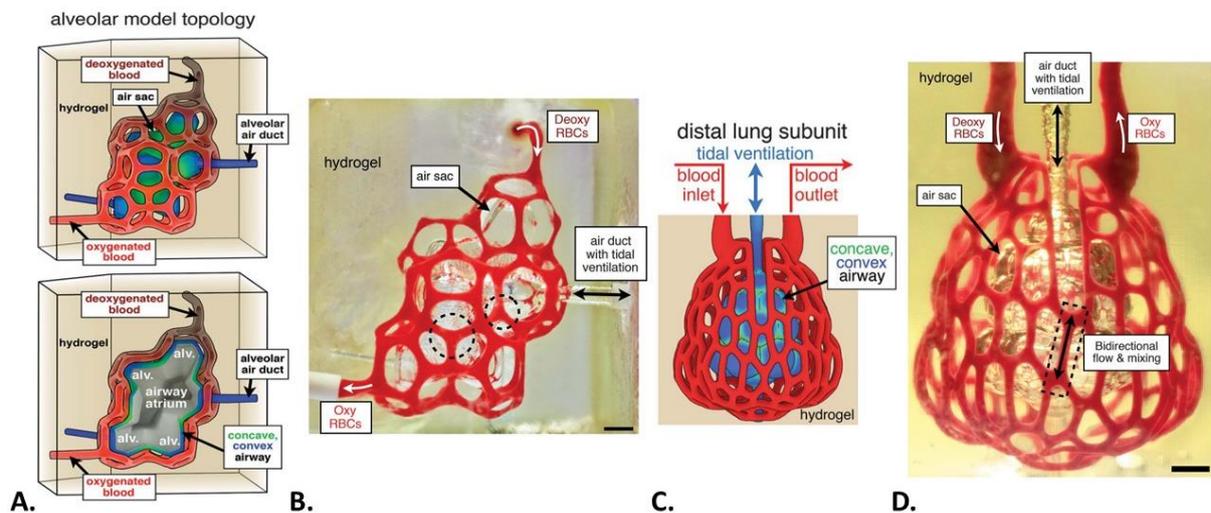
En septembre 2019, la société américaine BIOLIFE4D annonce la bioimpression d'un mini cœur d'environ 5cm à partir d'une bioencore mimant de façon spécifique la MEC cardiaque (68) (**Figure 16**) (procédé d'impression et composition de la bioencore non publiés). Cette avancée est un nouveau pas franchi dans la fabrication *de novo* d'organes, notamment du point de vue de la taille de l'organe imprimé. Cette société continue actuellement ses recherches pour arriver au but qu'elle s'est fixé : bioimprimer un cœur humain viable pour la transplantation.



**Figure 16: Cœur bioimprimé**  
Société BIOLIFE4D (68).

## Biofabrication d'un modèle pulmonaire

Grigoryan *et al.* (69) se sont penchés sur la conception par impression 3D de réseaux vasculaires complexes, enchevêtrés les uns dans les autres, afin d'étudier et reproduire les mécanismes d'oxygénation des globules rouges. Pour cela, cette équipe a fait appel à des techniques de bioimpression par stéréolithographie et ont utilisé des hydrogels photopolymérisables (PEG diacrylate (PEGDA) à 20%). Après le succès obtenu sur des modèles vasculaires simples (**Figure 17 A.-B.**), cette équipe a complexifié ses constructions en reproduisant les caractéristiques structurales du poumon, notamment les contraintes imposées par les mécanismes de ventilation et de distension des voies respiratoires. Des modèles alvéolaires bioinspirés ont été imprimés, incorporés dans des hydrogels capables de supporter des distensions mécaniques au cours de la simulation d'un cycle de ventilation (**Figure 17 C.-D.**). Ce modèle d'étude a permis de favoriser les échanges gazeux avec un flux sanguin continu de globules rouges désoxygénés à des vitesses variables (10 à 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). La saturation en oxygène des globules rouges est passée de 30% (valeur de base) à des valeurs comprises de 35 à 75% en diminuant progressivement le flux sanguin. Cette avancée majeure démontre la possibilité de recréer par impression 3D un réseau vasculaire complexe capables de favoriser les échanges gazeux et de réoxygéner un flux sanguin de globules rouges. L'étape suivante consistera à recréer ce réseau par bioimpression avec une encre contenant des pneumocytes, cellules majoritaires dans la composition des alvéoles pulmonaires.

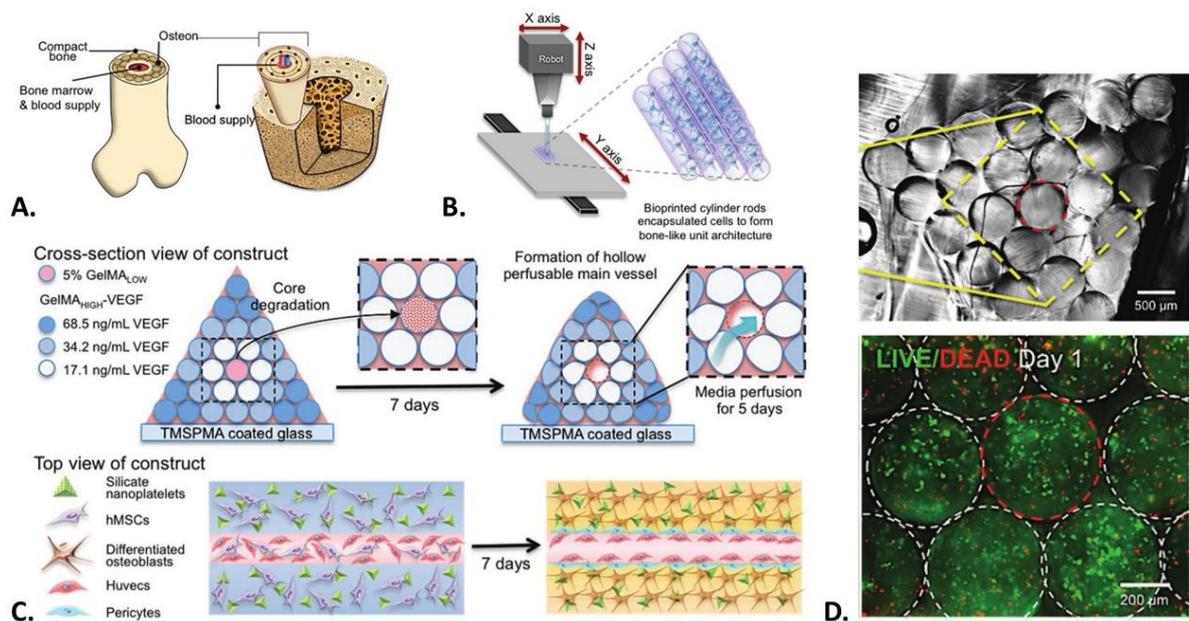


**Figure 17: Biofabrication d'un modèle pulmonaire**

**A.** Représentation schématique d'un modèle alvéolaire, vascularisé illustrant le flux sanguin et l'acheminement de l'air. **B.** Photographie d'un modèle imprimé avec perfusion de globules rouges désoxygénés (barre d'échelle 1mm). **C.** Représentation schématique du modèle de poumon distal. **D.** Photographie du modèle imprimé, perfusé et ventilé (barre d'échelle 1mm). Adapté de Grigoryan *et al.* (69).

## Bioimpression osseuse

Dans la littérature, de nombreux travaux se sont penchés sur la biofabrication de substituts osseux par impression 3D, chargés ou non en cellules. Peu d'entre eux, ont tenté d'intégrer au sein de leur constructions un système de vascularisation. Byambaa *et al.* (70) ont proposé une stratégie de bioimpression par extrusion pour fabriquer des constructions de tissus osseux microstructurés contenant une lumière vasculaire perfusable. Les constructions bioimprimées ont été utilisées comme matrices biomimétiques *in vitro* pour la coculture de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) et de CSM humaines dérivées de la moelle osseuse. Pour former le vaisseau sanguin perfusable, un cylindre central réalisé à partir d'hydrogel de GelMA à 5% a été imprimé. Ces cylindres ont été chargés soit en nanoparticules planes de silicate (*nanoplatelet*) afin d'induire l'ostéogenèse, soit en facteur de croissance VEGF (vascular endothelial growth factor) pour favoriser le développement vasculaire. La bioimpression et l'incorporation de GelMA dégradabile a permis la formation d'une lumière (Figure 17).



**Figure 18: Bioimpression osseuse**

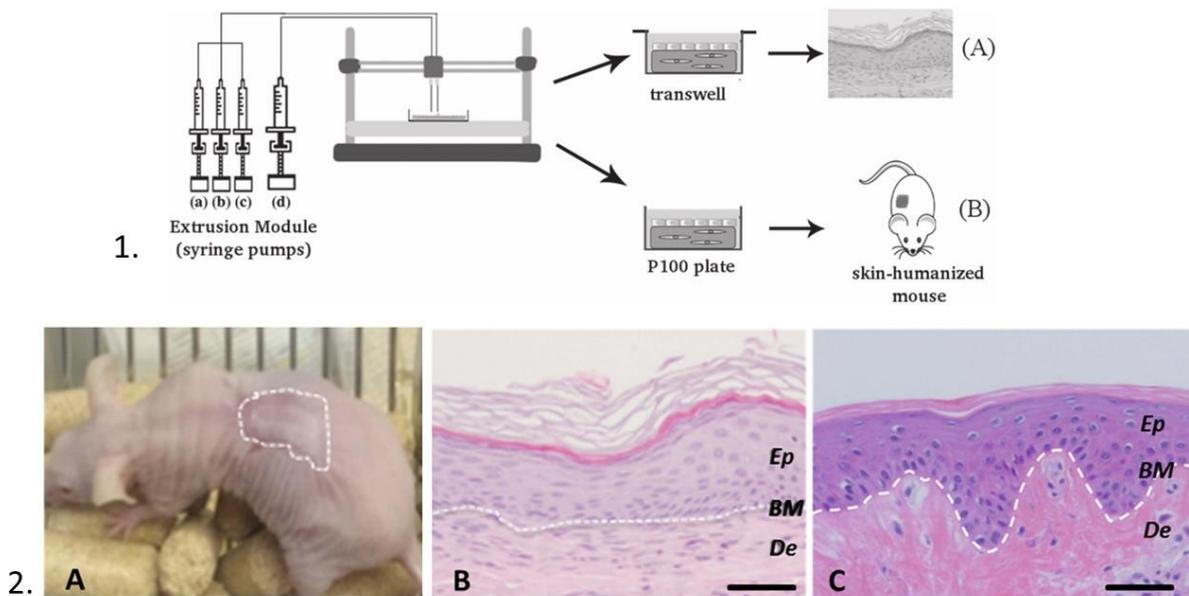
Fabrication d'une architecture 3D osseuse biomimétique contenant des niches ostéogéniques et vasculaires. **A.** Représentation schématique de la structure complexe de l'os. **B.** Schéma de la procédure de bioimpression 3D par extrusion de cylindres indépendants chargés en cellules. **C.** Illustration de la stratégie de bioimpression pour fabriquer une architecture osseuse complexe. Une lumière vasculaire perfusable bordée de cellules HUVEC a été conçue au sein d'une construction pyramidale en agencant des bâtonnets individuels formés à l'aide d'une bioencres de GelMA. Les cylindres ont été fonctionnalisés avec du VEGF et présentent différentes résistances mécaniques. Les trois couches extérieures chargées en CSM ont été chargées avec des nanoparticules de silicate pour induire une différenciation ostéogénique. **D.** (Haut) Vue en coupe de la construction bioimprimée et (Bas) test de viabilité cellulaire LIVE/DEAD® à l'intérieur de la construction réalisé un jour après impression (vert cellules vivantes, rouges cellules mortes) Adapté de Byambaa *et al.* (70).

Les CSM co-cultivées dans la fibre interne se sont différenciées en cellules musculaires lisses et ont favorisé la stabilisation et la maturation de vaisseaux, ainsi que la prolifération des cellules endothéliales. Ces vaisseaux ont pu être perfusés avec succès par du milieu de culture. Les nanosilicates ont également pu induire une différenciation ostéogénique, formant une structure stable sur l'ensemble de l'étude. Ainsi, un modèle reproduisant la microarchitecture complexe osseuse, et les différentes niches qu'elle contient, a pu être bioimprimé et a démontré une survie cellulaire convenable.

### **Bioimpression cutanée**

Des progrès importants ont été accomplis dans la mise au point de substituts *in vitro* mimant la peau humaine. Cependant, recréer un tissu cutané à partir de cellules humaines reste un défi à surmonter. Cubo *et al.* (71) ont bioimprimé de la peau à partir d'une bioencres contenant du plasma humain ainsi que des fibroblastes humains primaires et des kératinocytes obtenus à partir de biopsies cutanées (**Figure 19**). Les bioimpressions cutanées ont été greffées sur des souris immunodéficientes et se sont parfaitement intégrées aux tissus de l'hôte. Les analyses histologiques et immunochimiques menées sur les constructions cutanées ont démontré que la peau générée était très similaire à la peau humaine, et qu'en outre elle était équivalente à la peau recrée par des techniques manuelles.

Les progrès réalisés dans le développement de bioencres et la sélection de lignées cellulaires appropriées permettent de diminuer les temps d'incubation nécessaire à la maturation tissulaire. Ainsi, la bioimpression *in situ*, c'est-à-dire directement sur un modèle vivant, peut s'envisager. Albanna *et al.* (72) ont ainsi réalisé la bioimpression de cellules cutanées à l'aide d'une bioimprimante adaptée et couplée à des techniques d'imagerie, directement sur la plaie de souris. Cette preuve de concept a permis d'observer une fermeture rapide de la plaie ainsi qu'une régénération de l'épithélium chez les souris greffées.



**Figure 19: Bioimpression de peau**

1. Schéma du processus de bioprinting. Le module d'extrusion contient quatre seringues, chargées respectivement en fibroblastes humains (a), en plasma (b), en CaCl<sub>2</sub> (c) et de kératinocytes humains (d). Une première couche formée d'un hydrogel de fibrine et de fibroblastes est déposée pour reproduire le derme cutané. Puis, les kératinocytes sont déposés pour former une monocouche confluente. 1. (A) Bioimpressions non greffées. (B) Bioimpressions greffées sur le dos de souris immunodéficientes pour 8 semaines.

2. Analyse histologique (8 semaines après le greffage) de peau humaine imprimée avec biopsie greffée à des souris immunodéficientes. (A) Aspect visuel de la peau humaine greffée sur les souris immunodéficientes 8 semaines après post-greffe (ligne en pointillés : limite peau humaine/ peau de souris). (B) coloration de la peau humaine régénérée. (C) coloration de la peau humaine anormale. Les pointillés blancs indiquent la jonction dermo-épidermique (membrane basale). Ep= Epiderme, De= Derme. Barre d'échelle : 100 µm.

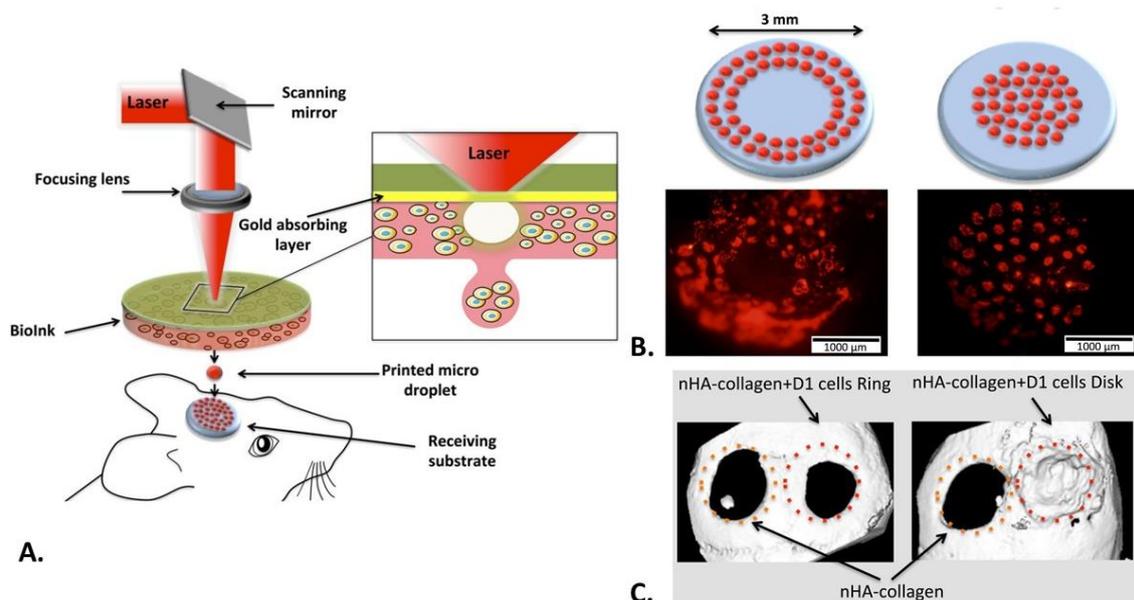
Adapté de Cubo et al. (71)

### Technique de bioimpression in situ

Les techniques de bioimpression *in situ*, nécessitent la mise au point de techniques d'impression et d'imagerie adaptées. En effet, là où la bioimpression traditionnelle de constructions s'effectue couche par couche sur des plans plats, la bioimprimante ne devant gérer qu'un déplacement sur les axes X et Y en même temps, la bioimpression *in situ* est confrontée à la non uniformité des supports sur lesquels elle doit être mise en œuvre, l'imprimante devant gérer à la fois une impression sur les 3 axes X, Y et Z.

Keriquel et al. (73) ont mis au point une technique de bioimpression laser (LAB) pour la bioimpression *in situ* de CSM (Figure 20). La bioencre, mélange de cellules, collagène et de nanohydroxyapatite (nHAp/collagène), a été imprimée sur des défauts du calvarium (os de la voûte crânienne) d'un modèle murin. Deux types de géométries d'impression cellulaire ont été testés (anneau et disque), afin de

démontrer l'impact de l'arrangement cellulaire sur la régénération du tissu osseux. La forme de disque a démontré une augmentation significative de la reconstruction osseuse comparée à la forme d'anneau. Ces résultats ont été confirmés par imagerie et analyse histologique 42 jours après implantation. Ils démontrent ainsi l'impact de l'organisation cellulaire sur la régénération tissulaire. Cette étude montre le potentiel de la technique LAB et ouvre de nouvelles perspectives pour le développement de nouvelles stratégies de bioimpression *in situ*.



**Figure 20: Bioimpression osseuse *in situ***

**A.** Représentation schématique de l'approche de bioimpression assistée par laser (LAB). Le faisceau laser pulsé focalisé sur un ruban (lame de verre recouverte d'une couche de métal absorbante) va générer une bulle dans la bioencre, dont la dilatation et l'effondrement induisent la formation d'une microgouttelette déposée sur les cavités osseuses de la souris. **B. (Haut)** Géométries des bioimpressions *in vivo* : anneau (gauche) et disque (droite). Une couche de bioencre cellularisée a été imprimée entre deux couches d'encre hybride (nHA/collagène). **B. (Bas)** Imagerie par fluorescence des cellules imprimées en forme d'anneau (gauche) et de disque (droite) à l'intérieur du défaut cavitaire de la souris immédiatement après l'impression. **C.** Imagerie par micro-tomographie à rayons X des constructions, 2 mois après bioimpression, imprimées en anneau (gauche) ou en disque (droite) et comparées à un témoin avec dépôt uniquement d'encre hybride (nHA/collagène). Adapté de Keriquel et al. (73).

## II. Les encres de biomatériaux et bioencres

### II.1 Introduction

Tout comme les imprimantes « classiques », les imprimantes 3D utilisent une encre, composée d'un ou plusieurs matériaux comme substrat. Les techniques d'impression sont nombreuses et les encres doivent ainsi s'adapter aux spécificités de chacune d'entre elles. En bioingénierie tissulaire, les encres peuvent également contenir des cellules et des éléments nécessaires à leur développement. Leurs définitions et leurs compositions sont précisées dans les parties ci-dessous.

#### II.1.1 Définitions : encres de biomatériaux, bioencres, concept d'échafaudages et encres sacrificielles

Les encres biologiques utilisées en bioimpression 3D sont appelées **bioencres (bioink)**. Il est à noter que les orthographes « *bioink* » et « *bio-ink* » ont pu être utilisées indifféremment, notamment dans les débuts de la bioimpression, mais c'est aujourd'hui celle de « *bioink* » qui est préférée. Jusque récemment, les bioencres étaient définies comme une « *formulation de matériaux, de molécules biologiques ou de cellules utilisées dans les technologies de bioimpression* » (44). Ainsi, toutes les formulations comportant ces trois entités dans des proportions variables (matériaux seuls, matériaux et molécules biologiques, cellules et matériaux biologiques par exemple) étaient considérés comme des bioencres. Cela apportait une certaine incertitude dans la composition exacte des formulations.

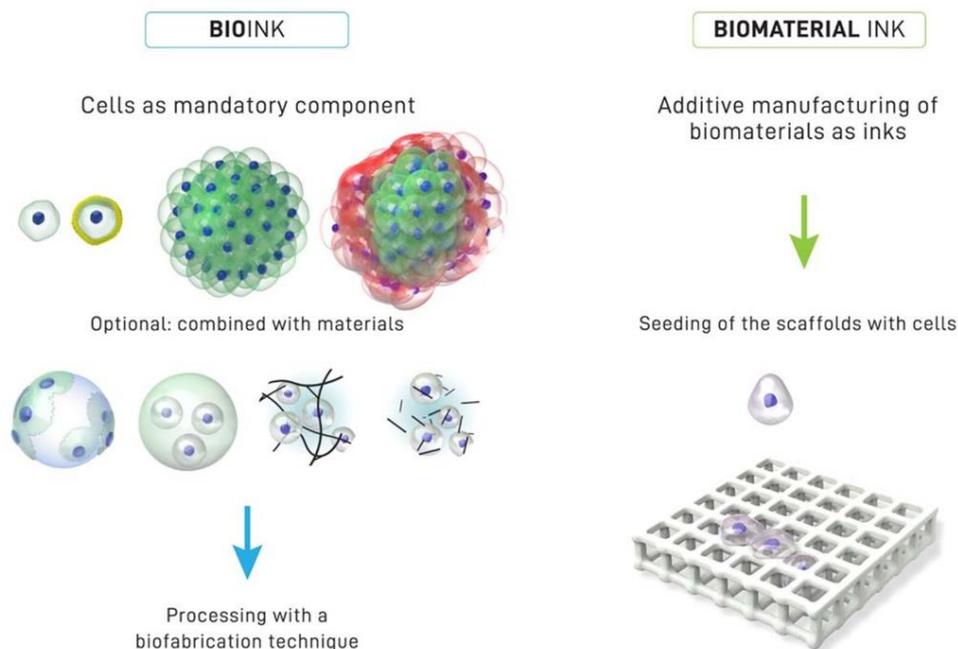
Par conséquent, un collectif d'auteurs a tenu à faire une mise à jour de cette définition pour mieux souligner l'importance du préfixe « bio » dans le terme bioencre (43). En effet, celui-ci se rapporte directement aux cellules, considérées comme un composant biologique à part entière de la formulation. C'est une notion importante car la présence de cellules au sein de l'encre limite considérablement les processus, et impose des conditions de traitement appropriées. Le terme de bioencre est alors décrit comme : « *une formulation de cellules appropriée au traitement par une technologie de biofabrication automatisée pouvant également contenir des composants biologiquement actifs et des biomatériaux* ». Ainsi, les cellules sont un composant obligatoire de la bioencre, de sorte qu'une formulation incluant des composants ou des molécules biologiquement actifs, mais ne contenant aucune cellule, ne peut être qualifiée de bioencre.

Par opposition, les « matériaux et biomatériaux qui peuvent être imprimés etensemencés avec des cellules après le processus d'impression, mais qui ne sont pas formulés directement avec des cellules, ne sont pas qualifiés de bioencre ». Le terme « **encre de biomatériaux (EBM) (biomaterial ink)** » est alors préféré. En outre, les hydrogels contenant des facteurs biologiques sont considérés comme des

encres de biomatériaux qui, par conséquent, seront considérés comme des bioencres suite à l'ajout de cellules dans cette formulation (**Figure 21**).

Ces définitions s'adressent autant aux deux stratégies principales de biofabrication : bioimpression et bioassemblage. Elles concernent toutes les applications pour lesquelles la biofabrication est mise en œuvre, y compris mais sans y être limité, l'impression de cellules, l'impression de tissus ou d'organes, la fabrication de modèles *in vitro*, l'impression de bactéries, algues et cellules végétales pour applications biotechnologiques. Ces définitions sont indépendantes de la technologie de biofabrication utilisée et couvrent l'ensemble des compositions possibles de cellules et de matériaux au sein des bioencres.

En résumé, une bioencre est composée d'un ou plusieurs matériaux ou biomatériaux principaux, la plupart du temps des hydrogels, de cellules et d'éléments annexes ou additifs comme des molécules biologiquement actives (ex : facteurs de croissance, ADN, ARNm, cytokines, enzymes), des nanoparticules pouvant servir à la libération de médicaments ou à l'amélioration des propriétés rhéologiques ou conférer une propriété particulière. L'ensemble de ces composants seront traités dans les parties suivantes de ce rapport dont un focus particulier sur les nanoparticules sera réalisé.



**Figure 21: Distinction entre bioencre (*bioink*) et encre de biomatériaux (*biomaterial ink*)**

**Figures de gauche :** dans les bioencres les cellules sont un composant essentiel de la formulation sous forme de cellules uniques, de cellules enrobées et d'agrégats cellulaires. Elles peuvent également être combinées avec des matériaux (ensemencés sur des microporteurs, par exemple) ou incorporées dans des hydrogels. **Figure de droite :** dans une encre de biomatériaux, un biomatériau est utilisé pour l'impression et le dépôt des cellules se produit après le process d'impression. Extrait de Groll et al. (43).

La présence ou non d'un matériau (ou biomatériau) comme composant principal de la formulation de la bioencre met en lumière les deux approches distinctes de bioimpression et bioassemblage. La plupart du temps, le biomatériau va servir de support à la construction d'un échafaudage cellulaire après impression. Le terme de **bioencres contenant des échafaudages (*scaffold-based bioink materials*)** est alors employé. Par opposition, l'absence de ces biomatériaux amène vers la formulation de **bioencres sans échafaudage (*scaffold-free bioink materials*)** (45).

La formulation de bioencres contenant des échafaudages, est le procédé le plus couramment utilisé et s'apparente en majorité aux approches de bioimpression. Les composants principaux de ces bioencres sont les hydrogels (naturels ou synthétiques) et les matrices extracellulaires décellularisées (MECd). Les formulations de bioencres sans échafaudage sont quant à elles utilisées dans le domaine du bioassemblage. Dans cette approche, des agrégats cellulaires (sphéroïdes tissulaires, pastilles cellulaires, brins tissulaires) sont d'abord concentrés pour former des néo-tissus sous forme de petites unités. Ces unités sont ensuite déposées pour former des motifs spécifiques et fusionneront pour donner un tissu mature et fonctionnel (45).

Certaines stratégies de bioimpression ont été conçues autour de l'utilisation d'encres dites « **encres sacrificielles** ». Une encre de ce type est utilisée au cours de la phase de process de bioimpression en tant que support temporaire. Elle est ensuite extraite en post-process pour générer un espace vide ou séparer d'autres éléments actifs de la construction bioimprimée (74). Par exemple, ces encres sacrificielles peuvent être composées d'hydrogels dont le passage de l'état solide à l'état liquide est généré par un changement de température, comme la gélatine ou le poloxamère Pluronic® F127. La gélatine pourra ainsi être extraite en soumettant les constructions bioimprimées à une température supérieure à 37°C (75). Dans le cas du Pluronic® F127, les constructions seront refroidies à 4°C (76). L'utilisation des encres sacrificielles permet entre autre de créer, au sein des structures bioimprimées, des microarchitectures particulières comme des pores, des canaux voire des vaisseaux dans le but de recréer un système vasculaire (74–76).

## II.1.2 Evolution des encres de biomatériaux et des bioencres

Depuis les premiers dépôts de biomatériaux, jusqu'à l'impression de cellules encapsulées dans une encre d'impression adaptée au dépôt de cellules, la composition des bioencres est passée par plusieurs phases, dont trois majeurs, qu'illustrent parfaitement les techniques de bioimpression par extrusion.

Les premières approches d'impression par extrusion avaient pour but de créer des matrices biomimétiques optimisées pour un ensemencement post-impression des cellules.

En effet, les échafaudages poreux étaient créés par des polymères biocompatibles sensibles à la chaleur (PCL, acide polylactique (PLA), acide polylactique et co-glycolique (PLGA)). Ce procédé,

nécessitant une montée en température importante, pour la plupart dépassant les 100°C, était incompatible avec l'impression directe de cellules (51).

L'objectif des approches suivantes était de créer des bioencres capables de directement réaliser des constructions à partir de matière biologique.

Afin de limiter l'impact sur la viabilité cellulaire, des modifications pour obtenir des conditions d'extrusion plus douces devaient être entreprises. Plusieurs biomatériaux comme les polysaccharides d'origine naturelle (ex : alginate de sodium) et des polymères synthétiques (conçus pour présenter une cytotoxicité minimale tout en conservant des propriétés biocompatibles) ont été utilisés. Cependant, les interactions de ces matériaux avec la matière biologique vivante s'avèrent limitées en l'absence de sites de liaison connus pour la MEC. L'ajout de molécules biologiquement actives comme le peptide Arginine-glycine-acide aspartique (RGD) permettent de promouvoir l'interaction cellule-matrice (51).

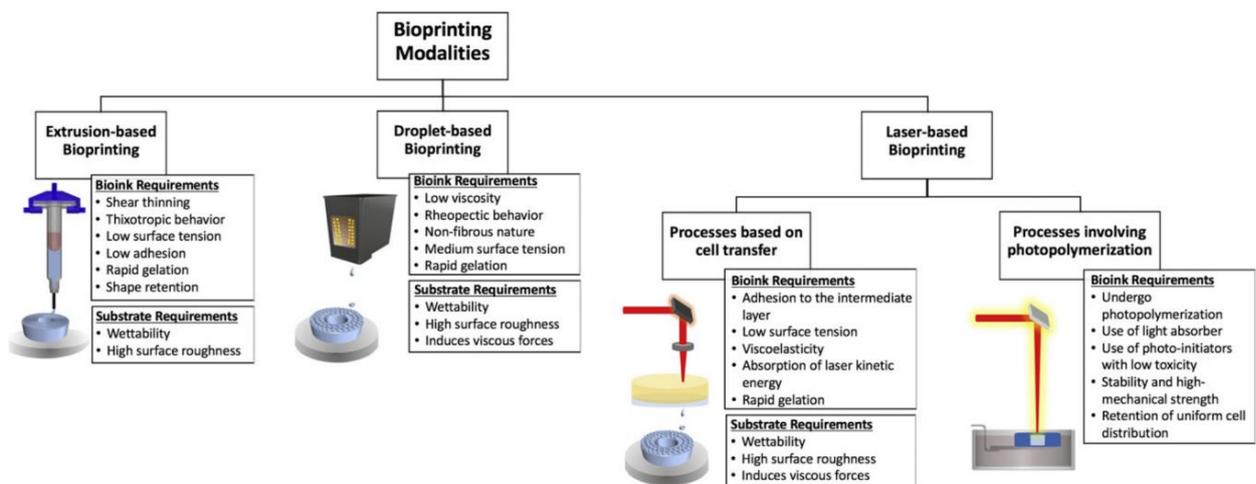
Enfin, les dernières approches visent à intégrer une certaine activité et des fonctionnalités biologiques au sein des encres. Pour y parvenir, il faut alors travailler avec des matériaux capables de reproduire ou d'imiter plus fidèlement la structure et la fonction de la MEC du tissu mère. Les défis majeurs résultent de la multitude des composants naturels de la MEC. Les capacités d'auto-assemblage d'hydrogels d'origine naturelle (gélatine, acide hyaluronique, cellulose, fibrine, collagène) permettent de reproduire un environnement mécanique proche de celui retrouvé dans les tissus natifs. Cependant, ces simples analogues de la MEC ne reproduisent que partiellement l'activité biologique des tissus naturels auprès de cellules. Cette activité dépend notamment de la teneur de la MEC en lipides, glucides, protéines et glycoprotéines qu'il reste difficile d'intégrer dans la formulation des bioencres. C'est pourquoi, la MECd a été utilisée directement comme bioencre. Cependant, les propriétés mécaniques de la MECd ne suffisent pas à imprimer des constructions suffisamment stables. Un compromis est donc nécessaire entre le biomimétisme et la capacité de construction de formes imprimées. Des matériaux composites, conjuguant des matériaux bioactifs avec des matériaux de renforcement inertes ont été conçus pour augmenter la capacité d'extrusion et la stabilité après impression. Il est possible de citer par exemple les mélanges de gélatine / alginate, la gélatine / PEG-acrylate, l'HA-acrylate, la gélatine acrylate (51).

### II.1.3 Propriétés idéales des bioencres

Les caractéristiques d'une bioencre sont régies par la nature, la concentration et les propriétés du ou des biomatériaux qui la compose. Déterminer la formulation optimale d'une bioencre est l'étape cruciale pour réussir une bioimpression. Les principales caractéristiques, idéales et recherchées lors de la conception d'une bioencre sont reportées ci-dessous (24,42,45,53,55,58,77).

## Compatibilité avec la technique d'impression et capacités d'impression

Les encres doivent **supporter le mécanisme d'impression** mis en jeu et ses paramètres (température, force exercée, énergie transmise). La capacité d'impression d'une encre dépend essentiellement de ses propriétés rhéologiques (viscosité, propriétés rhéofluidifiantes, thixotropie). Dans le cas d'une impression par extrusion, la bioencre doit posséder des propriétés rhéofluidifiantes et une viscosité adéquate. Ces propriétés vont lui permettre de s'opposer aux tensions de surface qui conduisent à la formation de gouttelettes, afin d'être extrudée sous la forme de filaments cylindriques durant le processus d'impression. Les hydrogels présentent une capacité d'impression supérieure aux autres types d'encres, cependant le succès d'une bonne impression est dépendant de leurs mécanismes de gélification. Si le procédé de gélification est incorporé au sein de l'impression couche par couche, l'impression d'hydrogels sera alors plus aisée. La bioimpression par extrusion offre la plus grande flexibilité parmi les modes de bioimpression existants, en raison du mécanisme d'extrusion et l'utilisation de gros diamètres de buses, les autres techniques ne supportant que l'impression d'hydrogels. Les exigences des encres rapportées selon la technique de bioimpression utilisée sont illustrées dans la **Figure 22**.



**Figure 22: Modalités des différents processus de bioimpression et exigences vis à vis des bioencres**

*L'adaptation d'une encre à une technique de bioimpression découle principalement de ses propriétés rhéologiques et de son mécanisme de gélification. Extrait de Hospodiuk et al. (45).*

## Résistance mécanique du matériau, fidélité d'impression et stabilité

La **résistance mécanique** du biomatériau principal de la bioencre doit être suffisamment élevée pour imprimer un support robuste favorable au développement cellulaire. La résistance mécanique va influencer sur le temps nécessaire à l'impression et la forme de la construction imprimée, avec une structure et une résolution qui doivent être fidèles au modèle CAD et au tissu d'origine à reproduire. Cette architecture 3D doit également être **suffisamment rigide**, pendant une période de temps définie *in vitro*, pour pouvoir être manipulée puis **facilement implantée**.

Cette résistance va notamment dépendre de la concentration du biomatériau, mais aussi des autres composants ajoutés à la bioencre. Plus la concentration sera augmentée, plus les propriétés rhéologiques du biomatériau et sa résistance mécanique de la structure imprimée seront importants. Cependant, le process d'impression sera moins aisé car la force mécanique ou l'énergie à appliquer seront plus importantes. Les contraintes de cisaillement induites seront plus fortes et les cellules contenues dans l'encre pourront être endommagées (impact sur la morphologie cellulaire, diminution de l'activité métabolique ou de l'adhésion des cellules au substrat, pouvant conduire à l'apoptose). Néanmoins, la réponse cellulaire globale dépend du type de cellule, certaines cellules étant plus résistantes que d'autres. Il est également connu que les milieux trop concentrés défavorisent la prolifération et la croissance des cellules, en limitant l'infiltration et l'étalement des cellules, et en affectant également la diffusion et la perméabilité du milieu à l'oxygène, aux nutriments et à l'évacuation des déchets cellulaires.

#### **Biomimétisme, cytocompatibilité et développement cellulaire.**

Les biomatériaux de l'encre encapsulent les cellules et doivent les protéger lors du processus d'impression. Les structures bioimprimées doivent conférer des propriétés permettant de **simuler l'environnement extracellulaire d'origine** des cellules utilisées et favoriser leur adhérence. **Rigidité** et **porosité** favorisent la diffusion cellulaire, la communication intercellulaire, l'échange de nutriments et d'oxygène et **l'élimination des déchets**. Les biomatériaux doivent ainsi favoriser la croissance, la différenciation, la division cellulaire et leur organisation afin de donner naissance à un tissu. La composition des biomatériaux doit également être **cytocompatible** et ne pas relarguer d'éléments néfastes pour les cellules. Cela est d'autant plus vrai lorsque les biomatériaux sont dégradés et digérés par les cellules en vue de leur remplacement progressif par une nouvelle MEC. Cette dégradation est un point clé pour une implantation ultérieure, évitant notamment le recours à une chirurgie secondaire pour son retrait. Le succès d'une bioimpression se détermine notamment par la mesure de la viabilité cellulaire à court et à long terme, l'étalement des cellules et leur prolifération, les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire et la fonctionnalité des constructions bioimprimées.

#### **Absence de toxicité, biocompatibilité et biodégradabilité**

Les biomatériaux implantés doivent être capables d'améliorer la formation d'un tissu *in vitro*, mais aussi de favoriser son intégration chez un hôte. Ceux-ci doivent être **biocompatibles**, c'est-à-dire provoquer une réaction immunitaire et inflammatoire négligeable. La dégradation et le remplacement progressif du biomatériau par une nouvelle MEC doit d'une part être rendu possible une fois implanté (**biodégradabilité**), et cette dégradation doit d'autre part ne pas produire de composés potentiellement toxiques pour l'hôte. Il est certain que tout matériaux biologique ou non biologique implanté provoque une réponse immunitaire de l'hôte. Cependant ces réactions varient en intensité

selon la nature et la concentration du biomatériau. Le pire scénario pouvant conduire au rejet total de l'implant.

### **Ressource, facilité d'utilisation et coût**

Outre les propriétés précédemment citées, un biomatériau idéal serait un biomatériau qui soit **facilement produit**, notamment à grande échelle avec une variabilité minimale d'un lot à l'autre, dont la manipulation et l'impression soient aisés, et ce avec un coût qui soit raisonnable et en adéquation l'utilisation qui en sera faite.

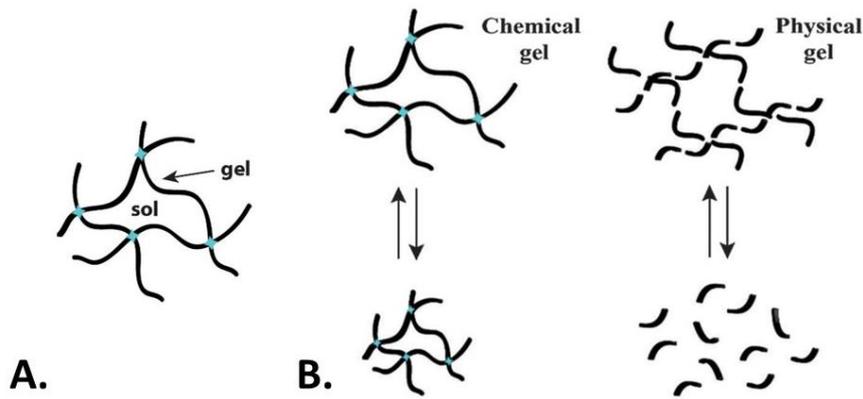
En conclusion les propriétés idéales recherchées d'un biomatériau pour la composition d'une bioencres sont toutes difficilement réunies en un seul et unique biomatériau. Les exigences relatives aux processus de bioimpression et à la culture cellulaire sont souvent opposées. Une solution possible à ce problème consiste à combiner des biomatériaux optimisés pour la culture cellulaire avec des matériaux offrant une stabilité mécanique et facilitant la fidélité de forme. Néanmoins, il est urgent de disposer de formulations de bioencres standardisées et permettant leur utilisation dans différentes applications de bioimpression (24,42,45,53,55,58,77).

## II.2 Hydrogels polymériques et matrices extracellulaires utilisés en bioimpression

Les hydrogels sont couramment utilisés en médecine régénérative pour la formation de pansements protecteurs et favorisant la cicatrisation, ou la délivrance de médicaments avec une cinétique appropriée et dépendante de la réticulation de l'hydrogel. Mais c'est surtout leur forte teneur en eau, leur capacité à générer des supports et structures cellulaires en 3D, leur biocompatibilité et la possibilité de mimer un environnement similaire à la MEC qui génère leur succès en bioimpression. Les hydrogels sont ainsi utilisés comme composants majoritaires des bioencres contenant un échafaudage (45,78).

### II.2.1 Mécanisme de gélification des hydrogels

Les **hydrogels** sont constitués de molécules, principalement des polymères, douées de capacités de gélification. C'est-à-dire qu'elles sont capables de former un réseau par un mécanisme de réticulation. Sur le plan microscopique, un hydrogel est composé d'un réseau de type solide, retenant en son sein un solvant aqueux et formant sur le plan macroscopique une entité continue (**Figure 23 A**). Le solvant est le composé majoritaire d'un hydrogel pouvant représenter jusqu'à plus de 99% de son poids. Malgré la part importante occupée par le solvant, le réseau prévient sa fuite, et les propriétés rhéologiques exprimées par un hydrogel sont celles d'un solide (79).



**Figure 23: Illustrations schématisées de la formation d'hydrogels polymériques**

**A.** Représentation schématique des composants d'un gel : un réseau solide (gel) retenant en son sein un liquide (sol). **B.** Formation d'un gel par réaction chimique ou physique. Adapté de Peters et al. (79).

Les hydrogels polymériques sont classés en deux catégories principales de par la nature des molécules gélatrices : les **hydrogels d'origine naturelle** et les **hydrogels d'origine synthétique** dont les principaux exemples seront évoqués dans la partie ci-après. Il est également possible de classer les hydrogels naturels par la provenance de leurs molécules gélatrices : le collagène, la fibrine, la gélatine sont généralement dérivés des vertébrés et possèdent des molécules de signalisation inhérentes à l'adhésion cellulaire. Par opposition, les hydrogels comme l'alginate et l'agarose dérivés d'organismes végétaux tels que les algues ne possèdent pas ces signaux moléculaires (45). Les hydrogels peuvent également être classés selon la nature du mécanisme de réticulation (*cross-linking*) mis en jeu : mécanisme physique, chimique, enzymatique.

Les hydrogels dont la réticulation dépend d'un **mécanisme physique**, lient leurs molécules gélatrices par des liaisons non covalentes, notamment par liaisons ioniques, liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes, forces de van der Waals, chélation métallique, interactions  $\pi$ - $\pi$  ou auto-assemblage de molécules amphiphiles (**Figure 23 B**). L'avantage est la non utilisation d'agents exogènes pour amorcer la réticulation, ce qui minimise le risque de contamination chimique ou de toxicité induite. La réticulation nécessite parfois un apport énergétique (température) pour amorcer la réticulation. Les nœuds de réticulation ne sont pas fixes sur des hydrogels physiques, ainsi un mécanisme de gélification physique est possiblement réversible (45,80).

Les hydrogels formés par **réaction chimique** se lient par des liaisons covalentes qui confèrent à ces gels une meilleure stabilité mécanique en comparaison aux hydrogels réticulés par mécanisme physique (**Figure 23 B**). Leur organisation permanente ne faiblira que si les liaisons covalentes sont rompues. La réticulation chimique implique l'utilisation d'agents de réticulation exogènes ou par photo-irradiation. Cependant, l'utilisation d'un agent de réticulation peut induire des réactions

indésirables avec la surface de l'hydrogel ou entraîner une cytotoxicité. Parmi les liaisons chimiques, il est possible de citer les liaisons formées à l'aide de bases de Schiff. Elles consistent en une addition nucléophile d'une amine à une fonction carbonyle par le biais d'agents de réticulation contenant une fonction aldéhyde comme le glutaraldéhyde. Une autre méthode utilisée est la photopolymérisation qui permet de former un réseau polymérique à partir de monomères, le tout initié par la présence d'un photo-initiateur qui forme des espèces moléculaires excitées lors de l'irradiation à la lumière (45,81).

Parmi les mécanismes de **réticulation enzymatique**, le plus couramment utilisé est celui de la fibrine qui mime le schéma de la coagulation sanguine. De la thrombine (sérine protéase) est ajoutée à des hydrogels contenant du fibrinogène pour convertir cette glycoprotéine en fibrine. Les hydrogels de fibrine sont caractérisés par une bonne cytocompatibilité et une bonne adhérence cellulaire. Il est possible de modifier l'intégrité des gels de gélatine en utilisant la transglutaminase. Cette dernière catalyse la formation de liaisons isopeptides par une réaction induite par transamidation entre un résidu de glutamine et un résidu de lysine. Thrombine et transglutaminase sont deux enzymes dont l'action est dépendantes de la concentration en calcium (45).

### II.2.2 Hydrogels naturels

Les hydrogels d'origine naturelle sont utilisés en bioimpression pour leur aptitude à offrir aux cellules un environnement cellulaire favorable. En effet, les biomolécules naturelles permettent de reproduire des structures et des interactions biochimiques et biophysiques mimant celles des MEC natives. L'attachement, le développement et la différenciation des cellules en sont facilités. Les hydrogels naturels sont biocompatibles, peuvent être facilement intégrés à un organisme hôte, ont de très faibles propriétés antigéniques et les produits issus de leur dégradation sont non toxiques (82–85).

Quelques-uns des principaux hydrogels d'origine naturels couramment utilisés en bioimpression sont présentés dans les paragraphes ci-dessous. La **Figure 24** illustre plusieurs exemples d'applications.

**Agarose.** L'agarose est un polysaccharide (1,3  $\beta$ -D-galactopyranose et 1,4- 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galactose) extrait d'algues marines qui subit une gélification progressive à basse température et, en fonction des dérivés formés par hydroxyéthylation, se liquéfie à des températures allant de 20 à 70°C. À l'état solide, l'agarose est fragile, mais conserve sa forme pendant une longue période à une large plage de températures. Utilisé seul, l'agarose est un matériau médiocre pour la culture cellulaire (adhérence et prolifération cellulaire faible). C'est pourquoi il est utilisé plutôt en mélange avec le collagène et la gélatine (**Figure 24 A.G.** et **Figure 25 A.**)(24,45,53).

**Alginate.** L'alginate est un polysaccharide linéaire (alternance de  $\beta$ -D-mannuronate et d'unités  $\alpha$ -L-glucuronate) dérivé de la paroi d'algues brunes. Sa réticulation nécessite la présence de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ ) formant un pont entre deux chaînes voisines. Biocompatible, il nécessite cependant quelques

modifications chimiques pour promouvoir l'attachement cellulaires, comme le greffage à motifs RGD (Arg-Gly-Asp). D'un coût faible, il est couramment utilisé en bioimpression par extrusion (**Figure 24 B.** et **Figure 25 B.**) (24,45,53).

**Chitosan.** Le chitosan est un polysaccharide à structure linéaire (composé de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamine désacétylée et de N-acétyl-D-glucosamine acétylée) obtenue par désacétylation de la chitine. Il est capable de gélifier en présence de soude. Il est très utilisé en ingénierie tissulaire pour la régénération du cartilage, la formation d'éponges, ses propriétés hémostatiques et antibactériennes. Le chitosan est biocompatible et biodégradable (**Figure 24 C.** et **Figure 25 C.**) (24,45).

**Collagène.** Le collagène est une protéine à triple hélice. Elle est le composant le plus abondant de la MEC des tissus conjonctifs de mammifère. Il est ainsi biocompatible et facilite non seulement l'adhésion des cellules mais améliore également la fixation et la croissance des cellules grâce à l'abondance des domaines de liaison à l'intégrine. Le collagène est liquide à basse température et forme une structure fibreuse à température élevée ou à pH neutre. La gélification est lente à 37°C, ce qui allonge le processus d'impression et affecte également l'homogénéité de répartition des cellules (la gravité les entraînant avant la gélification de la matrice). Le collagène possède de faibles propriétés mécaniques et nécessite généralement l'ajout d'un hydrogel de soutien (ex : alginate, Pluronic®)(**Figure 24 D.** et **Figure 25 D.**)(24,45).

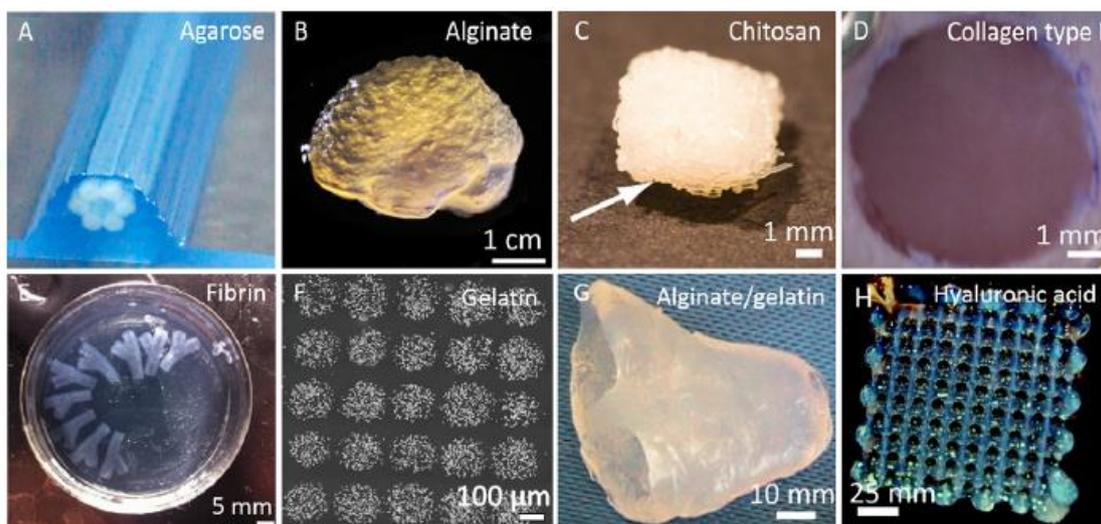
**Dextran.** Le dextran est un polysaccharide, composé de la répétition d'unités  $\alpha$ -D-glucopyranose. Non toxique et hydrophile, utilisé en ingénierie tissulaire. Biodégradable, facilement dégradé, son dérivé méthacrylé a été utilisé en bioimpression (53) (**Figure 25 E.**).

**Fibrine.** Comme précédemment évoqué, la fibrine est une glycoprotéine formant des hydrogels suite à la réaction enzymatique de la thrombine sur le fibrinogène. La fibrine favorise la croissance et la prolifération cellulaires mais donne des gels de faible résistance. En raison de l'absence de propriétés rhéofluidifiantes de la thrombine et du fibrinogène, la fibrine est rarement extrudée. Elle est cependant plutôt utilisée dans les imprimantes à jet d'encre en mélange au collagène ou à l'alginate. L'inconvénient de son utilisation pour des applications *in vivo* est la possibilité d'une réaction immunitaire. De plus, la dégradation de la fibrine est rapide et ne favorise pas la culture à long terme (**Figure 24 E.** et **Figure 25 F.**) (45,53).

**Gélatine.** La gélatine est produite par la dénaturation du collagène et forme des gels à basse température. Facilement manipulable, d'un faible coût, biocompatible et biodégradable, elle permet une bonne adhésion cellulaire et favorise différenciation et prolifération cellulaire. Cependant, la gélatine non modifiée est aisément liquéfiée à 37°C et présente de faibles propriétés mécaniques. Des dérivés de gélatine, comme la gélatine méthacrylée, ainsi que des mélanges avec d'autres gels, sont utilisés en bioimpression (**Figure 24 F.G.** et **Figure 25 G.**) (24,45,53).

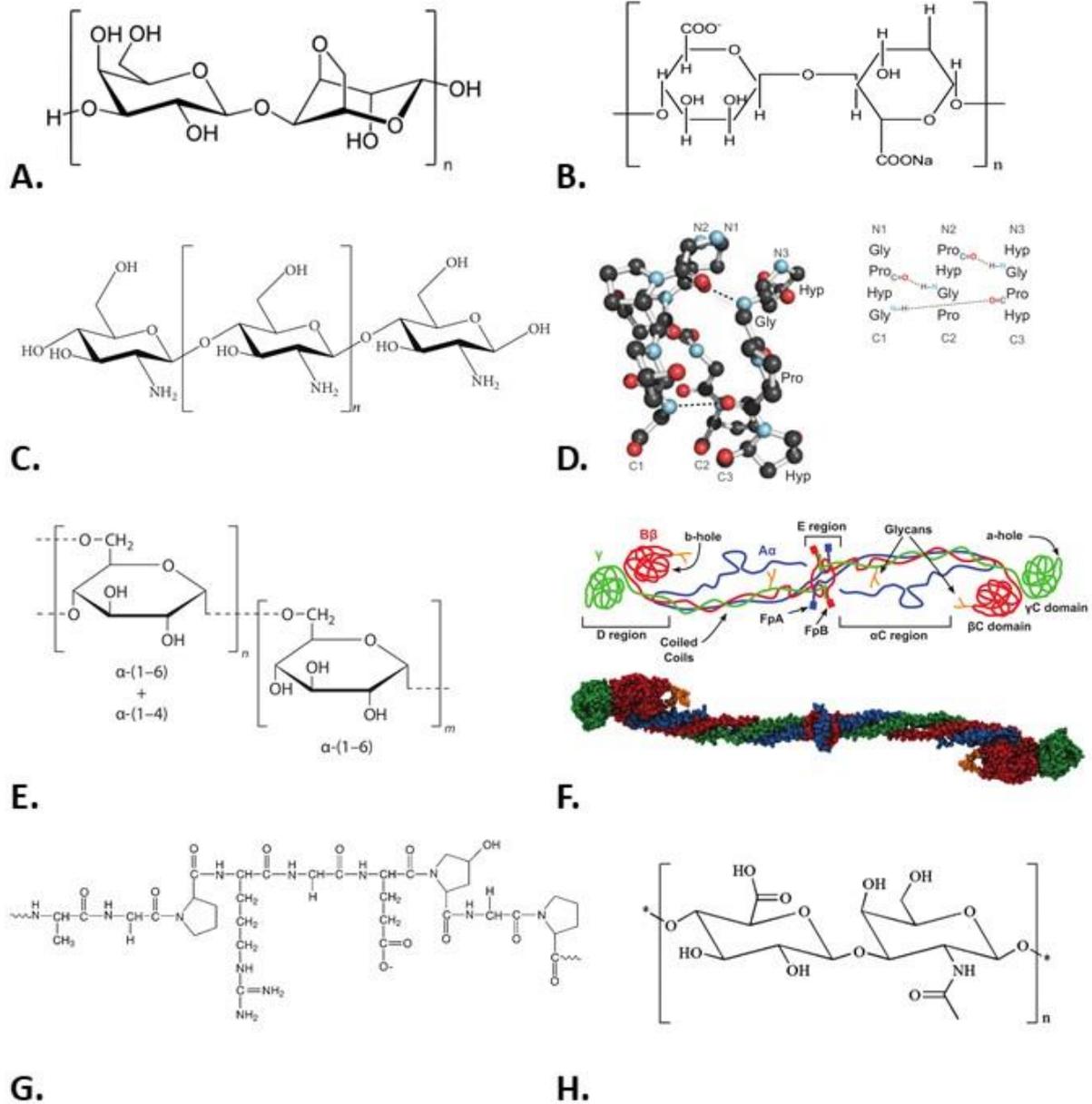
**Acide hyaluronique (HA).** L'acide hyaluronique est un polysaccharide de type glycosaminoglycane (succession d'unités N-acétyl-D-glucosamine liées par une succession de liaisons  $\beta$ -1,4 et  $\beta$ -1,3 glycosidique) et est un composant majeur de la MEC. L'HA possède une excellente biocompatibilité mais de faibles propriétés mécaniques. Pour l'utiliser en tant que bioencres, l'HA peut être modifié (ajouté de capacités de réticulation par photopolymérisation) ou mélangée à d'autres biomatériaux pour améliorer ses propriétés rhéologiques (**Figure 24 H.** et **Figure 25 H.**) (24,45,53).

Ainsi, la cytocompatibilité des hydrogels naturels est un atout non négligeable dans la création de structures imprimées et favorables au développement cellulaire. Cependant, cet avantage est rattrapé par les faibles propriétés mécaniques allouées aux molécules d'origine naturelle, ainsi que pour certaines d'entre elles leur faible cinétique de gélification rendant les processus de bioimpression délicats. Ces molécules doivent souvent être modifiées chimiquement ou utilisées en association pour outrepasser ces défauts. De plus, les molécules naturelles peuvent être sujettes à des problèmes de ressource, de pureté ou de variabilité entre différents lots de production (82–85).



**Figure 24: Illustrations de bioimpressions d'hydrogels naturels**

**(A)** filaments d'agarose bioimprimés dans des sphéroïdes tissulaires; **(B)** alginate imprimé en 3D en forme de cerveau avec des caractéristiques anatomiques précises; **(C)** échafaudage de chitosan après 4 semaines de culture; **(D)** construction de collagène de type I pour la régénération des tissus cutanés insérée dans une plaie; **(E)** fibrine bioimprimée dans des échafaudages tubulaires 3D; **(F)** gélatine bioimprimée par une technique laser avec un dépôt précis des cellules; **(G)** échafaudage en forme de «demi-cœur» imprimé en utilisant un mélange d'alginate/gélatine; **(H)** acide hyaluronique bioimprimé. Extrait de Hospodiuk et al. (45).



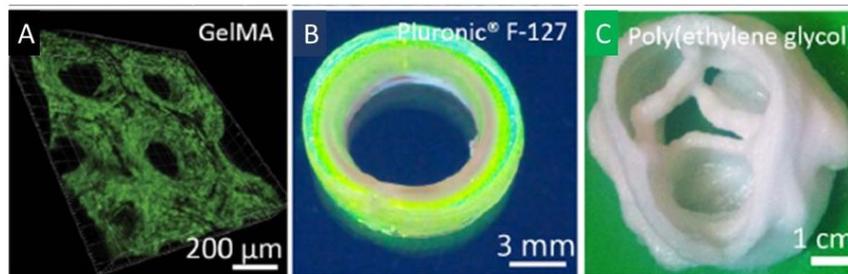
**Figure 25: Structure chimique ou protéique des hydrogels naturels rentrant dans la composition des encres de bioimpression**

**A.** Agarose, extrait de Lee et al. (86). **B.** Alginate, extrait de Homayouni et al. (87). **C.** Chitosan, extrait de Li et al. (88). **D.** Assemblage protéique de la triple hélice de collagène, extrait de Shoulders et al. (89). **E.** Dextran, extrait de Souza et al. (90). **F.** Structure cristallographique du fibrinogène formé de 3 chaînes protéiques, extrait de Köhler et al. (91). **G.** Gélatine, extrait de Kommareddy et al. (92). **H.** Acide Hyaluronique, extrait de Wang et al. (93).

### II.2.3 Hydrogels synthétiques

Les molécules synthétiques permettant la formation d'hydrogels ont l'avantage d'être modulables et personnalisables. Le contrôle de leur masse molaire ou des interactions à l'origine des mécanismes de réticulation permettent d'adapter les propriétés physiques spécifiques à ces hydrogels synthétiques. C'est pourquoi, ils possèdent plus souvent des propriétés mécaniques supérieures à celles des hydrogels naturels. Les constructions imprimées ont une plus grande robustesse et une meilleure stabilité. Leur cinétique de dégradation peut également être ajustée à l'environnement d'implantation considéré. Les propriétés chimiques et mécaniques des polymères synthétiques sont relativement constantes, permettant d'imprimer de façon plus reproductible des constructions par rapport à celles formées par des polymères naturels (82–85).

Plusieurs exemples de polymères synthétiques doués de capacités gélifiantes et régulièrement utilisés en bioimpression sont évoqués ci-dessous et illustrés par la **Figure 26**.



**Figure 26: Illustrations de bioimpressions d'hydrogels synthétiques**

*(A) image confocale 3D de cellules dans un échafaudage de GelMA; (B) tube fluorescent bioimprimé de Pluronic® F-127; (C) hydrogel de PEG soumis à une bioimpression dans la construction de valvule aortique. Extrait de Hospodiuk et al. (45).*

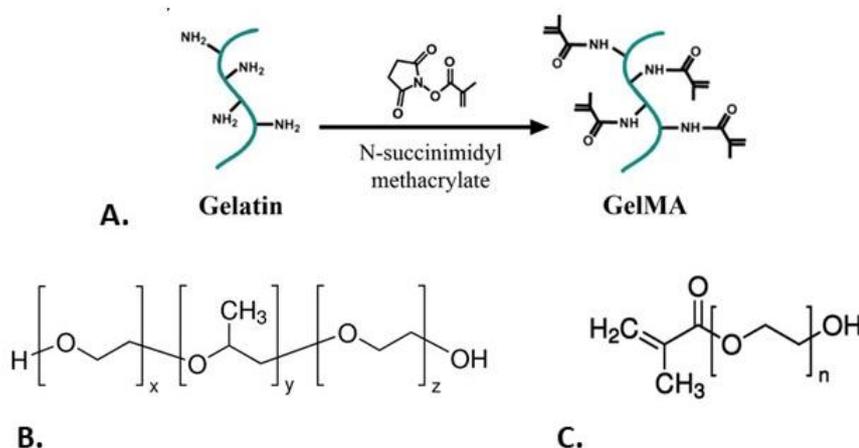
**Gélatine méthacrylée (GelMA).** La GelMa est une forme dénaturée du collagène, résultant de la conjugaison de groupements méthacrylates à des groupement amine du collagène. Cette conjugaison renforce les propriétés mécaniques de la gélatine qui devient alors beaucoup plus dure. Cependant, elle présente un faible taux de prolifération cellulaire et doit être mélangée à d'autres hydrogels pour favoriser la survie des cellules. La réticulation de la GelMa peut être obtenue par un processus de photopolymérisation (**Figure 26 A.** et **Figure 27 A.**) (45).

**Pluronic® F-127.** Il s'agit d'un nom commercial attribué à un polymère synthétique de type poloxamère. Le polymère est une répétition de motifs incorporant deux blocs hydrophiles et un bloc hydrophobe lui conférant des propriétés de type surfactant. Les différents gels Pluronic® varient en fonction de leur masse molaire, du pourcentage de leurs composants, de leurs fonctionnalités et de leur température de réticulation (de 10 à 40°C). C'est un hydrogel réversible donc la liquéfaction à une température de 4°C en fait un composant idéal dans la conception d'encres sacrificielles. Les gels de Pluronic® nécessitent cependant un équipement adapté car il est nécessaire de les chauffer avant de

les imprimer pour obtenir une réticulation. Le support d'impression doit également être chauffé pour maintenir la structure des constructions. Sa biocompatibilité et sa stabilité courte ne permettent pas de réaliser des cultures et des structures stables sur le long terme. Le Pluronic 127 est régulièrement combiné avec d'autres gels comme le PEG, la GelMA en bioimpression (**Figure 26 B.** et **Figure 27 B.**)(45,53).

**Polyéthylène glycol (PEG).** Le PEG est un polymère de type polyéther linéaire ou ramifié et hydrophile. Différentes longueurs de chaîne de PEG peuvent être produites et il est souvent retrouvé conjugué à des protéines, des enzymes, des liposomes et autres biomolécules pour diminuer leur absorption et leur conférer des propriétés furtives. Les hydrogels de PEG possèdent une force mécanique supérieure aux hydrogels naturels et ont été utilisés notamment en bioimpression par jet d'encre. Les PEG peuvent être couplés à des méthacrylates (PEG-MA) formant ainsi des gels photopolymérisables. Non cytotoxique à des masses molaires élevées et non immunogène, les PEG sont surtout bioinertes et l'adhésion de cellules n'est pas facilitée, nécessitant sa combinaison avec d'autres hydrogels biologiquement actifs (**Figure 26 C.** et **Figure 27 C.**)(45,53).

L'inconvénient majeur des hydrogels synthétiques est leur faible biocompatibilité. En effet, contrairement aux hydrogels naturels, les motifs de séquence peptidique fournissant des sites de liaison spécifiques manquent à l'attachement des cellules. Ils offrent peu ou pas de niches favorables au développement cellulaire. Les produits issus de la dégradation des hydrogels synthétiques sont plus difficilement éliminés de l'organisme et sont parfois source de réactions immunitaires non désirées. Ainsi, certains hydrogels synthétiques s'avèrent non biodégradables. De plus, leur biocompatibilité est souvent médiocre, les produits de dégradation non naturels et une perte de propriétés mécaniques lors de la dégradation (24,83–85,94).



**Figure 27: Structure chimique ou protéique des hydrogels synthétiques rentrant dans la composition des encres de bioimpression**

A. *Gélatine méthacrylée*, extrait de Lai et al. (95) B. *Poloxamer 407*, extrait de Kojarunchitti et al. (96). C. *Polyéthylène glycol méthacrylé*.

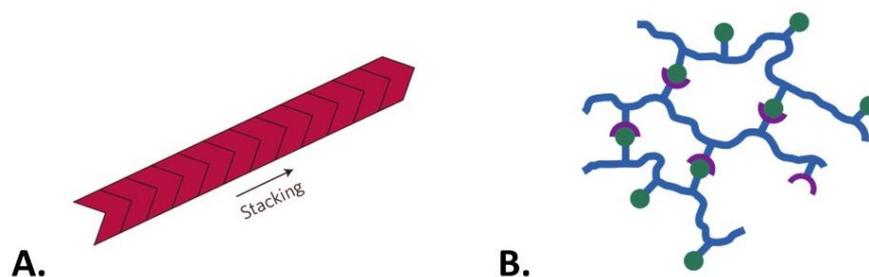
## II.2.4 Matrice extracellulaire décellularisée

Les échafaudages 3D naturels présentent des avantages en termes de composition moléculaire, d'architecture, d'activités physiologiques, de propriétés mécaniques et de biodégradabilité. Les **matrices extracellulaire décellularisée (MECd)** sont obtenues par extraction des composants cellulaires des tissus par des agents chimiques ou par des procédés physiques et mécaniques. Les MECd conservent les composants (protéoglycanes, chaînes de glycosaminoglycanes, facteurs de croissance) et la complexité de la MEC naturelle et sont utilisées comme bioencres pour mimer des environnements spécifiques de tissus variés (adipeux, cartilagineux cardiaque). La viabilité cellulaire est élevée et les interactions cellule-cellule au sein de MECd sont avantageuses, encourageant la prolifération et la différenciation des cellules. Le Matrigel® est un mélange gélatineux de MECd utilisée en ingénierie tissulaire pour favoriser les développements cellulaires complexes. Leur réticulation, dépendante de la température est lente mais réversible. D'un coût élevé, elles sont souvent couplées à l'alginate avant d'être bioimprimées (**Figure 24 I.**). Cependant, malgré quelques succès d'implantations, les MECd d'origine humaine ou animale présentent des problèmes d'immunogénicité et de sécurité (transmission possible de zoonoses et introduction de nouveaux agents pathogènes dans la population humaine). De plus, quelques soucis liés à la variabilité des sources et des lots produits sont à noter (24,45,53,94).

## II.3 Les hydrogels supramoléculaires dans la formulation de bioencres

### II.3.1 Les hydrogels supramoléculaires

La recherche de nouveaux matériaux s'est longtemps focalisée sur l'étude des polymères, naturels ou synthétiques, doués de propriétés telles que la biocompatibilité, une certaine rigidité, une durabilité ou une biodégradabilité pour n'en citer que quelques-unes. Cependant, d'autres matériaux « supramoléculaires » gagnent en intérêt, permettant de former des **gels supramoléculaires**. La formation de gels supramoléculaires est rendue possible par deux approches. La première est l'utilisation des capacités d'auto-assemblage de **molécules hydrogélatrices de bas poids moléculaire** (*Low molecular weight hydrogelators*, LMWG) (ex : petites molécules organiques, des oligosaccharides, des lipides, des acides nucléiques, des peptides). La seconde est la fonctionnalisation de précurseurs polymériques, par l'ajout de motifs de reconnaissance supramoléculaires spécifiques, qui vont renforcer les interactions entre les chaînes polymériques (ex : complexes de coordination, apport de liaisons hydrogène) (97,98) (**Figure 28**). Des revues très complètes mettent en avant la diversité des LMWG et des motifs de fonctionnalisation retrouvés dans la littérature (97–99).



**Figure 28: Illustration des deux approches permettant la formation de gels supramoléculaires**

Formation de gels supramoléculaires par A. auto-assemblage de petites sous-unités, ou B. par ajout de motifs de liaison (motifs verts et violets) renforçant les interactions entre des chaînes polymériques (en bleu). D'après Webber *et al.* (98).

Les LMWG sont retrouvés naturellement dans l'environnement. Des analogues synthétiques bioinspirés sont également développés pour mimer les propriétés de leurs analogues naturels et leur conférer de nouvelles fonctionnalités. Des molécules hybrides peuvent par exemple être formées par la combinaison d'unités biologiques : lipides, acides nucléiques, sucres. Outre la biocompatibilité découlant de leurs structures bioinspirées, ces matériaux supramoléculaires sont exploités pour leurs capacité de réponse à des stimuli environnementaux (physiques, chimiques, enzymatiques). Leur champ d'action touche de nombreuses applications biomédicales : médecine régénérative et ingénierie tissulaire, délivrance de médicaments ou d'acides nucléiques, imagerie et diagnostic (100).

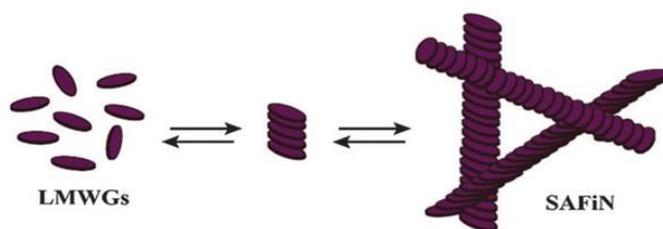
Les paragraphes ci-dessous s'intéresseront plus particulièrement aux LMWG. Ils décriront, dans un premier temps, les mécanismes impliqués dans les réactions de gélification de ces molécules afin de mettre en avant les différences fondamentales entre les gels « classiques » et les gels supramoléculaires. Seront évoqués plus précisément les mécanismes de gélification des LMWG issus de l'assemblage d'acides nucléiques, de lipides et de sucres. Dans un second temps, les molécules bioinspirées de type nucléolipides (NL) et glycoside nucléolipides (GNL), synthétisées par l'équipe ChemBioPharm seront développées afin de souligner le potentiel de ces molécules dans des applications de bioimpression. Enfin, quelques exemples utilisant des hydrogels supramoléculaires comme biomatériaux dans des applications de bioimpression seront détaillés.

### II.3.2 Mécanisme de gélification

Comparés aux hydrogels « classiques » précédemment décrits, les gels supramoléculaires formés par les LMWG sont principalement obtenus par des interactions physiques. Leur réseau fibreux est formé par l'association non covalente de divers éléments unitaires assimilés à des blocs de construction empilés les uns sur les autres (**Figure 29**)(97). Ces blocs de construction, constitués par les LMWG, sont définis arbitrairement comme ayant un poids moléculaire inférieur à 3000 Da. Durant le processus de gélification, les gels supramoléculaires subissent une phase d'auto-assemblage et de reconnaissance

moléculaire aux cours desquels un mécanisme de nucléation entre en jeu. La gélification se produit par un processus hiérarchique, par étape, dans lequel les blocs de construction moléculaires s'assemblent d'abord pour former un noyau unidimensionnel. Ces noyaux s'associent et grandissent pour former des agrégats et des fibres plus grandes, qui peuvent se regrouper et se ramifier. Enfin, l'enchevêtrement de ces fibres forme un réseau fibrillaire 3D autoassemblé (SAFiN : self-assembled fibrillar network) (**Figure 29**)(79).

D'autres mécanismes peuvent également être mis en jeu comme les ultrasons, le changement de pH, les réactions chimiques (hydrolyse, oxydoréduction) ou enzymatiques ainsi que les réactions photochimiques (97). Bien que la gélification puisse parfois se produire en mélangeant simplement le LMWG avec un solvant à température ambiante, le plus souvent, le chauffage de l'échantillon est nécessaire pour dissoudre le gélifiant. En refroidissant la gélification de la solution est observée (79).

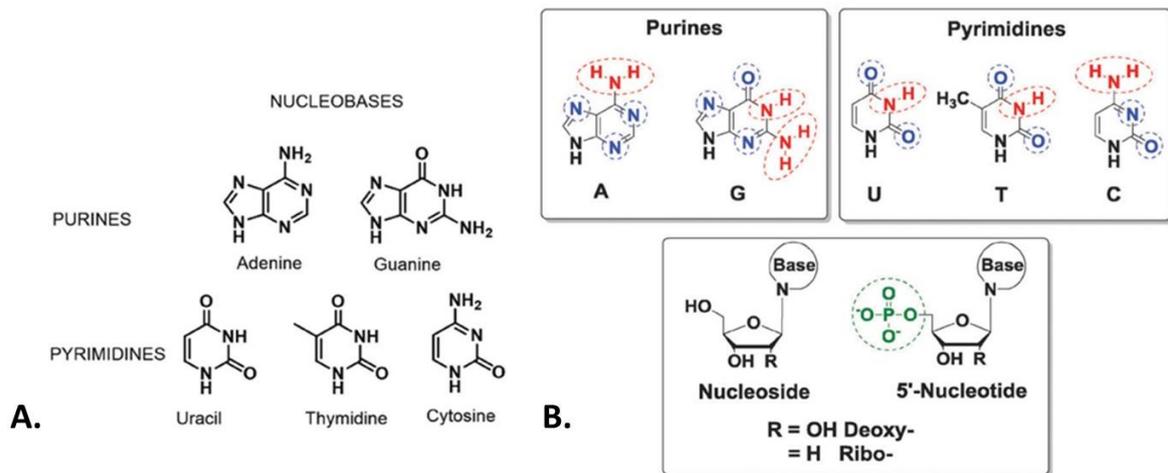


**Figure 29: Illustration de la formation d'hydrogels supramoléculaires**

*Assemblage de LMWG en un réseau fibrillaire autoassemblé (SAFiN : self-assembled fibrillar network). Extrait de Peters et al. (79).*

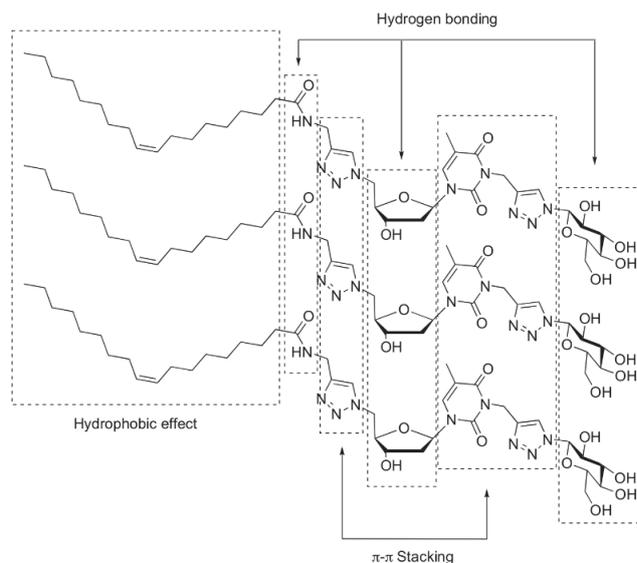
La majorité des LMWG sont dérivés de produits naturels (acides gras, sucres, cholestérol, acides aminés, peptides). Un certain nombre de gels supramoléculaires ont été développés en utilisant les capacités d'auto-assemblage et de reconnaissance des bases nucléiques, des nucléosides et des nucléotides. Les bases nucléiques sont des hétérocycles azotés qui appartiennent à deux catégories: les purines (adénine A et guanine G) et les pyrimidines (uracile U, thymine T et cytosine C) (**Figure 30 A.**) (79). Elles ont la capacité de former des liaisons hydrogène et des interactions  $\pi$ - $\pi$ , fondamentales pour contrôler la structure et la fonction d'assemblage de l'ADN et l'ARN. Les pyrimidines ne possèdent qu'une seule face composée de trois donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène, contrairement à la structure bicyclique des purines qui offrent plus de possibilités de liaison hydrogène (**Figure 30 B.Haut**). De plus, les cycles aromatiques des bases nucléiques peuvent également s'empiler par le biais d'interactions  $\pi$ - $\pi$ . La liaison covalente d'une base nucléique à un sucre de type ribose (liaison N-glycosidique) constitue un nucléoside. La phosphorylation supplémentaire du ribose forme alors un nucléotide qui est la base de la construction des polymères d'acide nucléique, de l'ADN et de l'ARN. Le phosphate anionique d'un nucléotide (vert) ajoute un potentiel supplémentaire d'interactions électrostatiques (**Figure 30 B.Bas**) (79).

Le couplage de lipides et de sucres à un nucléoside ou un nucléotide forme deux familles de LMWG : les NL et les GNL. Les molécules amphiphiles formées (groupement lipidique hydrophobe, tête nucléosidique ou nucléotidique et sucres hydrophiles) présentent des capacités d'autoassemblage. En effet, les unités biomoléculaires qui les composent mettent en jeu de nombreuses liaisons non covalentes : liaisons hydrogènes, interactions  $\pi$ - $\pi$ , interactions hydrophobes des chaînes lipidiques (**Figure 31**). Les assemblages moléculaires ainsi réalisés sont à l'origine de la formation des réseaux fibreux composant les gels supramoléculaires.



**Figure 30: Bases nucléiques et interactions non covalentes mises en œuvre**

**A.** Bases nucléiques : purines et pyrimidines. Adapté de Baillet et al. (100). **B.** Haut : donneurs de liaisons hydrogène (en rouge) et accepteurs (en bleu) des bases nucléiques. Bas : structure d'un nucléoside et d'un nucléotide. Le phosphate chargé (vert) peut s'engager dans des interactions électrostatiques. Adapté de Peters et al. (79).

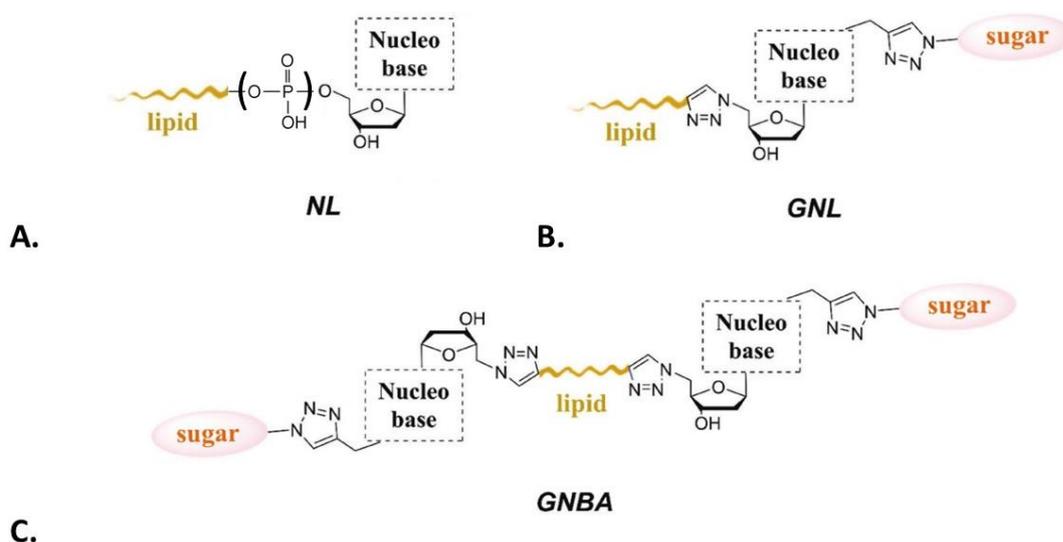


**Figure 31: Interactions non covalentes impliquées dans la formation des gels supramoléculaires**

Extrait de Latxague et al. (107).

### II.3.3 Gels supramoléculaires dérivés des bases nucléiques : utilisation potentielle dans la formulation des bioencres

L'équipe de ChemBioPharm du laboratoire ARNA s'est spécialisée dans le développement et la synthèse de LMWG et plus particulièrement les molécules composées de l'assemblage d'acides nucléiques, de chaînes lipidiques et ou de sucres présentant des capacités de gélification : NL, GNL, et Glycoside nucléolipides bola amphiphiles (GNBA). Les structures chimiques simplifiées de ces molécules sont illustrées dans la **Figure 32**. Leur utilisation diverse dans plusieurs applications seront détaillées dans les paragraphes ci-dessous.



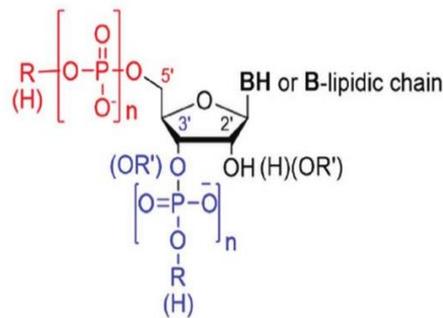
**Figure 32: Représentation schématique de la structure chimique des nucléolipides et des glycosides nucléolipides développés par l'équipe ChembioPharm**

**A.** Nucléolipide (NL) **B.** Glycoside nucléolipides (GNL) **C.** Glycoside nucléolipides bola amphiphiles (GNBA).

Adapté de Baillet et al. (100).

#### II.3.3.1 Les nucléolipides

Un NL est une molécule hybride associant une base nucléique, un nucléoside ou un nucléotide à un lipide (Figure 33). Les composés hybrides lipides-nucléosides ou nucléotidiques sont naturellement retrouvés chez les cellules eucaryotes et procaryotes. Un large éventail de molécules synthétiques ont été développées ces dernières années, faisant notamment appel aux propriétés d'auto-assemblage des nucléosides, nucléotides et lipides. Les NL peuvent être classés selon divers critères, notamment la charge, la position de la substitution (2' et 3', 5') (**Figure 33**), leur composition structurelle (nucléoside ou nucléotide) ou leur forme.



Nucleotide Lipid  $n=1, 2, 3$ , R or R' = lipidic chain or lipidic chain on B

Nucleoside Lipid  $n=0$  R or R' = lipidic chain or lipidic chain on B

**Figure 33: Structure générale d'un nucléolipide**

Les différentes substitutions possibles des nucléobases (H) et chaînes lipidiques (R) sur le ribose sont en position 2', 3' et 5'. Les nucléotides lipides possèdent un groupement phosphate, tandis que les nucléosides lipides sont seulement fonctionnalisés avec une chaîne lipidique. Extrait de Baillet et al. (100).

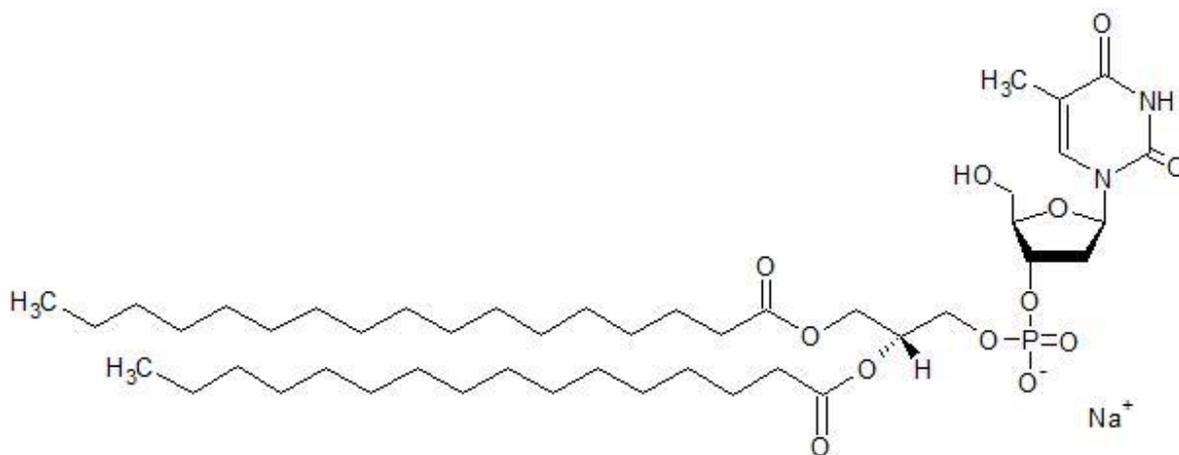
Les NL se distinguent également par la nature de la liaison liant le ribose au lipide : liaisons de type esters, amides, éther, amine, sulfuré par exemple. Afin de jouer sur la balance lipophile/hydrophile il est possible de coupler divers groupements hydrophiles sur le ribose (ex : oligo(ethylene glycol), plusieurs chaînes lipidiques de longueur et de saturation variable, ou bien des cholestérols.

Les propriétés amphiphiles des NL sont utilisés dans de nombreuses applications pour la délivrance de médicaments (ex : ruthénium et 5-Fluorouracile dans le traitement anticancéreux) de biomolécules (ex : oligomères simple brin d'ADN) ou l'incorporation à des nanotransporteurs (liposomes)(100).

La synthèse de molécules amphiphiles ayant la capacité de former spontanément par auto-assemblage des gels en milieu aqueux suscite l'intérêt de nombreuses équipes de recherche. Les propriétés de ces hydrogels à former des échafaudages favorables au développement cellulaire sont exploitées, mais également l'aptitude de ces hydrogels à pouvoir être injectés ou pouvoir former des réservoirs pour la délivrance *in vivo* de médicaments. C'est dans cet objectif qu'ont été synthétisés la diC<sub>16</sub>dT et ses dérivés qui seront pris comme exemple d'illustration des NL.

### La diC<sub>16</sub>dT

Ramin *et al.* (101) ont travaillé sur un NL contenant un groupe de tête de thymidine et un corps de 1,2-dipalmitoyl-sn-glycérol phosphate (Thymidine-3'-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate), diC<sub>16</sub>-3'-dT, ou diC<sub>16</sub>dT) (Figure 34) et s'intéressent notamment à l'influence des contre-ions couplés au phosphate négatif (lithium (Li<sup>+</sup>), du sodium (Na<sup>+</sup>), du potassium (K<sup>+</sup>), de l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et du triéthylammonium (Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>) sur les assemblages supramoléculaires de cette molécule amphiphile.

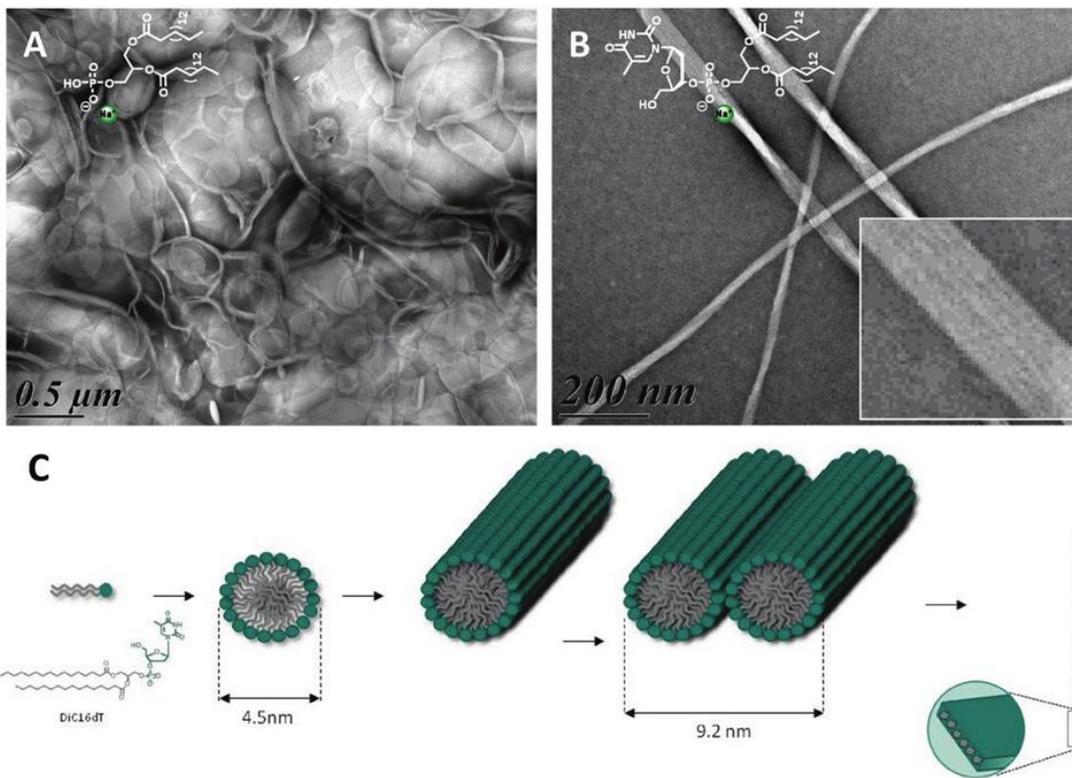


**Figure 34: Structure chimique de la diC<sub>16</sub>dT**

La Thymidine-3'-(1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate) diC<sub>16</sub>-3'-dT ou diC<sub>16</sub>dT, est ici représentée avec un contre-ion sodium (Na<sup>+</sup>).

La diC<sub>16</sub>dT en milieux aqueux forme des gels présentant sur le plan microscopique une structure fibreuse de type hélicoïdale. Cette structure fibreuse n'est seulement observée qu'en présence des contre-ions Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> (**Figure 35**). Couplés aux ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>, les gels formés présentent des arrangements lamellaires, indiquant que des cations plus gros affectent l'organisation supramoléculaire. Par conséquent, les capacités d'auto-assemblage dépendent non seulement de l'hydrophobie et de la structure amphiphile, mais présentent également une forte dépendance du type de contre-ion. Ramin *et al.* expliquent ainsi que l'organisation fibrillaire ou lamellaire serait respectivement la conséquence d'une forte répulsion électrostatique (contre-ions Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>) ou d'une grande affinité (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>) pour le nucléotide, ayant un impact sur l'hydrogélification de ce dernier.

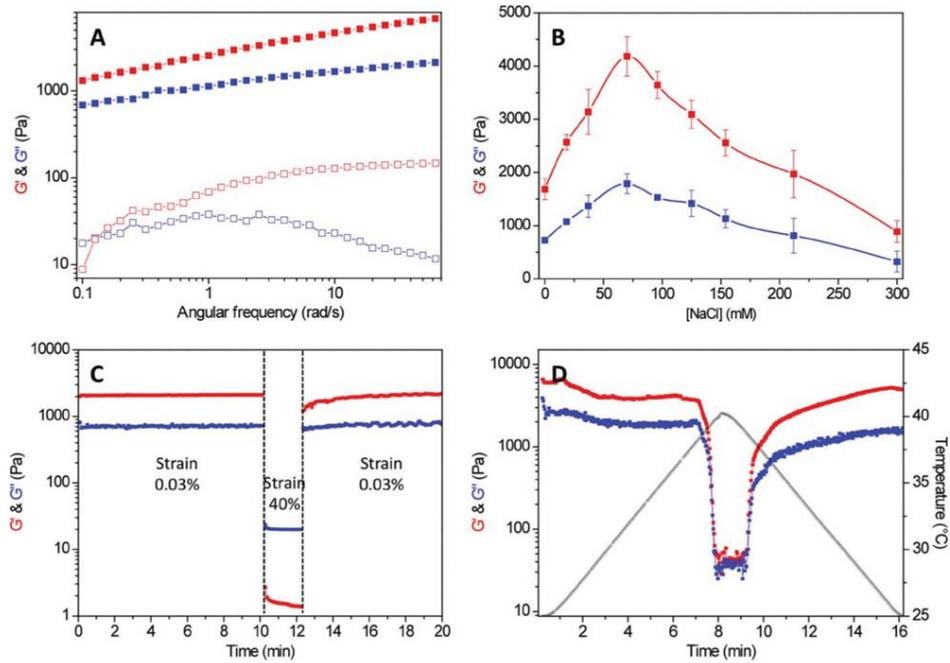
L'étude rhéologique d'un hydrogel à 3% de diC<sub>16</sub>dT/Na<sup>+</sup> montre des modules élastiques (G') de l'ordre de 2000 Pa et visqueux (G'') 900 Pa à une fréquence angulaire de 1rad/s et une température de transition sol/gel de 39°C (**Figure 36**). Le choix du contre-ion et sa concentration influent sur les propriétés rhéologiques (modules G' et G'' et température de transition sol-gel) mais ceux-ci restent globalement dans un même ordre de grandeur. Les gels de diC<sub>16</sub>dT/Na<sup>+</sup> présentent également des propriétés thixotropes qui sont ainsi favorables à un processus d'injection.



**Figure 35: Structure fibreuse des gels de diC<sub>16</sub>dT**

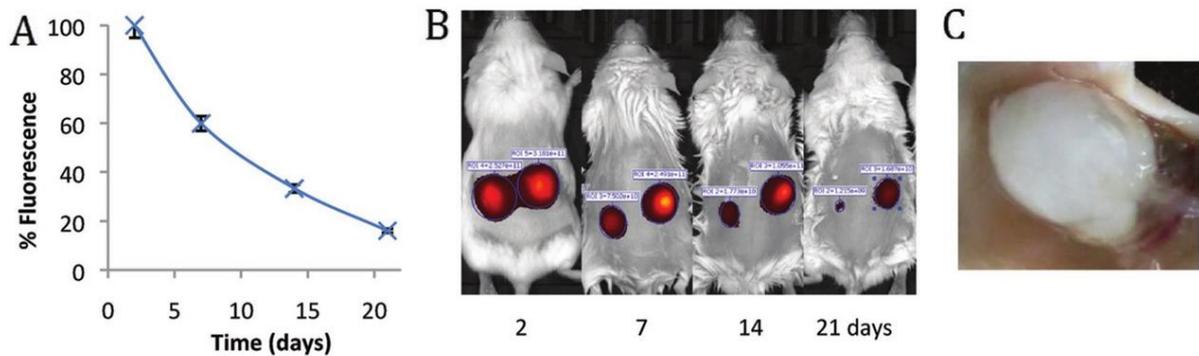
La structure fibreuse de la diC<sub>16</sub>dT observée en imagerie TEM (Photo B) est comparée aux structures formées par son homologue dépourvu de tête nucléosidique (Photo A) : le 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycérol-3-phosphate. Le gel de diC<sub>16</sub>dT est ici formé à 6% dans du NaCl 0,9%. Organisations supramoléculaires proposées pour la formation de fibres hélicoïdales (Illustration C). En présence de petits contre-ions (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>), la diC<sub>16</sub>dT s'auto-assemble pour donner des organisations de micelles qui interagissent pour former des rubans. Extrait de Ramin *et al.* (101).

Ramin *et al.* ont également réalisé des tests d'injection *in vivo* et suivi le devenir du gel dans le temps afin d'évaluer les propriétés réservoirs de ce gel pour la libération de molécules d'intérêt. Les gels préparés à une concentration de 6% et injectés ont présentés après 21j d'implantation une grosseur et une forme relativement préservée (**Figure 37**). Observés plus finement, les gels présentaient une couche fibreuse sur leur coque externe et un envahissement cellulaire en leur cœur avec une structure interne désagrégée. L'analyse histologique des tissus environnants n'a pas montré de réactions inflammatoires, démontrant le caractère biocompatible du gel de diC<sub>16</sub>dT. L'hydrogel a également montré des propriétés réservoir en libérant de façon continue une petite molécule test la cyanine (MW = 630 Da) (**Figure 37**) choisie comme modèle pour la libération d'une molécule anticancéreuse : la doxorubicine.



**Figure 36: Caractérisation rhéologique d'un gel de diC<sub>16</sub>dT 3% dans du NaCl 0,9%**

**A.** Résultats en balayage de fréquence pour le 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycérol-3-phosphate (carré vide) et la diC<sub>16</sub>dT à 3% dans du NaCl à 0,9%. **B.** Modules viscoélastiques par rapport à la concentration en NaCl. **C.** Retour rapide aux valeurs de modules initiaux après soumission dû à une contrainte importante. **D.** Le gel de diC<sub>16</sub>dT retrouve son état initial après avoir été soumis à des variations de température. Extrait de Ramin et al. (101).



**Figure 37: Injection *in vivo* d'un gel de diC<sub>16</sub>dT 6% formé dans du NaCl 0,9%.**

**A.** Décroissance de la fluorescence de la cyanine incorporée dans le gel en fonction du temps. **B.** Images de fluorescence enregistrées à 2, 7, 14 et 21 j après une injection sous-cutanée de l'hydrogel chargé en cyanine. **C.** Aspect macroscopique de l'hydrogel de diC<sub>16</sub>dT dans la biopsie cutanée immédiatement après un sacrifice à 21 jours. Extrait de Ramin et al. (101).

Au-delà des propriétés gélifiantes de la diC<sub>16</sub>dT, cette molécule amphiphile possède également la capacité à former des nanoparticules et notamment des nanoparticules lipidiques solides (SLN), utilisées comme système de délivrance de médicaments. Oumzil *et al.* (102) ont travaillé sur la formation de SLN à partir de diC<sub>16</sub>dT, en association ou non avec d'autres NL (DOTAU (N-[5'-(2',3'-dioleoyl)uridine]-N',N',N'- triméthylammonium) ou de DOU-PEG 5'-(O-Methyl-O'-succinyl

polyethylene glycol)-2',3'-dioleoyluridine) pour le traitement guidés par imagerie par IRM. Les SLN chargées en particules d'oxyde de fer et d'agents thérapeutiques ont montré une meilleure magnétisation que des agents de contraste habituellement utilisés. Benizri *et al.* (103) ont également exploité la formation de SLN par la diC<sub>16</sub>dT pour améliorer la solubilité du sorafenib, un petit inhibiteur de tyrosine kinases utilisé comme traitement anticancéreux. Les effets des SLN sur des lignées cellulaires cancéreuses ont été améliorées par rapport à la molécule seule. Plus récemment Kowouvi *et al.* (104) ont encapsulé du bleu de méthylène dans des SLN afin d'améliorer sa demi-vie et sa délivrance pour une utilisation dans le traitement du paludisme.

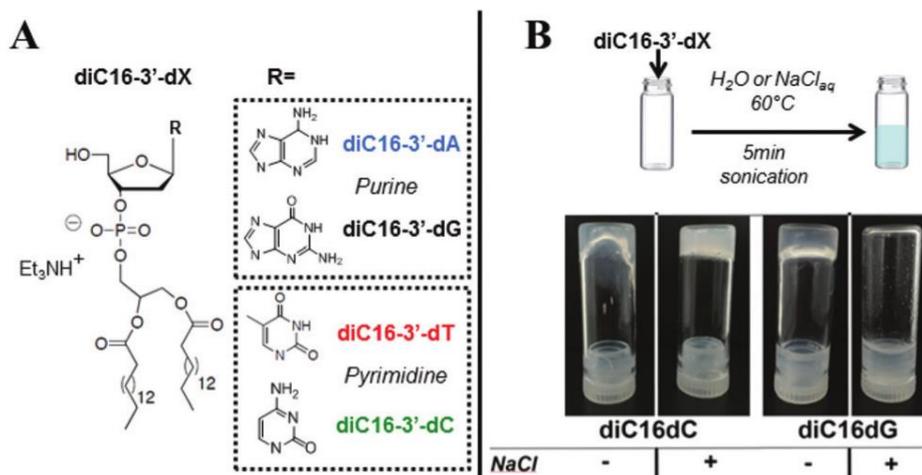
### **Analogues de la diC<sub>16</sub>dT : diC<sub>16</sub>dC, diC<sub>16</sub>dG**

Parmi les études consacrées à la diC<sub>16</sub>dT, Alies *et al.* (105) explorent les modulations possibles de la structure de la tête polaire, en particulier la nature de la base. En effet, le changement de la thymine (T) par une cytosine (C) ou une guanine (G) peut influencer les propriétés d'agrégation du NL (**Figure 38**). La formation de gels est testée en présence ou en absence de NaCl 0,9% (154mM). Ainsi, il est observé que la formation de la diC<sub>16</sub>dG ne peut se réaliser dans un milieu riche en NaCl, contrairement à la diC<sub>16</sub>dC, mais s'effectue en présence d'eau (**Figure 38**).

La présence ou non de NaCl influe sur les propriétés rhéologiques des gels. Par exemple, elle fait varier le point de rupture des gels lors d'un test de LVER (recherche du domaine linéaire de viscoélasticité), respectivement d'un G' de 600 Pa à un G' de 2400 Pa pour un gel de diC<sub>16</sub>dC formé avec de l'eau puis avec du NaCl 0,9%.

En fonction de la base nucléique, une différence est également observée concernant la taille des structures supramoléculaires. Dans le cas de la diC<sub>16</sub>dG constituée d'une base nucléique de type purine, des tailles plus élevées des assemblages supramoléculaires ont été observées comparé aux NL possédant des bases nucléiques de type pyrimidine : 200nm vs 100nm respectivement.

Alies *et al.* indiquent donc qu'outre l'effet hydrophobe des doubles chaînes lipidiques, les interactions  $\pi$ - $\pi$  et les liaisons hydrogènes entre nucléotides (dépendante de la base nucléique) jouent un rôle majeur dans la stabilisation des agrégats des NL. De plus, le contre-ion utilisé dans ces systèmes a un impact important sur les organisations supramoléculaires, en accord avec les travaux précédemment réalisées par Ramin *et al.* (101).

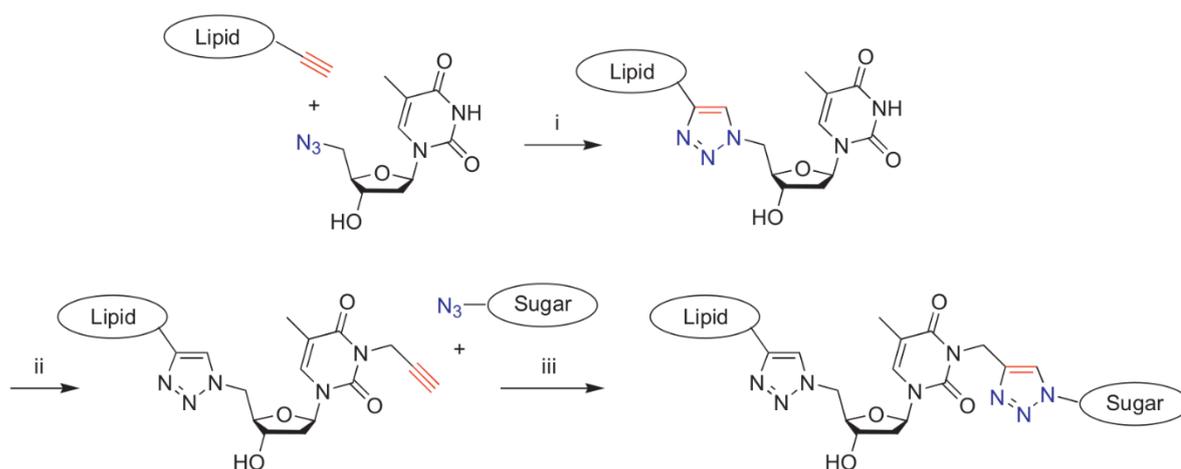


**Figure 38: Structures chimiques des dérivés de la diC<sub>16</sub>dT et tests de gélification**

**A.** Structure chimique du NL avec variation des bases nucléiques. **B.** Tests de gélification des NL diC<sub>16</sub>dC et diC<sub>16</sub>dG en présence ou en absence de NaCl. Extrait de Alies et al. (105).

### II.3.3.2 Les glycoside nucléolipides

De la même manière que pour les NL, les GNL sont des composés amphiphiles dont la structure découle de l'association d'un nucléoside, d'un lipide et d'un monosaccharide liés de façon covalentes par l'intermédiaire de ponts 1,2,3 triazole (**Figure 32**, page 68) (106). Ces trois biomolécules sont assemblées en une seule par une approche de réaction double-clic. Un exemple de réaction clic est la réaction de Huisgen : addition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre d'un azide et d'un alcyne terminal pour créer une liaison triazole (**Figure 39**) (107). Parmi les GNL, un dérivé fluoré, le GNF a fait l'objet de plusieurs études et ses applications seront détaillées dans les parties ci-après.



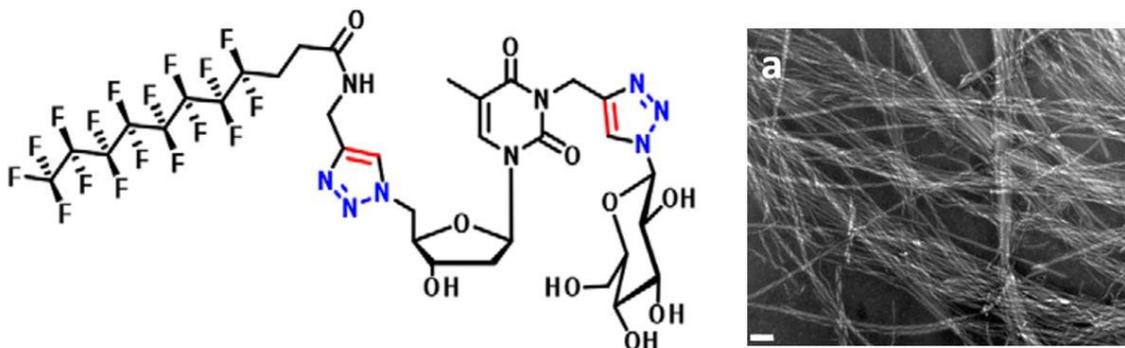
**Figure 39: Principe de synthèse des GNL par réaction double-clic**

Une première réaction clic (i) connecte un acide azide nucléique à un lipide acétylénique. Une seconde réaction clic (iii) connecte un sucre azide à une nucléobase propargylée. Extrait de Latxague et al. (107).

Les modifications apportées aux GNL ont conduit à créer la famille des Bola-amphiphiles. Par rapport aux GNL classiques, les Bola-amphiphiles comportent une seconde tête polaire (**Figure 32**, page 68). Des molécules possédant ce type d'architecture moléculaire peuvent être retrouvées naturellement dans les membranes des bactéries archées. Plusieurs dérivés ont déjà été utilisés dans diverses applications : synthèse de nanomatériaux, délivrance de médicaments ou de gènes. Tout comme les GNL, la synthèse des Bola est basée sur le principe des réaction double-clic. La famille des Bola a été développée pour former des gels capables de mimer la structure des matrices extracellulaires pour des applications en ingénierie tissulaire (108).

## GNF

Godeau *et al.* (109) rapportent la synthèse d'un nouveau composé fluoré parmi les GNL : le glycosyl-nucleosyl-fluorinated (GNF). Ce composé a été développé dans le but d'allier les propriétés d'autoassemblage et gélifiantes des GNL au caractère hautement hydrophobe des chaînes fluorocarbonées (**Figure 40**). Par rapport à leur dérivés hydrocarbonés, les chaînes fluorées (2H,2H,3H,3H-perfluoroundécaneoyl) confèrent une meilleure stabilité chimique et biologique et améliorent les propriétés d'assemblages supramoléculaires.



**Figure 40: Structure chimique du GNF et observation en imagerie TEM**

*A gauche, structure chimique du GNF (glycosyl-nucleosyl-fluorinated). A droite, observation en imagerie TEM de l'assemblage supramoléculaire d'un gel de GNF préparé dans de l'eau (Echelle : 100nm). Adapté de Godeau et al. (109).*

La capacité de gélification du GNF a été testée dans l'eau pure et dans du milieu de culture DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*). La concentration minimale de gélification s'est avérée très faible, à 0,1% (w/w) dans les deux milieux. Sur les images prise par microscopie TEM, des nanofibres de 10 à 20nm de diamètre ont été retrouvées, ainsi que des éléments compacts montrant des fibres hélicoïdales (**Figure 40**).

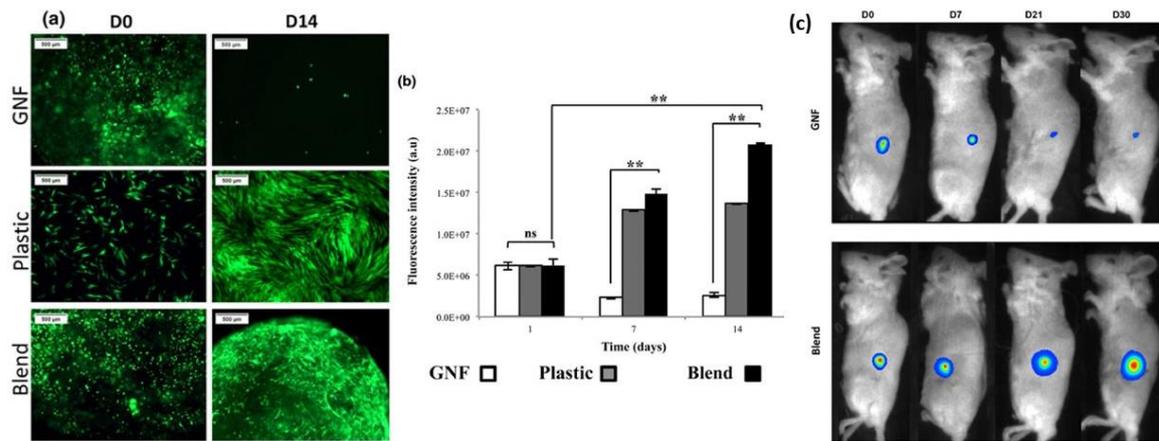
Un test de viabilité cellulaire opposant le GNF à son homologue GNL a montré que la survie cellulaire à 5 jours des cellules d'hépatocarcinome humain (Huh-7) s'est maintenue entre 80 et 170 % pour le GNF, tandis qu'elle a drastiquement chuté pour le GNL à partir de 200µM. Godeau *et al.* en concluent

une non toxicité du GNF aux concentrations testées, ce qui est favorable pour une utilisation des hydrogels de GNF comme milieux de culture cellulaire.

Ziane *et al.* (110) ont évalué les capacités du GNF en tant qu'échafaudage pour la croissance cellulaire et son potentiel d'implantation. Pour cela, ils ont utilisé un gel de GNF formulé dans du tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 1,5%. Chauffé à 65°C pour solubiliser le GNF, le mélange a présenté des capacités de gélification à 37°C lors de son refroidissement progressif. La caractérisation rhéologique réalisée démontre, selon Ziane *et al.*, des modules élastiques faibles du GNF avec un G' compris entre 500 et 1000Pa. Une culture cellulaire de GNF mélangés à des cellules adipocytaires (*Adipose tissue derived stem cells*, ASCs) a été réalisée et a démontré une viabilité et une croissance cellulaire limitée des ASCs. En effet, plus de la moitié des cellules ont disparu au bout de 14 jours après avoir été déposées sur le gel (culture 2D). L'incorporation directe des ASCs au sein du gel (culture 3D), entraînant une organisation des cellules sous forme d'agrégats sphéroïdes, n'a pas amélioré la survie cellulaire. Le gel de GNF a également pu être formé en seringue et être injecté. *In vivo*, le GNF s'est dégradé lentement, avec une diminution de 50% de son volume en 30j. Ces gels n'ont induit qu'une inflammation modérée des tissus environnants et ont été progressivement envahi par des cellules et des vaisseaux, suggérant ainsi une bonne implantation (110).

Maisani *et al.* (111) développent un gel hybride associant le GNF à 1,5% à du collagène à 0,2% (à noter que le GNF était formulé dans du milieu de culture DMEM). Sur le plan rhéologique, l'addition de collagène a permis de rigidifier le gel en doublant les valeurs du module élastique du GNF : passage de 1000 à 2000 Pa ; le collagène étant connu pour former des gels de très faible résistance (10 Pa). En culture cellulaire, par rapport à la culture sur un milieu GNF seul, le mélange hybride a permis d'améliorer l'adhésion et la prolifération de cellules souches humaines adipeuses (HASC) autant dans des conditions *in vitro* (croissance multipliée par 10) qu'*in vivo* (croissance multipliée par 15) où le gel était injecté (**Figure 41**). Une amélioration de la différenciation cellulaire a également été observée. Ainsi, ce gel composite améliore les propriétés mécaniques et biologiques par rapport aux gels obtenus à partir de chaque composé séparé.

Le GNF a également montré des capacités pour le transport d'acides nucléiques (112), des propriétés de décontamination de nanoparticules présentes dans milieux aqueux (113) ou d'interface biocompatible en électrochimie entre les tissus biologiques et électrodes (114).



**Figure 41: Culture cellulaire dans des hydrogels de GNF ou composites de GNF/collagène**

(a) et (b). Culture cellulaires de cellules souches adipeuses humaines (HASC) marquées dans un hydrogel de GNF, une boîte de culture en polystyrène ou dans un mélange hybride GNF/collagène. L'observation microscopique sur 14j (échelle  $a = 500 \mu\text{m}$ ) et la quantification de la fluorescence (b, unités arbitraires) montrent l'effet synergique de l'hydrogel composite sur la croissance cellulaire. (c) Imagerie in vivo d'HASC marquées (suivi de luminescence) et incluses dans des gels de GNF ou hybride GNF/collagène hybrides et injectées par voie sous-cutanée à des souris. La luminescence des cellules incluses dans le mélange hybride après 30j est 15 fois supérieure à celle observée pour les cellules incluses seulement dans le GNF. Extrait de Maisani et al. (111).

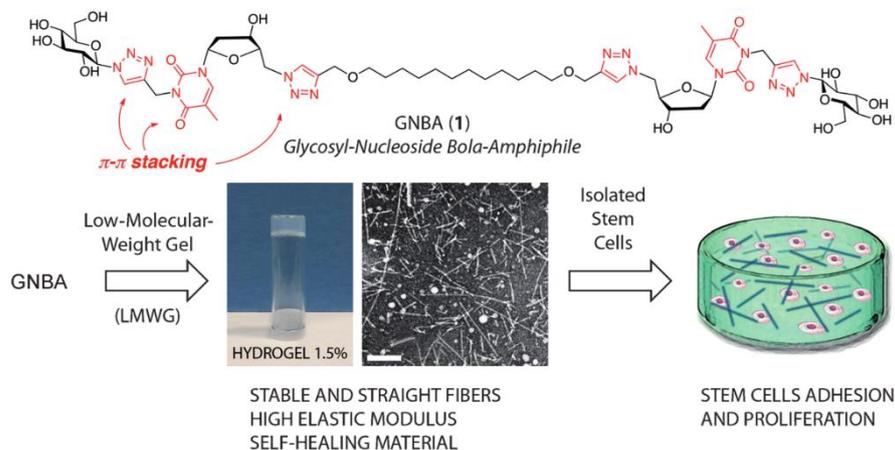
### Les Bola : GNBA, GNBA-BU, GNBA-BE

Le concept des Bola-amphiphiles, ou GNBA (glycoside nucléolipides bola amphiphiles) a été lancé par Latxague *et al.* (108) dans le but de former des hydrogels possédant une structure et des propriétés mécaniques favorables à la croissance de cellules souches et applicable à des techniques d'ingénierie tissulaire.

Le premier Bola développé, possède des têtes polaires de type N-thymine glycosylées, liées à un groupement lipidique par des fonctions triazole et une liaison éther (GNBA-BE) (Figure 42). Un hydrogel a été formé avec cette molécule à une concentration 1% (w/v). L'imagerie TEM obtenue montre la formation d'un réseau fibrillaire fortement interconnecté par des fibres droites de 6 à 9 nm de large. Comparé aux gels de GNF de même concentration, le gel de GNBA-BE possède des modules élastiques très élevés :  $G' = 30325 \text{ Pa}$  vs  $G' = 1749 \text{ Pa}$  respectivement. La rigidité des assemblages supramoléculaires est imputée aux interactions  $\pi$ - $\pi$  des groupements 1,2,3-triazole et du nucléoside (Figure 42).

Le GNBA-BE est doué de capacités d'extrusion et reprend sa forme rapidement après injection, démontrant des propriétés thixotropes. Les tests de toxicité cellulaires réalisés sur des cellules souches mésenchymateuses ne démontrent pas de toxicité lors de l'augmentation croissante en GNBA (jusqu'à  $200 \mu\text{M}$ ). Le mélange de fibroblastes à du GNBA 3% montre une bonne viabilité cellulaire après une

semaine d'étude, comparée aux mêmes conditions dans le GN. La croissance plus favorable des hydrogels de GNBA au développement des cellules est, selon Latxague *et al.*, attribuée à une meilleure organisation 3D de l'échafaudage.

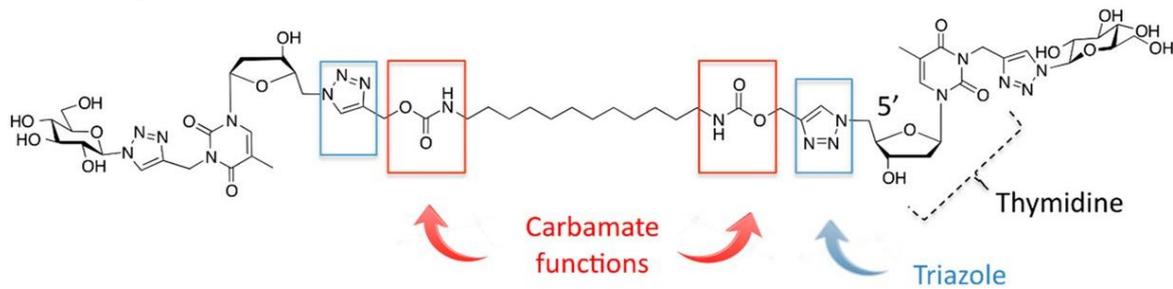


**Figure 42: Etude du GNBA-BE comme milieu de culture de cellules souches**

Structure chimique du GNBA-BE. Formation d'hydrogel par auto-assemblage grâce aux interactions  $\pi$ - $\pi$  de la molécule et création de fibres stables et droites (barre d'échelle: 200 nm). Les hydrogels présentent des propriétés de rigidité permettant l'adhésion et la prolifération de cellules souches. Extrait de Latxague *et al.* (108).

Latxague *et al.* (115) ont voulu moduler les propriétés d'assemblage en augmentant le nombre de liaisons hydrogènes. Ainsi, d'autres dérivés Bola ont été synthétisés en changeant les fonctions de la chaîne hydrophobe. En remplaçant la fonction éther, attachée en position 5' de la thymidine, par une fonction carbamate (**Figure 43**).

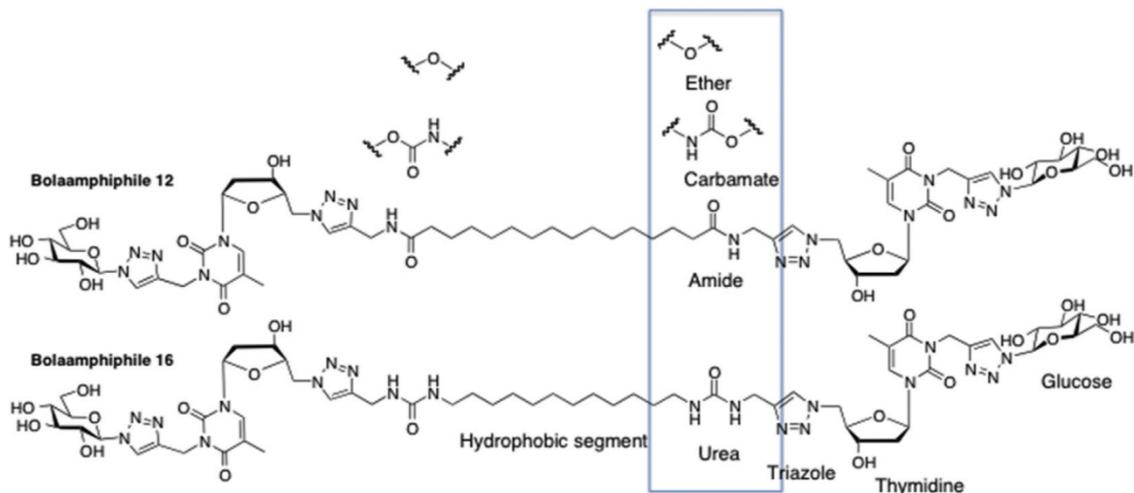
Malheureusement, les propriétés obtenues limitent son application *in vivo*. En effet, le Bola-Carbamate ne se forme pas spontanément à température ambiante après une étape de solubilisation par chauffage. Il nécessite une étape de passage à froid pendant au moins une journée avant de former un gel homogène. Les hydrogels formés à 4% présentent des modules viscoélastiques très élevés ( $G' = 57$  kPa ;  $G' = 30$  kPa pour le GNBA-BE à 4%) et présentent des propriétés thixotropes avec un retour dans aux modules d'origine 30min après l'application d'un stress. Sa température sol-gel de 36°C limite ainsi ses applications *in vivo*.



**Figure 43: Structure du GNBA Carbamate**

Extrait de Latxague et al. (115).

Par la suite, les dérivés bis-urée (GNBA-BU) et bis-amide (GNBA-BA) ont également été synthétisés (**Figure 44**) (116). Le changement du groupement a pour objectif de modifier les liaisons possibles au sein du Bola, notamment les liaisons hydrogènes et par conséquent de moduler la stabilité, les propriétés rhéologiques et biologiques des hydrogels.



**Figure 44: Structure chimique des Bola bis-urée et bis-amide**

Extrait de Ramin et al. (116).

Sur le plan rhéologique, comparé au GNBA-BE, les dérivés bis-urée et bis-amide présentent une cinétique de gélification plus rapide, une concentration critique de gélification plus faible (GNBA-BU= 0,14%, GNBA-BA= 0,1%, GNBA-BE= 0,51%), des modules élastiques plus importants (jusqu'à deux fois pour le GNBA-BU) et une température sol-gel plus élevée (GNBA-BU= 78.8°C, GNBA-BA= 58.5°C, GNBA-BE= 43°C). L'observation des fibres formées dans les hydrogels montrent des réseaux réticulés denses avec des fibres de 6 à 8 nm de diamètre.

Parmi ces deux nouveaux dérivés, seul le GNBA-BU a présenté un profil thixotrope. Le GNBA-BU est également plus stable *in vivo* que le GNBA-BA. Après 21j d'implantation, le volume des gels de GNBA-BU injecté avait diminué de 50%, tout en conservant une forme ronde contrairement aux gels de

GNBA-BA qui avaient été éliminés. L'analyse histologique a démontré une bonne implantation des gels de GNBA-BU avec une inflammation minimale des tissus environnants.

Contrairement à certains LMWG dont plusieurs exemples seront détaillés ci-après, le potentiel des NL, GNL et GNBA n'ont pour le moment jamais été exploités dans le domaine de la bioimpression. Cependant, plusieurs propriétés recherchées en bioimpression viennent d'être illustrées dans les paragraphes précédents, à savoir : formation de matrices favorables à la culture cellulaire, cytocompatibilité, biocompatibilité, biodégradation et notamment des propriétés mécaniques permettant leur injection. C'est pourquoi, l'utilisation de ces molécules pour la formulation de bioencres d'impression présente un intérêt.

#### II.3.4 Les hydrogels supramoléculaires utilisés dans la formulation des bioencres

De nombreuses bioencres sont développées chaque année dans le domaine de la bioimpression. A ce jour, peu d'entre elles intègrent des hydrogels supramoléculaires dans leur formulation. Cependant, ces hydrogels sont de plus en plus étudiés dans cette application et plusieurs revues les mettent en lumière (117–120). Pour Chimene *et al.* (118) les hydrogels supramoléculaires peuvent répondre aux problèmes d'intégrité mécanique et de rupture des liaisons que subissent les hydrogels durant le processus d'impression. Mann *et al.* (119) relèvent également que l'approche supramoléculaire pourrait remplacer les agents de réticulation indispensables pour la gélification de certains hydrogels (alginate, HA). Loo *et al.* (117) quant à eux affirment que les peptides auto-assemblant sont d'excellents candidats pour la formulation de bioencres car les hydrogels nanofibreux qu'ils forment ressemblent aux MEC natives et fournissent un microenvironnement adapté pour la survie des cellules souches et des cellules primaires différenciées.

Parmi les hydrogels supramoléculaires développés dans des applications de bioimpression, ce sont majoritairement les approches visant à fonctionnaliser des hydrogels naturels ou synthétiques qui sont étudiés.

Par exemple, Li *et al.* (121) ont développés une bioencre supramoléculaire formée à l'aide de l'association d'un polypeptide et d'ADN. Leur stratégie a consisté en un dépôt alternatif de deux encres, l'une contenant le conjugué polypeptide-ADN et des cellules, l'autre contenant un liant de l'ADN. L'hybridation entre les molécules d'ADN a conduit à une réticulation rapide et une gélification quasi-instantanée. La rigidité des polymères d'ADN a permis d'imprimer des structures très précises, avec une cytocompatibilité élevée. L'avantage de ces constructions est notamment la possibilité d'entraîner de façon contrôlée leur dégradation à l'aide de protéases ou de nucléases.

De leur côté, Schacht *et al.* (122) ont utilisés des protéines de soie d'araignée couplées à des motifs RGD (tripeptide Arginine/Glycine/Aspartate) comme matériaux pour la réalisation d'une bioencre. Les matériaux en soie d'araignée présentent un intérêt pour un usage biomédical car ils forment des hydrogels à 37°C, montrent une absence de toxicité, une dégradation lente, une immunogénicité faible, une large distribution de la taille des pores et des propriétés viscoélastiques. Les motifs RGD sont eux utilisés afin d'imiter les protéines d'adhésion cellulaires et ainsi offrir des récepteurs aux protéines de surface des cellules. Comparés aux hydrogels formés uniquement à partir de protéines de soie, les hydrogels de protéine de soie couplés à des motifs RGD ont créés un microenvironnement bien plus favorable à l'adhésion de plusieurs types cellulaires avec une viabilité augmentée d'une valeur de 10% en moyenne, à des valeurs comprises entre 60 et 100% de viabilité après 7 jours de culture.

Les stratégies visant à concevoir de nouvelles bioencres à partir hydrogels supramoléculaires formés par autoassemblage de LMWG sont minoritaires. Cependant, quelques travaux intéressants peuvent être évoqués.

Par exemple, Nolan *et al.* (123) ont réalisés des encres de biomatériaux pour une impression par extrusion. Les LMWG utilisés étaient deux dipeptides dérivés de la diphénylalanine. Nolan *et al.* se sont intéressés tout particulièrement aux mécanismes impliqués dans la formation de ces hydrogels en comparant deux méthodes : déclenchement de la gélification par addition d'un solvant (DMSO) ou par changement de pH (acidification). Selon la méthode utilisée, les microstructures des réseaux fibreux observés étaient différentes. Ce facteur est important car il peut influencer le comportement cellulaire, ainsi que leur attachement et leur développement. Cette différence jouait également sur les capacités d'impression des hydrogels. En effet, la qualité des impressions des hydrogels formés à l'aide d'un solvant surpassait celle des hydrogels obtenus par acidification. Cette étude préliminaire n'intégrait cependant pas le devenir de cellules au sein des hydrogels formés.

Enfin, Liu *et al.* (124) se sont intéressés à la formation d'hydrogels supramoléculaires par auto-assemblage de molécules d'acide folique. La réticulation des nanofibres était obtenue par l'assemblage de tétramères d'acide folique, liés entre eux par des liaisons hydrogènes et des interactions  $\pi$ - $\pi$ . Des ions  $Zn^{2+}$  venaient compléter l'assemblage des fibres entre elles pour renforcer le réseau. Cet assemblage supramoléculaire a permis de former des hydrogels robustes ( $G' = 1000$  Pa) à des concentrations inférieures à 1% ; présentant des propriétés rhéofluidifiantes et d'auto-réassemblage (*self-healing*) instantanée. Ces hydrogels ont permis la formulation de bioencre, supportant l'addition de cellules, la formation en seringue et ce avec une bonne qualité d'impression.

Ainsi, l'utilisation d'approches supramoléculaires pour la conception de bioencres peut s'avérer être une alternative à l'utilisation de polymères naturels ou synthétiques classiques, permettant de combler certains de leurs défauts.

## II.4 Cellules et cellules souches incorporées aux bioencres

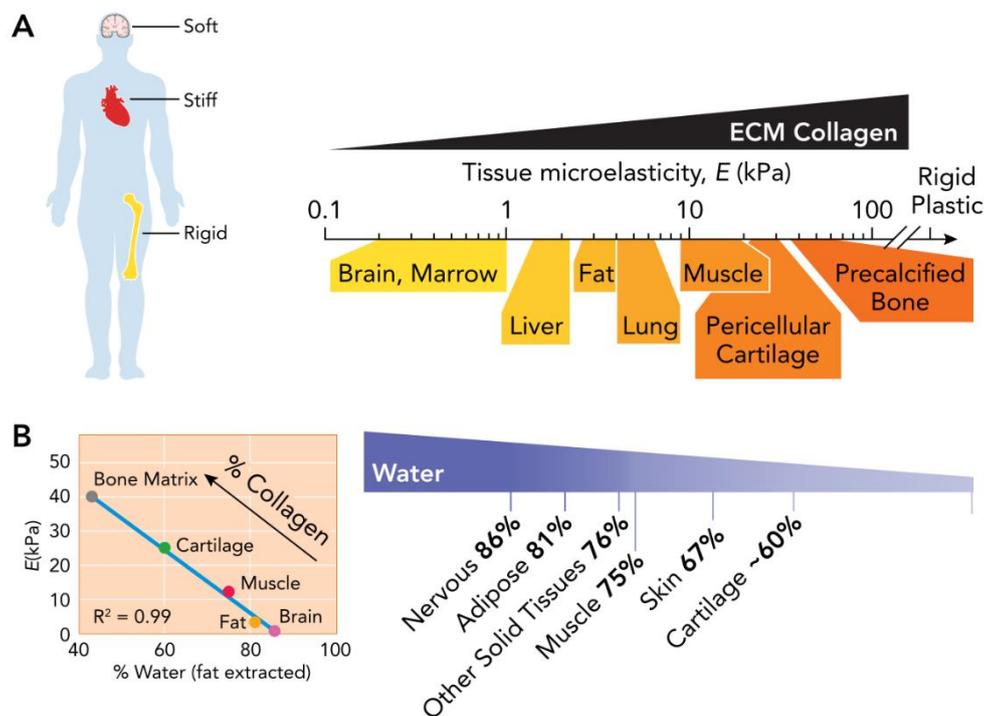
La définition actuelle des bioencres souligne désormais la présence des cellules ajoutées au sein même de l'encre avant bioimpression. Cette approche s'oppose à l'impression d'un échafaudage sur lequel serait ensuite déposées les cellules. Le mélange de cellules au sein d'une matrice est un mécanisme dit d'**encapsulation cellulaire**. Les cellules sont ainsi confinées et protégées dans un environnement tridimensionnel, favorable à leur attachement et leur développement, dont la porosité doit permettre l'apport de nutriments, d'oxygène, et leur migration (125).

De très **nombreux types cellulaires** ont été bioimprimés avec succès, notamment des cellules cardiaques (126), neuronales (127), osseuses (128), musculaires (129) ou cellules cancéreuses (130). Certaines cellules ayant des capacités de prolifération limitées, la population de cellules couramment utilisée dans la bioimpression 3D est constituée de cellules progénitrices ou de **cellules souches**. Les cellules souches sont caractérisées par leur plasticité, c'est-à-dire leur capacité à se différencier en précurseurs de diverses lignées cellulaires. Parmi les trois principales sources de cellules souches les plus souvent utilisées en bioimpression il est possible de citer les cellules souches embryonnaires (*embryonic stem cells*, ESC), les CSM et les iPSCs. Chacune présente des avantages et des inconvénients. Les ESC présentent la plasticité la plus élevée, mais leur obtention peut s'avérer complexe et leur utilisation pose notamment des problèmes éthiques et d'immunogénicité. Les CSM sont plus faciles à obtenir mais n'ont pas les mêmes capacités de différenciation que les ESC. Elles peuvent notamment se différencier en chondrocytes, ostéoblaste et myoblastes. Les iPSCs ont une plasticité accrue, mais certaines études démontrent un accroissement de cas de tumorigénèse post-implantation (3,30).

A chaque type cellulaire correspond un besoin spécifique en termes de nutriments, d'oxygène, d'apport de biomolécules, de porosité et de dureté du milieu environnant. Les échafaudages doivent ainsi reproduire de façon fidèle les conditions physiologiques *in vivo*. En fonction du choix du biomatériau principal de l'encre, il sera possible d'orienter un développement cellulaire vers la formation d'un tissu plutôt qu'un autre. Par exemple, l'étude de Daly *et al.* (131) compare l'utilisation de quatre bioencres différentes pour la bioimpression de CSM. L'utilisation de bioencres d'alginate ou d'agarose a conduit les CSM vers la formation d'un tissu hyalin, plus typique d'un cartilage articulaire avec la présence de chondrocytes produisant majoritairement du collagène de type II. De leur côté, les bioencres de PEG-MA et de GelMA ont favorisé le développement d'un tissu fibrocartilagineux, typique

des ménisques, avec la présence de fibro-chondrocytes produisant du collagène de type I et II. Cette différence est notamment expliquée par les **propriétés mécaniques et rhéologiques des bioencres**.

En effet, le devenir des cellules souches encapsulées, notamment leur différenciation sont régies par les propriétés mécaniques des matrices dans lesquelles elles sont incorporées. La porosité, la densité, l'élasticité sont autant de facteurs influençant le destin des cellules souches. Par exemple, les échafaudages mous et élastiques (0.1-5 kPa) favorisent la différenciation vers les tissus neuronaux et adipeux, tandis que les échafaudages fermes et rigides (10-100 kPa) favorisent la différenciation vers les tissus musculaires, cartilagineux et osseux (**Figure 45**). Le choix du type de biomatériaux à utiliser et sa concentration influenceront sur l'élasticité de l'échafaudage à imprimer. La différenciation des cellules souches dépendra également des interactions que pourront générer les cellules avec les échafaudages pour leur adhésion (liens entre les intégrines des cellules et le collagène de la MEC dans les tissus natifs). Les contraintes *in vivo* doivent ainsi être considérées afin d'être au mieux reproduites pour favoriser la différenciation des cellules souches vers la lignée voulue (30,132,133).



**Figure 45: Propriétés mécaniques de différents tissus du corps humain**

**A.** Variation de l'élasticité ( $E$ , exprimée en kPa) des tissus du corps humains en fonction des organes. La rigidité mesurée est corrélée à la concentration en collagène des tissus. **B. (gauche et droite)** estimation du niveau d'hydratation de plusieurs tissus du corps humains. L'état d'hydratation des tissus est inversement proportionnel à l'élasticité des tissus et à la teneur en collagène. Extrait de Smith et al. (132).

La bioimpression de certains tissus peut nécessiter de bioimprimer plusieurs types cellulaires pour reproduire au mieux la composition des tissus. Ce type de bioimpression nécessite l'utilisation de milieux satisfaisant aux exigences des différents types cellulaires, ou la mise en œuvre de techniques d'impression spécifiques (ex : co-impression de plusieurs types d'encre simultanément contenant chacune un type cellulaire) (24).

Le succès de la bioimpression d'un tissu sera, en amont, dépendante des influences mutuelles entre la technique de bioimpression et les cellules. En effet, il a été démontré que la viabilité des cellules était dépendant des paramètres d'impression; des changements au sein d'une même technique pouvant conduire à une mort importante des cellules. A l'inverse, une formation rapide d'un tissu en augmentant le taux cellulaire initial dans la bioencre est attendue. Le nombre de cellules requises lors d'un processus de bioimpression dépend principalement de la technique utilisée. La majorité des concentrations cellulaires utilisées se situe entre  $10^6$  et  $10^8$  cellules/ml de bioencre. Ce nombre important de cellules requises s'avère nécessaire afin de synthétiser la MEC requise pour la fonctionnalisation de la construction bioimprimée (134). Cependant, la présence de cellules affecte significativement les propriétés rhéologiques des bioencres et leur capacité d'impression (55,135).

## II.5 Nano et micro-objets utilisés en bioimpression 3D

### **Intégration des nanotechnologies en ingénierie tissulaire et en bioimpression 3D**

Le terme générique de nanotechnologies, regroupe l'ensemble des études, des techniques, des analyses, de la fabrication, de l'utilisation de matériaux ou de systèmes à l'échelle nanométrique. Il est courant de ne restreindre cette échelle qu'aux objets de taille comprise entre 1 et 100nm (136), notamment en se focalisant, par exemple, sur certaines nanoparticules (métalliques, magnétiques, de céramique). Cependant, dans le cas plus précis des objets ou fibres de nature polymérique ou lipidique, cette échelle s'élargit pour comprendre les objets de taille plus importante, compris entre 10-1000 nm (137).

Les nanotechnologies sont utilisées dans de nombreuses applications biomédicales, notamment grâce à la formulation de nanomédecines pour la délivrance de médicaments (138), de gènes (139), pour l'imagerie diagnostique (140), pour le théranostique (141), l'utilisation de biosenseurs (*biosensors*) (142), dans des approches d'hyperthermie magnétique (143), pour la thérapie photothermique (144) ou bien encore le revêtement d'implants (145).

Plusieurs limites et défis peuvent être alloués aux techniques de médecine régénérative et d'ingénierie tissulaire actuelles : manque de matériaux adaptés, croissance cellulaire insuffisante, faiblesse du contrôle des fonctions biologiques des cellules, retranscription des architectures physiologiques limitée, efficacité modérée de facteurs de croissance au sein des échafaudage. Les

surpasser nécessite une approche à l'échelle nanométrique plutôt qu'une analyse macroscopique. Les nanoobjets offrent certains avantages. De petite taille, ils ont un grand rapport surface/volume, sont très mobile et ont une diffusion ainsi qu'une absorption facilitée à travers les membranes. Ils permettent d'améliorer la solubilité, la demi-vie ou le ciblage de molécules bioactives (facteurs de croissance, cytokines, inhibiteurs, gènes, médicaments). C'est pourquoi les nanotechnologies ont été progressivement intégrées dans de nombreux process d'ingénierie tissulaire (136,137,146–149).

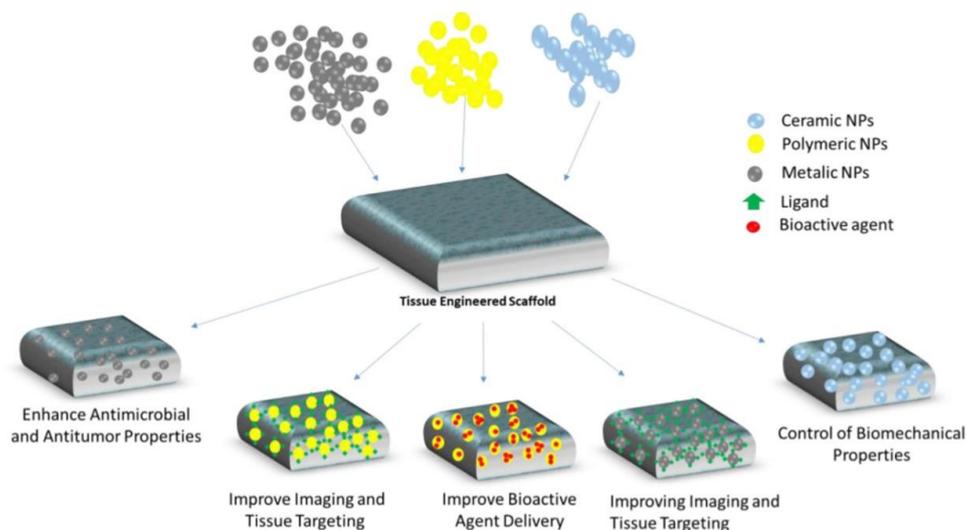
Les nanoobjets utilisés en ingénierie tissulaire sont de composition très variée, et il est possible de les classer, de façon non exhaustive, comme suit :

- Nanoparticules métalliques : AuNP, AgNP
- Nanoparticules magnétiques :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Co- $\text{Fe}_2\text{O}_4$ , Mn-  $\text{Fe}_2\text{O}_4$
- Nanoparticules d'oxydes métalliques :  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$
- Nanoparticules de carbone : nanotubes de carbone, nanotubes de graphène
- Nanoparticules de céramique : CaP, hydroxyapatite (HAp),  $\text{CaCO}_3$ , nanocéramiques de verre bioactif (bioactive glass nanoparticles)
- Nanoparticules polymériques : noosphères, nanocapsules, dendrimères, micelles polymériques, nanogels
- Nanoparticules lipidiques : liposomes, micelles
- Nanofibres

Ces nanoobjets sont ajoutés au sein des échafaudages en ingénierie tissulaire pour apporter des fonctions spécifiques. Leur utilisation permet par exemple d'améliorer la prolifération et la différenciation cellulaire : utilisation de nanoparticules d'or (AuNP) (150), de nanoparticules de dioxyde de titane  $\text{TiO}_2$  (151) ou bien de nanocéramiques de verre bioactif (152) dans la régénération osseuse. Ils permettent également de renforcer les propriétés mécaniques des échafaudages de fibres polymériques par l'ajout de nanotubes de carbone (NTC) (153). Leurs propriétés naturelles peuvent être exploitées afin d'améliorer la transmission de signaux électriques au sein de matrices fibreuses dans l'ingénierie tissulaire cardiaque par ajout d'AuNP (154). Ils peuvent aussi apporter des propriétés antibactériennes, comme les nanoparticules d'argent (AgNP) dans le design de greffons osseux (155) ou dans la réparation cutanée de patients brûlés (155). Ils peuvent également être utilisés pour délivrer des molécules bioactives : médicaments (ex : dexaméthasone pour stimuler la croissance cellulaire des cellules souches mésenchymateuses (156)) ou protéines (nanoparticules d'albumine utilisées en tant que vecteur de la protéine morphogénétique osseuse-2 (BMP-2) dans la régénération osseuse (157)). Enfin, les nanoparticules magnétiques peuvent également être utilisées afin de permettre un positionnement cellulaire favorisant leur connexion (158), ou bien pour permettre de réaliser une disposition particulière, comme une disposition cylindrique dans la reconstitution de vaisseaux (159).

Ces exemples, illustrés par la **Figure 46**, ne sont qu'une partie des nombreuses et prometteuses possibilités offertes par l'ajout de nanoformes biocompatibles au sein de matrices d'ingénierie tissulaire. La volonté d'ajouter des fonctions particulières aux matrices cellulaires peut également s'envisager via les propriétés des formes de taille micrométrique. L'ouverture naturelle de l'ingénierie tissulaire aux techniques d'impression 3D a également permis l'intégration de nano- et microformes en bioimpression 3D afin de remplir des fonctions similaires à celles évoquées précédemment (53,136,137,160).

Dans leur revue sur la composition de bioencres, Chimene *et al.* (118) mirent en avant quelques travaux de formulation contenant des nano-objets. D'un intérêt majeur pour des applications en médecine régénérative, la plupart de ces formes n'avaient cependant pas été ajoutées directement dans le process d'impression, mais à posteriori. C'est pourquoi, notre équipe a entrepris de faire ressortir l'incorporation de nano et micro-objets, et plus particulièrement des formes pharmaceutiques dans le domaine de la bioimpression en proposant une revue de la littérature.



**Figure 46: Exemples de différents types de nanoparticules utilisées pour des applications d'ingénierie tissulaire**

*Le ciblage des tissus et l'amélioration de l'imagerie, l'administration d'agents bioactifs, la modulation des propriétés mécaniques des échafaudages, amélioration des propriétés antimicrobiennes et antitumorales. Extrait de Fathi-Achachelouei et al. (137).*

### **Nano- et microformes pharmaceutiques utilisées en bioimpression 3D**

La revue publiée par notre équipe est intitulée : « *Micro- and nano-formulations for bioprinting and additive manufacturing* ». Elle a été publiée en tant que keynote review dans le journal *Drug Discovery Today* (160). Cette revue avait pour objectif de répertorier les formulations d'encres et bioencres dans lesquelles des formes pharmaceutiques avaient été incorporées et imprimées avec succès, ou non imprimées mais présentant un certain potentiel. La revue est ajoutée à la fin de ce manuscrit (**Document Annexe 1**, pages 255-270).

Afin de ne pas apporter de confusion au lecteur, il est important de préciser quelques points quant aux termes utilisés dans l'écriture de cette revue. En effet, celle-ci a été publiée avant la mise à jour des définitions de Groll *et al.* (43) qui propose d'utiliser les termes de bioencre (*bioink*) pour une encre contenant des cellules, et le terme d'encre de biomatériaux (*biomaterial ink*) pour une encre n'en contenant pas (cf. II.1.1, page 50). Dans notre revue, la distinction était également faite entre ces deux types d'encre de la manière suivante : une encre contenant des cellules était appelée « bioencre », et une encre n'en contenant pas était tout simplement nommée « encre » (*ink*). Lorsque ces formulations contenaient des formes pharmaceutiques, les termes de bioencre composée (*composite bioinks*) et encre composé (*composite inks*) étaient alors respectivement utilisés.

Nous avons également veillé à faire la distinction entre les approches de bioimpression utilisant des bioencres et les approches regroupées sous le terme de fabrication additive (*additive manufacturing*) utilisant uniquement des encres (sous-entendu un process d'impression sans cellules).

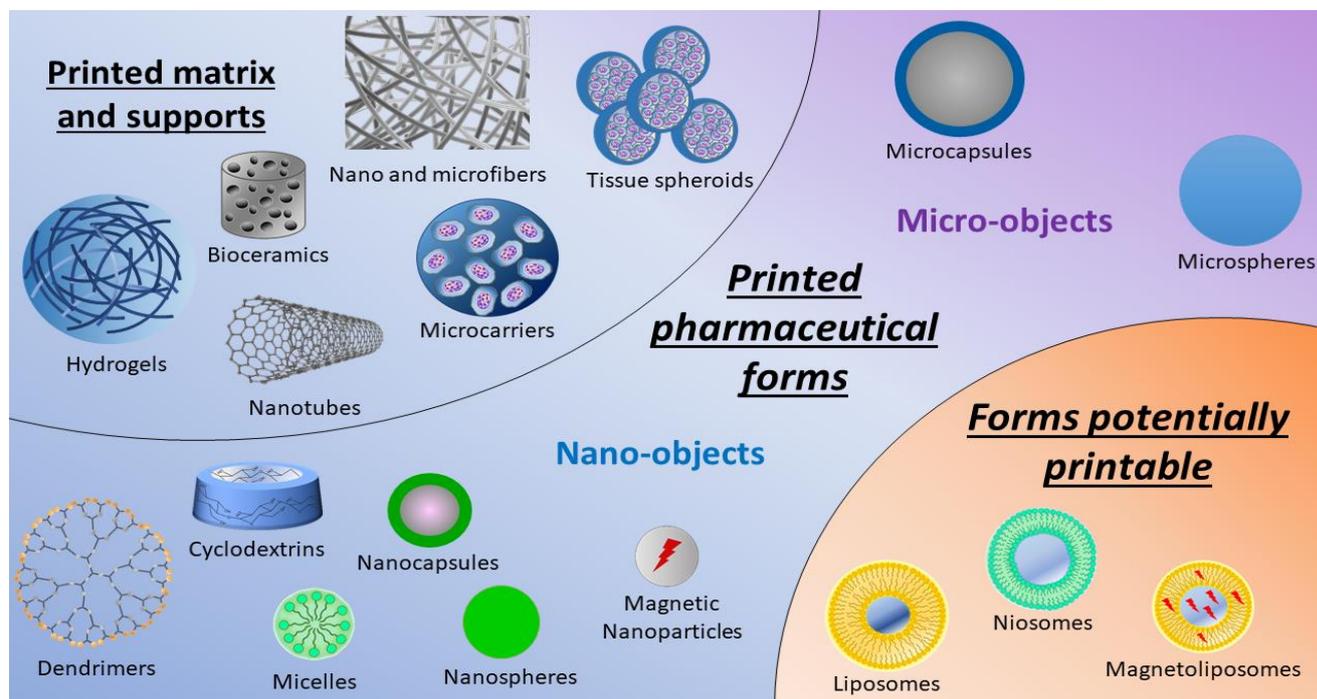
Notre revue a été construite en consacrant une première partie à la description des formes pharmaceutiques majoritairement utilisées en médecine régénérative. Sur la base de ces données, nous avons proposé une classification des applications en fonction des trois rôles principaux joués par ces formes pharmaceutiques au sein des encres et bioencres : 1) amélioration de la croissance cellulaire et de la différenciation ; 2) libération de molécules biologiquement actives ; 3) amélioration des propriétés mécaniques des bioencres, des échafaudages imprimés ou du process d'impression. Puis, trois parties ont été rédigées, chacune étant consacrée à ces applications et mettant en avant la manière dont les défis actuels de la bioimpression pouvaient être traités par l'utilisation de ces formes pharmaceutiques incorporées au sein d'encres composées. Les paragraphes ci-dessous sont un résumé et proposent de mettre en avant quelques exemples concrets d'encres et bioencres composées.

### **Formes pharmaceutiques utilisées dans encres composées**

De nombreux nano- et micromatériaux ont été utilisés en médecine régénérative et comprennent de façon non exhaustive : nanoparticules, liposomes, nanotubes de carbone, micelles, dendrimères ou bien encore les microparticules.

Le défi majeur consiste à inclure ces formes pharmaceutiques dans des encres composées et à les imprimer avec succès. En effet, l'ajout de nano-ou micromatériaux entraîne des changements significatifs dans les propriétés mécaniques, comme cela a pu être observé pour les hydrogels en modifiant notamment leur rigidité, leur propriétés rhéofluidifiantes ou leur cinétique de dégradation. L'inclusion de ces formes peut également avoir un impact sur les capacités d'impression et les paramètres d'impression de l'encre composée. La **Figure 47** illustre ces formes pharmaceutiques et fait notamment la distinction entre celles ayant été imprimées et celles ne l'ayant pas été mais présentant un potentiel certain. Celles ayant été imprimées avec succès, ont été répertoriées et

classées selon leurs domaines d'applications, leur type et leur contribution au sein d'un tableau (pages 257-258). Il est à noter qu'en majorité, ces formes trouvent une application dans l'ingénierie tissulaire de l'os ou du tissu ostéocondral.



**Figure 47: Formes pharmaceutiques, matrices et supports imprimés et potentiellement imprimables**

Extrait de Bouguéon et al. (160).

### Amélioration du devenir des cellules et de leurs fonctions

Les formes pharmaceutiques peuvent contribuer à la fonction et au développement cellulaire incluant leur survie, leur croissance et leur différenciation afin d'assurer pleinement l'ensemble des fonctions nécessaires au remplacement du tissu régénéré. Elles peuvent aussi participer à leur encapsulation, permettant de créer un meilleur contact entre les cellules, mais également d'utiliser ces capsules contenant des cellules comme des éléments de base pour la reconstruction tissulaire (bioassemblage).

#### Amélioration de la viabilité cellulaire, de la croissance et de la différenciation

Les biocéramiques sont des biomatériaux composés d'éléments minéraux tels que le phosphate de calcium (CaP), le phosphate tricalcique (TCP) ou l'hydroxyapatite (HAp)) et sont utilisés pour la reconstruction tissulaire osseuse en raison de leur excellente activité biologique, de leur ostéoconductivité et de la similarité de leurs compositions avec l'os. L'ajout de microparticules biphasiques de phosphate de calcium (BCP) a permis d'induire des formations osseuses élaborées par rapport à des échafaudages plus classiques en triphosphate de calcium ou en HAp et ne contenant pas de BCP. En outre, les BCP ont permis d'améliorer la cytocompatibilité, l'adhérence, la viabilité et la prolifération cellulaire (161,162).

La combinaison de nanoparticules et d'hydrogels synthétiques ou naturels a été mise en œuvre. Ainsi, incorporer des nanoargiles (*nanoclays*) (c.à.d. des nanoparticules de silicates minéraux en couches) dans des gels de dérivés d'acrylate (hydrogel de N-acryloyle glycinamide) améliorait de manière significative l'adhésion cellulaire, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes primaires de rat utilisés pour la régénération osseuse (cf. Figure 2a, page 260) (163), induisait la production de MEC minéralisée (164) et régula positivement l'expression génique osseuse (61).

L'inclusion de fibres dans des constructions imprimées en 3D à partir d'hydrogels hybrides de fibrine et de collagène permet de favoriser la régénération cartilagineuse de chondrocytes *in vitro* et *in vivo* (cf. Fig. 2b, page 260) (165). Lorsque les échafaudages de polycaprolactone ont été recouverts de fibres électrolytiques d'acide polylactique-co-glycolique, les cellules souches mésenchymateuses ensemencées par fabrication additive ont permis de se différencier en lignées ostéogéniques et chondrogéniques et ont démontré une plus grande adhérence cellulaire par rapport aux échafaudages qui n'étaient pas revêtus.

La régénération osseuse a également été favorisée à l'aide de nanoparticules magnétiques. Des particules d'oxyde de fer ( $Fe_3O_4$ ) exposées à des champs électromagnétiques induisent la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse (166) ou augmentait la stabilité et l'activité biologique d'hydrogels (167). Pour le moment non bioimprimées, ces particules magnétiques pourraient facilement trouver leur place dans des bioencres, notamment encapsulées au sein de liposomes magnétiques pour limiter certains de leurs effets toxiques (168).

#### L'encapsulation cellulaire en tant qu'éléments de construction pour l'ingénierie tissulaire.

Les microtransporteurs sont des microsphères polymériques de soutien de 40 à 600µm. Leur architecture sphérique poreuse et hautement interconnectée permet l'adhésion et la croissance des cellules en améliorant considérablement la culture cellulaire. Les transferts gazeux et nutritifs entre le milieu et les cellules sont plus efficaces qu'en culture 2D ; l'agrégation et la différenciation sont également améliorées. La surface de 1 g de microtransporteurs équivaut à la surface de quinze flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> (45). De plus, ils facilitent le contact cellule-cellule pour une différenciation optimale. Composés de matériaux synthétiques (dextrane, plastique, verre) ou naturels (cellulose, gélatine et collagène), ils peuvent être utilisés tels quels dans des stratégies de bioassemblage ou combinés à des bioencres en bioimpression. Par exemple, les microtransporteurs dans des bioencres de gélatine méthacrylée ont permis d'obtenir une grande viabilité de cellules souches mésenchymateuses en facilitant l'adhésion cellulaire et en soutenant la différenciation ostéogénique des cellules (169). Il est également possible d'enrober ces sphères pour former des microcapsules. Kingsley *et al.* (170) ont préparés des cellules encapsulées dans des billes en utilisant une technique d'impression laser, proposant l'ensemble de la surface intérieure de la capsule pour un développement

cellulaire optimal (cf. Fig. 2c, page 260). L'encapsulation de plusieurs types de cellules telles que des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses pourrait permettre de recréer des structures de vaisseaux sanguins avec des lumières fonctionnelles (170).

### **Libération de molécules biologiquement actives**

Les micro- et nanoformes sont couramment utilisées dans le domaine pharmaceutique pour délivrer des composés actifs, comme des médicaments, et de nombreuses recherches se penchent sur leurs capacités de libération de gènes et d'acides nucléiques. En médecine régénérative, les facteurs de croissance sont particulièrement étudiés. Leur délivrance contrôlée dans le temps ou spécifique à un site donné est une approche intéressante pour conduire à une régénération tissulaire optimisée.

#### Facteurs de croissance

Des nanoparticules chargées de facteurs de croissance ont été utilisées au sein de matrices imprimées et appliquées à la synthèse de divers tissus. Par exemple, la protéine morphogénétique osseuse (BMP)-2, chargée dans des microparticules de gélatine et formulée dans une bioencore d'alginate contenant des cellules stromales multipotentes, a permis une libération continue de BMP-2 sur 3 semaines, permettant une différenciation ostéogénique et une formation osseuse significatives sur des modèles murins (171). La bioimpression spécifique de microsphères chargées de facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) a également permis la création de différences régionales dans la genèse vasculaire d'échafaudages (172).

#### Délivrance de médicaments et de gènes

La libération contrôlée de médicaments (antibiotiques, anti-inflammatoires par exemple) au sein de matrices imprimées peut s'envisager en les incorporant dans des nanoparticules ou à la surface de fibres.

Des particules de céramique chargées d'antibiotiques ont été utilisées dans le traitement de plusieurs maladies infectieuses de l'os comme la tuberculose ostéo articulaires (173,174). Le verre bioactif mésoporeux (*mesoporous bioactive glass*) a été utilisé comme système d'administration de médicaments et co-imprimé avec de l'isoniazide et de la rifampicine pour le traitement de la tuberculose osseuse après chirurgie. Une libération locale de médicament et un bon potentiel ostéogénique dans un modèle d'anomalie osseuse chez le lapin ont démontré l'intérêt de cette approche pour le traitement de la tuberculose ostéoarticulaire (173).

D'autres formes ont été développées afin de répondre à des stimuli extérieurs, permettant une libération sélective de molécules actives. Par exemple, des microcapsules composées d'une coque en PLGA et de nanotiges d'or (*nanorods*) répondent à un stimuli laser et libèrent leur contenu (colorants, biomolécules, enzymes) au sein d'une matrice imprimée (cf. figure 3a, page 263) (175).

## **Amélioration des propriétés mécaniques des bioencres, des échafaudages imprimés ou du process d'impression**

Comme il était précisé précédemment, l'incorporation de nano ou micro-objets peut avoir une influence sur la rigidité et les propriétés rhéologiques des bioencres. La modulation de ces propriétés est un défi majeur en bioimpression. Les microtransporteurs influencent significativement la rigidité des encres (55) ou au contraire la modulent pour empêcher les obstructions des imprimantes durant le process d'impression (163).

L'inclusion de nanoparticules d'argile de silicate synthétique 2D ressemblant à des pièces de monnaie (cf. figure 4a, page 265) à une encre composite à base de méthacrylate entraîne des interactions fortes, réversibles et non covalentes conduisant à des propriétés mécaniques rhéofluidifiantes (164).

Les propriétés mécaniques des échafaudages peuvent également être ajustées en utilisant des traitements post-impression pour les durcir. Dans le cas d'échafaudages de phosphate de calcium et d'HAP réalisés pour des substituts osseux, le post-traitement avec une solution d'acide polylactique et glycolique a permis de multiplier par 8 les propriétés mécaniques (161).

De nombreux défis restent à surmonter en bioimpression pour réaliser des organes viables et transplantables avec une applications clinique chez l'homme. La survie cellulaire, leur croissance et leur développement au sein d'une matrice imprimée, la formation et la croissance d'un tissu avant et après implantation sont les défis majeurs. Nous avons pu voir que certains d'entre eux peuvent être efficacement résolus en incorporant des formes pharmaceutiques au sein de bioencres composées. L'inclusion de formes pharmaceutiques comme les nanoparticules, les microparticules et les fibres a permis d'améliorer la croissance et la différenciation cellulaire, d'encapsuler des biomolécules ou d'améliorer le processus d'impression. Ces formes ont encore de nombreux potentiels à offrir, notamment celles n'ayant pas encore été incorporées à un process d'impression. Toutefois, l'impact que peuvent avoir ces formes pharmaceutiques sur les propriétés rhéologiques de l'encre ou ses conséquences engendrées sur l'étape d'impression ne doit pas être négligés. Nous manquons également de recul et de moyens afin d'évaluer la toxicité, la carcinogénicité ou la tératogénicité de ces nanoparticules dans des applications biomédicales (136,176,177), sachant que ces effets néfastes dépendront notamment des doses et du temps d'exposition à ces nanoparticules ainsi qu'un risque d'effet d'accumulation.

### III. Caractérisation des hydrogels pour la formulation des encres et bioencres

Dans cette partie seront abordées plusieurs techniques contribuant à l'analyse et à la caractérisation des hydrogels entrant dans la formulation des encres et bioencres. Ces techniques visent à constater les phénomènes de gélification sur un plan macro et microscopique, à expliquer les comportements mécaniques observés, ainsi qu'à comparer les gels entre eux. Les résultats de ces caractérisations permettent ainsi d'adapter au mieux les propriétés des hydrogels à leurs applications futures.

#### III.1 Inspection visuelle de la formation d'un gel

La méthode classique permettant de constater la gélification d'une substance consiste en un simple retournement du contenant dans lequel est présent la substance à évaluer (méthode par inversion ou retournement d'un tube ou d'un flacon) (**Figure 48**). L'objectif est de constater à l'œil nu, que la gélification d'une substance est effective. Un gel est ainsi formé si l'échantillon ne coule pas sous l'effet de la gravité et de son propre poids. Cette inspection visuelle reste le moyen le plus simple et le plus rapide d'évaluer rapidement la formation d'un gel. Selon le résultat obtenu, certains auteurs classent les échantillons selon plusieurs termes : « en solution », « liquide visqueux », « demi-gel » ou « gel solide ». Malgré sa simplicité, cet essai fournit des informations importantes et contribue à sélectionner les techniques les plus appropriées pour caractériser les échantillons selon leur état (79,97).

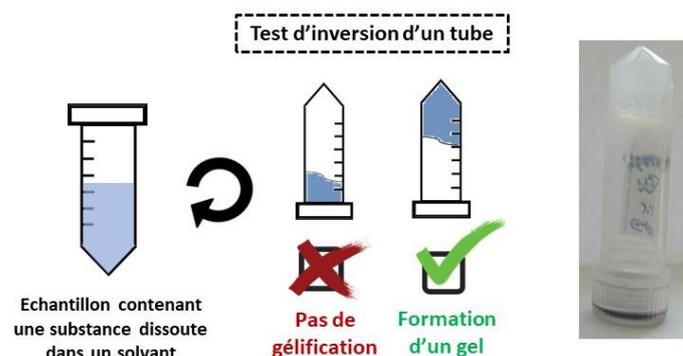


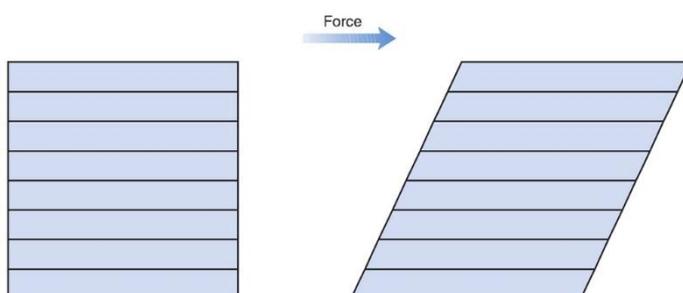
Figure 48 : Illustration du test d'inversion d'un tube

#### III.2 La rhéologie appliquée à la caractérisation des gels

##### III.2.1 Contraintes, déformation et vitesse de cisaillement

La rhéologie est l'étude de l'écoulement et de la déformation des matériaux sous l'application d'une force. Lorsqu'un matériau est soumis à un ensemble de forces susceptible de le déformer, les

mouvements des différents points composant ce matériau dépendent de leur répartition et de l'intensité des forces appliquées. Pour certaines distributions de ces forces, un mouvement appelé « **mouvement laminaire de cisaillement** » est engendré. La représentation schématique de ce mouvement est la suivante : le matériau a une structure lamellaire en couches superposées, d'épaisseur infiniment mince. La déformation du matériau s'effectue par un glissement relatif des différentes couches les unes sur les autres, sans transfert de matière d'une couche à l'autre (**Figure 49**) (178–180).



**Figure 49: Représentation lamellaire d'un matériau et mouvement laminaire de cisaillement**

*Extrait de Marriott et al. (179).*

Au cours d'un mouvement laminaire de cisaillement, les couches sont animées de mouvements relatifs : deux couches successives, au contact l'une de l'autre, se déplacent relativement l'une par rapport à l'autre. Il en résulte l'apparition de **forces de frottement** qui s'exercent tangentiellement à la surface de contact : ces forces tangentielles sont appelées **forces de cisaillement**. Ces forces de cisaillement sont rapportées à l'unité de surface sur laquelle elles s'exercent et définissent ainsi la **contrainte de cisaillement (*shear stress*)**. La contrainte de cisaillement est une grandeur physique dynamique, c'est à dire qui donne naissance au mouvement. Elle est notée  $\tau$  et s'exprime en pascal (Pa) ou en newton (N) par  $m^2$ .

**La déformation de cisaillement (*shear strain*)** et la **vitesse ou taux de cisaillement (*shear rate*)** sont quant à elles deux grandeurs physiques cinématiques, qui décrivent de façon géométrique le mouvement du matériau dans l'espace, au cours du temps, indépendamment des contraintes qui lui ont donné naissance. La déformation de cisaillement, notée  $\gamma$  est une grandeur sans dimension. La vitesse de cisaillement, notée  $\dot{\gamma}^*$  est par définition la dérivée par rapport au temps de la déformation de cisaillement et s'exprime en  $s^{-1}$ .

L'équation reliant la déformation de cisaillement et la contrainte de cisaillement est appelée « **équation rhéologique d'état** » (**E1**). Sa connaissance détermine les propriétés rhéologiques du matériau. Cette relation dépend de la nature et des propriétés du matériau considéré.

$$(E1) \quad \gamma = f(\tau)$$

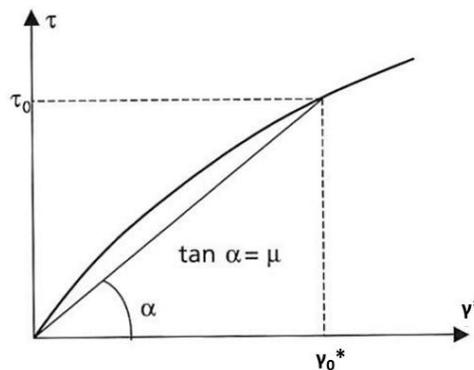
L'expression graphique de cette équation est appelée **rhéogramme**.

### III.2.2 Viscosité

La viscosité d'un fluide peut se définir simplement comme sa résistance à l'écoulement ou au mouvement. La **viscosité dynamique**, également dénommée **viscosité apparente**, s'exprime de la manière suivante **(E2)**:

$$(E2) \quad \mu = \frac{\tau}{\gamma^*}$$

L'unité de la viscosité dynamique est le pascal seconde (Pa.s). Sur un rhéogramme exprimant  $\tau$  en fonction de  $\gamma^*$ , pour une valeur  $\tau$  donnée (ou  $\gamma^*$ ), la viscosité est égale à la pente de la droite ( $\tan \alpha$ ) joignant l'origine au point représentatif considéré.



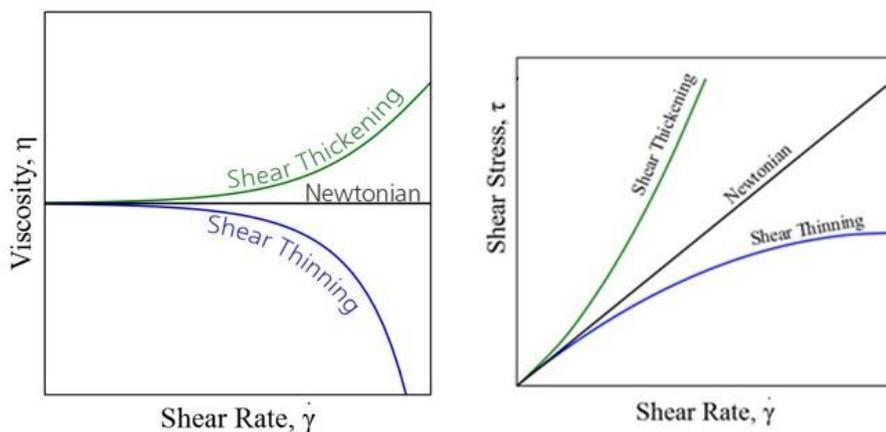
**Figure 50: Exemple de rhéogramme**

*Extrait de Couarraze et al. (178)*

Pour certains fluides,  $\mu$  ne dépend pas de la contrainte de cisaillement. Ces fluides sont appelés **fluides newtoniens**. Leur coefficient de viscosité dynamique est alors appelé **viscosité absolue** notée  $\eta$ . L'équation rhéologique d'un fluide newtonien (équation de newton) s'écrit donc **(E3)** :

$$(E3) \quad \tau = \eta \gamma^*$$

Où  $\eta$  n'est fonction que de la température et de la pression extérieure. Le rhéogramme représentatif est une droite de pente  $\eta$  (**Figure 51**). Par opposition, un fluide pour lequel la viscosité est dépendante du taux de cisaillement est un **fluide non Newtonien**. Parmi eux, les **fluides rhéoépaississants (shear thickening)** voient leur viscosité augmenter lorsque la vitesse de cisaillement augmente. A l'inverse, les **fluides rhéofluifiant (shear thinning)** ont une viscosité qui diminue quand le taux de cisaillement augmente (**Figure 51**) (178,179).



**Figure 51: Rhéogrammes des fluides newtoniens et non newtoniens**

Viscosité des fluides Newtonien, et non Newtoniens (rhéoépaississants (vert) et rhéofluidifiant (bleu)). De gauche à droite : expression de la viscosité en fonction du taux de cisaillement ; expression de la contrainte de cisaillement en fonction du taux de cisaillement (181).

### III.2.3 Comportements élastiques et visqueux d'un gel

La rhéologie permet de distinguer les comportements élastiques (ou solides), des comportements visqueux (ou liquides) des matériaux. La description du **comportement élastique idéal** peut être résumée dans la loi de Hook **(E4)** dans laquelle l'extension du matériau est proportionnelle à la force qui lui est imposée et qui revient à son état initial lorsque la contrainte est supprimée :

$$(E4) \quad \tau = G^* \gamma$$

Dans cette équation, **G\*** est la constante de proportionnalité appelée **module d'élasticité** qui est une propriété intrinsèque du solide.

La plupart des métaux et des céramiques se comportent comme un solide idéal. Les gaz et les petites molécules liquides comme l'eau et les huiles ont-elles un comportement newtonien. Cependant, de nombreux autres matériaux, tels que le sang, les polymères, les peintures, les aliments et plus spécifiquement les matériaux souples, se situent souvent entre un solide élastique idéal et un fluide visqueux idéal. Les matériaux mous (soft), dont font partie les gels, présentent des réponses à la fois élastiques et visqueuses et sont donc considérés comme **viscoélastiques**. La viscoélasticité est la propriété d'un matériau qui présente des comportements visqueux et élastiques tout en subissant une déformation (180).

Les relations entre contrainte et déformation ne sont pas seulement régies par des constantes élastiques et visqueuses, mais sont fonctions du temps, de la direction et de l'étendue de la déformation. La caractérisation rhéologique des gels repose sur la quantification de la **viscoélasticité**

**dynamique** sur une large plage d'échelles de temps et de déformations, et enfin sur la corrélation de ces comportements avec la structure du gel. La rhéologie dépend du comportement global du gel, lequel est à son tour principalement régi par les interactions intermoléculaires ou leur connectivité. Ainsi, la caractérisation rhéologique des gels réside dans la transcription directe des propriétés d'assemblage au comportement viscoélastique des matériaux qui les composent (180).

Lors d'une mesure rhéologique à déformation contrôlée, la déformation de cisaillement appliquée à l'échantillon en oscillation sinusoïdale est donnée par l'équation **(E5)** (**Figure 52**) :

$$(E5) \quad \gamma(t) = \gamma_0(\sin \omega t)$$

La contrainte de cisaillement mesurée est une onde sinusoïdale déphasée exprimée par l'équation **(E6)** :

$$(E6) \quad \tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t + \delta)$$

$\omega$  est la **fréquence angulaire** appliquée et  $\delta$  la **différence de phase** entre les deux ondes.  $t$  représente le **temps de propagation**.

De même, pour une mesure à contrainte contrôlée, la contrainte de cisaillement et la déformation de cisaillement résultante peuvent être exprimées par les équations suivantes (**(E7)** et **(E8)**)

$$(E7) \quad \tau(t) = \tau_0(\sin \omega t)$$

$$(E8) \quad \gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t + \delta)$$

Pour un matériau parfaitement élastique, les ondes de contrainte et de déformation sont en phase ( $\delta = 0^\circ$ ), tandis que pour une réponse parfaitement visqueuse, deux ondes sont déphasées ( $\delta = 90^\circ$ ). Les matériaux viscoélastiques donnent lieu à un angle de phase entre ces deux valeurs limites (**Figure 52**).

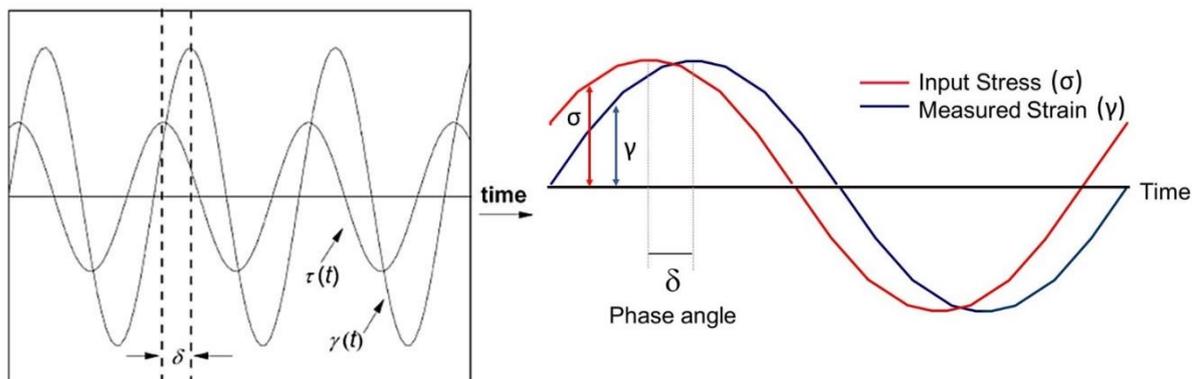
Lorsqu'une notation complexe est utilisée pour décrire une déformation sinusoïdale appliquée, le **module complexe ( $G^*$ )** du matériau testé est donné par l'équation **(E9)** :

$$(E9) \quad G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$$

dans laquelle la partie réelle,  **$G'$  module de stockage**, également connu sous le nom de **module élastique**, est la mesure de l'énergie emmagasinée au cours d'un cycle de déformation; et la partie imaginaire,  **$G''$ , le module de perte**, également appelé **module visqueux**, est la mesure de la perte d'énergie au cours du cycle de déformation.

Dans un matériau viscoélastique, la dominance d'un comportement solide ou liquide peut être évaluée à l'aide du **facteur de perte  $\tan \delta$** , qui est exprimé par le rapport  $G'' / G'$ . Lorsque la valeur de  $\tan \delta >$

1 (c.-à-d.  $G'' > G'$ ), l'échantillon se comporte davantage comme un liquide visqueux. Inversement, lorsque  $\tan \delta < 1$  (c.-à-d.  $G' > G''$ ), l'échantillon se comporte davantage comme un solide élastique (180).



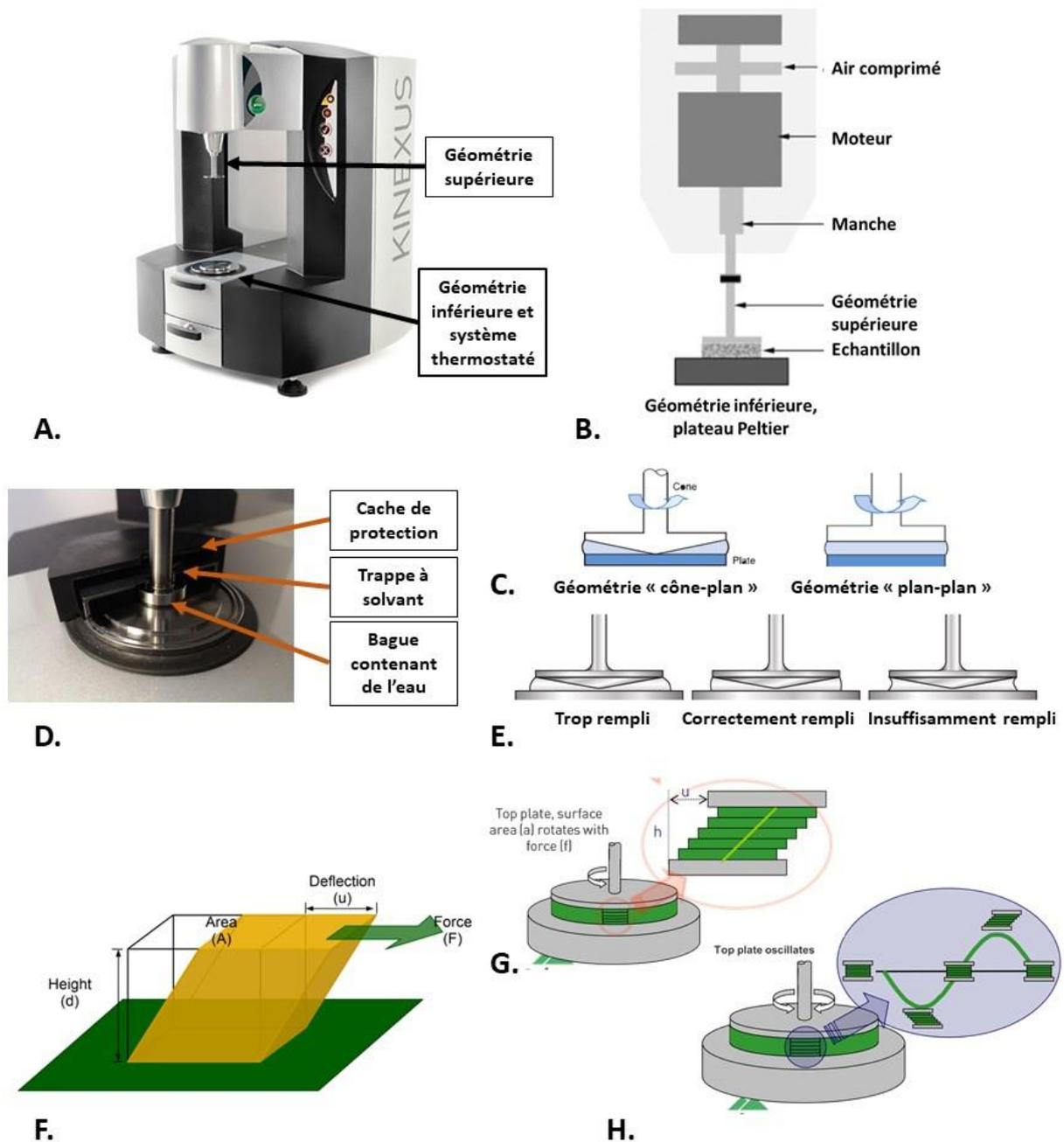
**Figure 52: Illustrations du principe d'une mesure de cisaillement oscillatoire de faible amplitude**

*Adapté de Dawn and Kumari et al. (180) (Gauche) et Hill et al. (183) (droite).*

### III.2.4 Rhéomètre et caractérisation rhéologique d'un gel

Pour caractériser les propriétés viscoélastiques de matériaux tendres complexes, la relation contrainte-déformation doit être mesurée sur une large gamme de déformations, de vitesses de déformation et d'échelles de temps à l'aide d'un rhéomètre.

Un rhéomètre est un appareil utilisé pour mesurer les propriétés rhéologiques (viscosité et l'élasticité) des matériaux dans différentes conditions. Il est composé d'une tête contenant un moteur à pallier à air, animant d'un mouvement de rotation une géométrie, dite géométrie supérieure (**Figure 53 A. et B.**). La géométrie supérieure peut être de 2 types, plan parallèle (plan-plan) ou cône plan (**Figure 53 C.**), dont le choix est déterminé par la viscosité du matériau à analyser). La partie inférieure de l'appareil est équipée d'un système thermostaté permettant, par le biais d'un échangeur thermique, de maintenir une température constante durant l'expérience. Une seconde géométrie, la géométrie inférieure, repose sur le système thermostaté. L'échantillon est déposé entre la géométrie inférieure et supérieure. Une bague peut être ajoutée à la géométrie supérieure pour y déposer de l'eau. L'ensemble géométrie inférieure, échantillon, géométrie supérieure est recouvert d'une trappe à solvant. La trappe et la bague permettent d'éviter que l'échantillon ne sèche durant la durée de la mesure (**Figure 53 D.**). Le dépôt de l'échantillon est une étape délicate, dont découlera les résultats de l'expérience. L'échantillon doit être déposé en quantité suffisante et de manière homogène (**Figure 53 E.**)(182).



**Figure 53: Rhéomètre et caractérisation d'un échantillon**

**A.** Rhéomètre Kinexus Pro +, Malvern (200). **B.** Schéma d'un rhéomètre. Une fine couche d'échantillon est déposée entre la géométrie supérieure mobile et la géométrie inférieure statique. Un système Peltier permet de maintenir une température d'analyse constante. **C.** Photographie d'un échantillon disposé entre les deux géométries, recouvert d'une bague contenant de l'eau et de la trappe à solvants. **D.** Géométrie type « cône-plan » et géométrie type « plan-plan », adapté de (179) **E.** Règle de dépôt d'un échantillon, Malvern (182). **F.** Représentation schématique du mouvement appliqué sur l'échantillon (jaune) d'épaisseur  $d$  placée entre les deux géométries. La force  $F$  appliquée sur une surface  $A$  (area) entraîne un déplacement de l'échantillon d'une distance  $u$ , adapté de Hill et al. (183). **G.** Illustration d'un mouvement rotatoire de la géométrie supérieure et déplacement de l'échantillon, adapté de Hill et al. (183) (N.B. dans cette illustration l'épaisseur  $d$  est ici notée «  $h$  »). **H.** Illustration d'un mouvement oscillatoire de la géométrie supérieure, appliquée dans un sens puis dans l'autre, et déplacement de l'échantillon, adapté de Hill et al. (183).

Pour réaliser l'analyse d'un échantillon placé entre les deux géométries, une déformation (ou contrainte) oscillatoire est appliquée à la géométrie supérieure. Le mouvement induit de la géométrie inférieure se résout en un mouvement entrant et sortant (180).

L'échantillon placé entre deux géométries va exprimer une déformation de cisaillement ou une vitesse de cisaillement dépendants de la contrainte de cisaillement appliquée par le rhéomètre. Un profil de cisaillement typique du matériau analysé sera exprimé (183).

La déformation de cisaillement  $\gamma$  (*shear strain*) correspond au déplacement de l'échantillon ( $u$ ) divisé par la hauteur du dépôt de l'échantillon ( $d$ ) (exprimés tous deux en mètres, m) (**Figure 53 F.**). La vitesse de cisaillement (*shear rate*) est la dérivée par rapport au temps de la déformation de cisaillement (*shear strain*). Le mouvement appliqué à l'échantillon peut être rotationnel (mesure de viscosité) ou oscillatoire (détermination des modules  $G'$  et  $G''$ ). Pour rappel, la viscosité ( $\eta$ ) et le module complexe ( $G^*$ ) sont exprimés par les équations(**E3**) et (**E4**).

Le moteur applique une contrainte de cisaillement  $\sigma$  qui est la résultante d'une force  $F$  (exprimée en Newton, N) , sur une surface  $A$  déterminée (en mètre carré, m<sup>2</sup>) (**E10**).

$$(E10) \quad \sigma = \frac{F}{A}$$

L'échantillon va se déplacer sous l'action de la géométrie supérieure (**Figure 53 F. et G.**). Un capteur de position, inclus dans la tête du rhéomètre, mesure le déplacement  $u$  (exprimé en mètres, m) ((**E11**) et **Figure 53 F.**) résultant, qui est fonction de la viscosité de l'échantillon. Le rhéomètre détermine ainsi le déplacement dans le temps pour exprimer le taux de cisaillement  $\dot{\gamma}^*$  (exprimé en seconde, s<sup>-1</sup>) (**E12**).

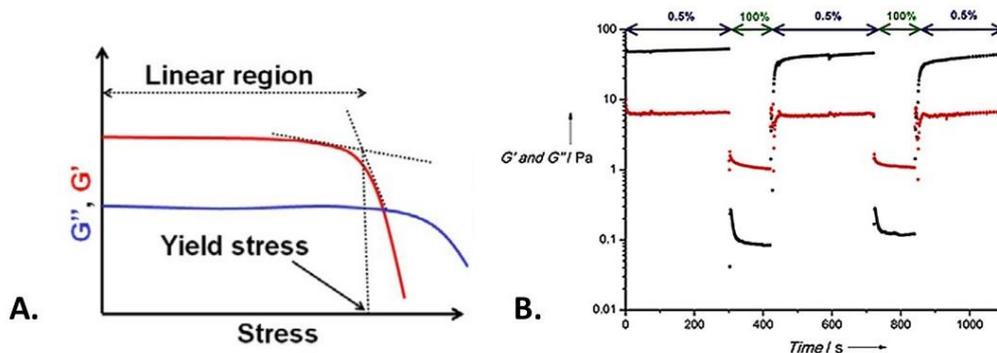
$$(E11) \quad \gamma = \frac{u}{d}$$

$$(E12) \quad \dot{\gamma}^* = \frac{dy}{dt}$$

Au cours des analyses rhéologiques, contrainte de cisaillement, vitesse de cisaillement ou déformation de cisaillement peuvent être fixes ou évolutives. Il en est de même pour la fréquence oscillatoire (ou angulaire)  $\omega$ , afin de réaliser différents types de mesures.

Les propriétés rhéologiques d'un gel viscoélastique sont indépendantes du stress appliqué, jusqu'à un niveau critique. La **contrainte de rupture (yield stress)** est la contrainte critique au-dessus de laquelle un matériau subit des modifications structurelles cruciales et commence à s'écouler. En dessous de ce point, le matériau présente des propriétés élastique ( $G' > G''$ ) et ses modules complexes sont indépendants de la contrainte appliquée (**Figure 54**). Ainsi, dans une caractérisation de **balayage de contrainte (stress sweep)** à fréquence constante, la dépendance à la contrainte des modules  $G'$  et  $G''$  est évaluée. Le point auquel la valeur des modules s'écarte de manière significative d'une valeur

constante (plateau) indique un écart par rapport au comportement viscoélastique linéaire. Avant ce point, la région entière est décrite comme la **région viscoélastique linéaire (linear viscoelastic region, LVER) (Figure 54 A.)**. Pour estimer les propriétés mécaniques des gels, les expériences de rhéologie doivent être effectuées dans la LVER. Dans ce domaine, l'évolution des modules est indépendante de l'ampleur de la contrainte ou de la contrainte imposée. Le comportement macroscopique observé n'est donc dû qu'aux facteurs variant (180,184).



**Figure 54: Expression d'un domaine linéaire de viscoélasticité (LVER) et d'un comportement thixotrope sur un rhéogramme**

*A. Domaine linéaire de viscoélasticité et contrainte de rupture. B. Comportement thixotrope ( $G'$  en noir ;  $G''$  en rouge). Adapté de Dawn et al. (180).*

Lorsque ce facteur est la température, il est possible de déterminer la **température sol-gel ( $T^\circ$  sol-gel)**. Au cours de cette expérience, la température augmente et les propriétés macroscopiques du gel évoluent jusqu'à la rupture de sa structure tertiaire. La température pour laquelle l'échantillon passe d'un état gel à un état liquide ( $G' < G''$ ) est alors relevée (184).

La **thixotropie** est une propriété allouée à certains gels, capables de retrouver leurs propriétés élastiques spontanément après relâchement d'une force mécanique appliquée initialement et responsable de la rupture de la structure tertiaire du gel (transition gel-sol), conduisant à l'écoulement du gel. Lors d'une expérience de thixotropie, l'évolution de  $G'$  et  $G''$  en fonction du temps est évaluée. Au début de l'expérience, l'échantillon est exposé à une force de cisaillement suffisamment élevée pour rompre l'intégrité du gel ( $G' < G''$ ) qui commence à couler. Puis, la force appliquée est libérée et la récupération de  $G'$  et  $G''$  est mesurée avec une contrainte et une fréquence constante. La récupération de  $G'$  à sa valeur initiale (ou proche de celle-ci) indique le comportement thixotrope du gel (**Figure 54 B.**). Ce phénomène est essentiellement dû à des modifications au niveau macroscopique sans altérations chimiques. Cette caractéristique est également parfois appelée **auto-réassemblage (self-healing)** (180,184).

### III.3 Microscopie

Les techniques microscopiques permettent d'étudier la morphologie des matrices d'hydrogels à l'échelle micro et nanométrique. En effet, les propriétés des hydrogels dépendent directement des structures formées par les liaisons et l'orientation des fibres entre elles. Leur maillage crée également des pores dont les caractéristiques sont inhérentes à chaque hydrogel.

Les techniques de **microscopie optique** sont une première approche renseignant sur la structure des hydrogels. Généralement plus facile d'accès, elles ne nécessitent pas une préparation complexe des échantillons. La transparence optique des hydrogels a l'avantage de permettre la génération d'images pouvant aller jusqu'à une résolution de 0,2 à 0,5  $\mu\text{m}$ . Cependant, la microscopie optique s'avère limitée par le degré de pénétration de la lumière au sein des hydrogels. Pour les échantillons les plus épais, la résolution s'avèrera très limitée. Il est également possible d'utiliser des **marqueurs fluorescents** couplés aux molécules gélatrices pour fournir des informations complémentaires. Dans les deux cas, la caractérisation des hydrogels est réalisée en conditions « humides », essentielles pour ces deux approches. Les échantillons peuvent cependant être rapidement séchés, ce qui est un obstacle majeur à la reproductibilité des résultats (97,185).

Afin d'augmenter la résolution des images et d'obtenir plus d'informations sur la morphologie des fibres et l'aspect des maillages fibreux, il est possible d'utiliser des **techniques de microscopie électroniques** comprenant la **SEM** (*scanning electron microscopy*) et la **TEM** (*transmission electron microscopy*). Ces techniques ont un principe de fonctionnement similaire à celui d'un microscope optique avec pour différence majeure le fait que la source de rayonnement utilisée soit électronique et non photonique, et que les lentilles utilisées soient électromagnétiques et non optiques. La microscopie électronique permet de grossir les structures par un facteur de  $10^6$  avec une résolution pouvant atteindre les 2 nm pour la SEM et les 0,2 nm pour la TEM. La différence entre ces deux techniques est le type d'électron utilisé pour créer une image. Dans le cas de la TEM, il s'agit des électrons transmis après impact avec l'échantillon ; dans le cas de la SEM ce sont les électrons rejetés ou émis par réflexion. De ce fait, l'épaisseur de l'échantillon d'hydrogel joue un rôle important. La TEM nécessite des échantillons très minces (100 nm d'épaisseur) pour transmettre des électrons ; et a un petit champ de vision de 100 nm. La SEM possède un champ de vision plus élargi d'environ 1 mm et peut réaliser des mesures sur des profondeurs d'échantillons de quelques micromètres. Un facteur important en microscopie électronique est la nécessité que les échantillons soient conducteurs pour obtenir des images et ne pas brouiller ou affecter leurs qualités. Les images sont réalisées dans une chambre basse pression et nécessitent un séchage des échantillons à froid ou à l'air libre avant de réaliser les mesures. Ce séchage indispensable est à l'origine de la forte probabilité de création d'artefacts structurels. De plus, les agents de coloration (ex : acétate d'uranyle) utilisés pour

augmenter la densité électronique des échantillons en TEM et améliorer la qualité et le contraste des images peuvent interférer avec les molécules hydrogélatrices. En conséquence, les structures d'origine des hydrogels s'avèrent modifiées et génèrent une certaine incertitude quant aux résultats observés. Le second inconvénient de la microscopie électronique est l'observation d'images sur une petite surface très localisée, souvent non statistiquement représentative de l'échantillon (97,185,186).

Afin d'éliminer ou de réduire les artefacts et de réaliser des images d'hydrogels natifs en préservant leur morphologie et leur structure, des **techniques cryogéniques** peuvent être utilisées en TEM (**cryo-TEM**). Dans cette approche, les échantillons d'épaisseur très fine (100nm) sont refroidis rapidement à des températures inférieures à -150°C (éthane liquide) et figés dans de minces pellicules de glace amorphe (non cristalline). Il est alors possible de mettre en évidence plus finement l'organisation fibreuse des hydrogels, ainsi que les espaces vides entre les amas fibreux (97,185).

Les techniques d'imagerie microscopiques optiques et électroniques sont nombreuses et plusieurs autres techniques contribuent à la caractérisation des hydrogels. Ils est possible de citer notamment la **microscopie à force atomique de haute résolution** (analyse en 3D de la topographie de surface des hydrogels) ou bien la **microscope de fluorescence par réflexion totale interne** (utilisée afin de visualiser la surface d'adhésion entre un hydrogel et les cellules qu'il contient et étudier leurs interactions) (97,185). Combiner les résultats obtenus par différentes méthodes microscopiques peut permettre d'obtenir des informations très précises sur les caractéristiques des hydrogels. Cependant ce regroupement d'informations peut, dans certaines situations, s'avérer délicat, notamment en tenant compte des limites de chaque technique pouvant influencer sur les résultats obtenus (séchage des échantillons, observation d'une zone concentrée non représentative), et nécessitent une certaine expertise pour être correctement interprétés (185).

#### III.4 Détermination de la dimension des mailles du réseau fibreux

La diffusion d'éléments au sein des hydrogels dépend des pores formés par la réticulation des chaînes fibreuses. La **taille des pores** correspond à la distance entre deux chaînes voisines, appelée également taille des mailles et notée  $\xi$ . Un grand maillage permettra une diffusion plus rapide des entités présentes dans l'hydrogel. Le maillage des hydrogels est influencé par le pH et de la force ionique du solvant, affectant les liaisons entre les molécules gélifiantes composant le réseau fibreux.

Il est difficile de mesurer le maillage des hydrogels gonflés par des méthodes directes en raison de leur forte teneur en eau. C'est pourquoi des méthodes de diffusion indirecte sont utilisées comme la **méthode de diffusion aux petits angles** (*small-angle scattering*, **SAS**) avec rayons X (**SAXS**) ou neutrons (**SANS**). Cette méthode de contraste puissantes et non destructrices permet de déterminer les structures nanométriques du réseau fibreux d'un hydrogels dans des intervalles de 1 nm à 1 000 nm.

La technique de SAS fournit des informations sur la répartition des fibres, leurs diamètre moyen et la par extension la taille des maillages (185).

### III.5 Analyse de la composition et des interactions moléculaires

Les propriétés et la fonctionnalité des hydrogels sont liées à leur composition chimique, aux interactions entre les fibres de leurs réseaux, ainsi que les interactions des fibres avec l'environnement extérieur. Plusieurs techniques analytiques permettent de définir la **composition moléculaire des hydrogels** et les **interactions entre les molécules gélatrices** à l'origine de la formation des réseaux fibreux.

La structure des hydrogels, et notamment leur composition moléculaire peut être analysée en utilisant la technique de **résonance magnétique nucléaire (RMN)**. Cette technique puissante permet d'analyser pour chaque échantillon un spectre révélant la composition des molécules gélatrices, leur poids moléculaire, l'organisation des molécules entre elles et les interactions mises en jeu (185).

Une autre méthode permettant d'évaluer les interactions moléculaires et la structure du solvant des hydrogels est la **spectroscopie Raman**. L'analyse des spectres Raman fournit des indications sur les interactions hydrophiles et hydrophobes entre molécule gélatrice et solvant (185).

Enfin la **spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier** (*Fourier Transform Infra-Red*, **FTIR**) est une technique efficace pour quantifier la composition chimique par mesure des vibrations infrarouges. La FTIR aide notamment à déterminer la structure chimique des hydrogels en suivant les groupements chimiques spécifiques liés aux différentes liaisons chimiques des réseaux fibreux (185).

### III.6 Imprimabilité des encres et bioencres lors d'une impression par extrusion

Dans la littérature de nombreuses revues et travaux s'intéressent à la conception de nouvelles bioencres. Cependant, peu d'entre eux se penchent précisément sur les caractéristiques et la compréhension des processus d'impression (ou « imprimabilité ») des bioencres. Les capacités d'impression d'une bioencre sont néanmoins cruciales pour la fabrication de tissus complexes avec une grande fidélité et une résolution suffisante dans leur microarchitecture par rapport à leurs modèles natifs.

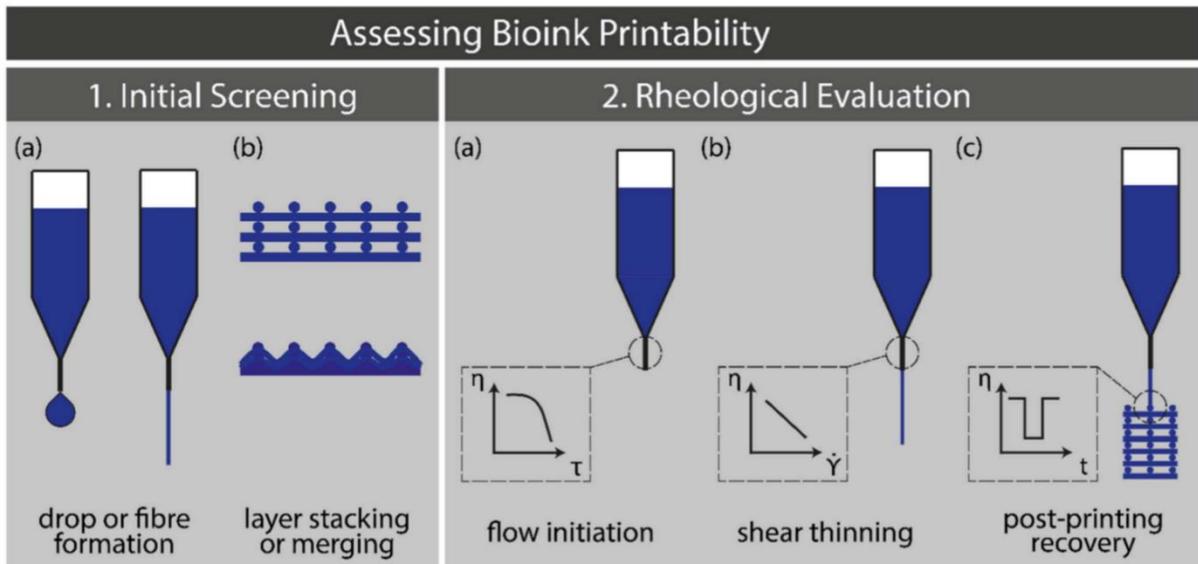
Dans le cas de la bioimpression par extrusion, **l'imprimabilité (ou extrudabilité)** est définie comme la capacité des encres et bioencres à former des filaments continus avec un diamètre contrôlable et une morphologie bien définie. Ainsi, la bioencre doit être suffisamment fluide ou déformable pour être déposée précisément et de façon contrôlée sur les plans spatial et temporel. Sur le plan rhéologique, l'imprimabilité d'une bioencre dépend de ses capacités thixotropes et de son comportement

rhéofluidifiant, permettant à la bioencre de regagner une stabilité après extrusion. C'est pourquoi, l'imprimabilité se caractérise également par la capacité à former des structures en 3D de morphologie, d'intégrité et de fidélité bien définies et stables dans le temps (187).

Afin d'évaluer l'imprimabilité d'une encre, Paxton et al. (188) ont proposé un plan d'étude en deux étapes, illustré par la **Figure 55**. Tout d'abord, une évaluation de la formation de filaments ou de gouttelettes (par une simple extrusion manuelle) et la capacité à former des constructions en 3D sous forme de grilles (en utilisant une bioimprimante) doit être menée. Puis, une étude rhéologique doit permettre de déterminer la contrainte de rupture, le comportement rhéofluidifiant et le recouvrement des propriétés initiales après extrusion de la bioencre. Paxton *et al.* illustrent leur méthode par la comparaison des caractéristiques de quatre encres à base de poloxamère 147, d'alginate, d'un mélange gélatine/alginate et par l'utilisation d'une crème Nivea®. Leurs résultats ont permis d'établir, parmi les encres imprimables, des fenêtres d'imprimabilité en reliant la pression exercée pour l'extrusion et le diamètre de la buse d'extrusion. En dehors des plages d'impression définies, la vitesse d'extrusion de l'imprimante s'avère trop élevée pour obtenir une bonne fidélité d'impression, ou trop faible pour obtenir une vitesse d'impression raisonnable.

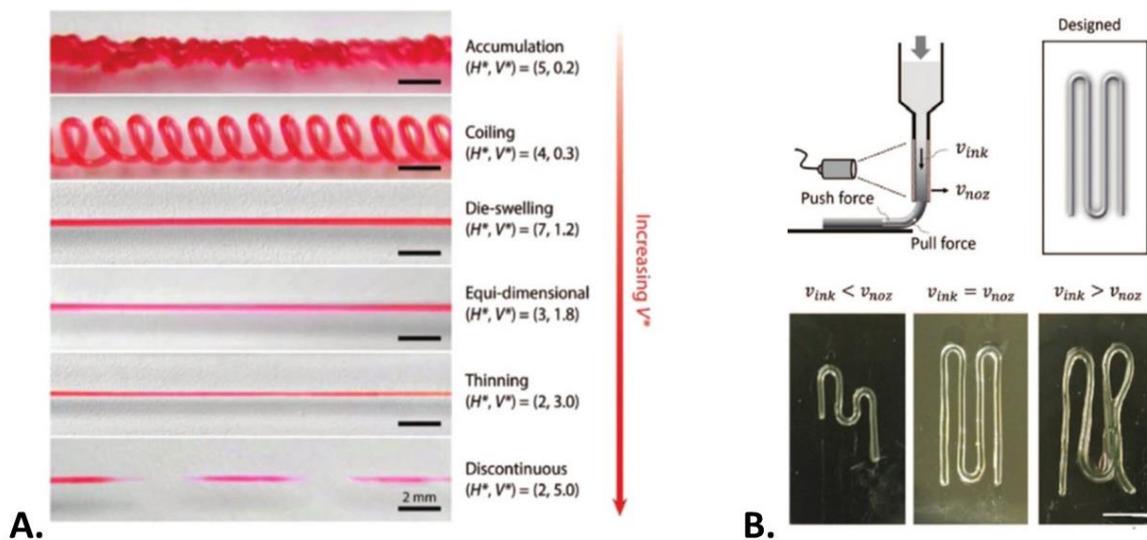
Cette étude met d'une part en évidence l'importance de la **relation entre propriétés rhéologiques et capacités d'extrusion des encres**. Celle-ci est notamment guidée par le choix des biomatériaux et la composition des encres. Il est à noter que la caractérisation des encres et bioencres peut également être réalisée par des approches issues du domaine de la mécanique des fluides. Ainsi, Zhang *et al.* (187) consacrent une partie de leur revue très complète à la définition de plusieurs modèles mathématiques : nombre de Reynolds, de Weber, d'Ohnesorge. Selon l'auteur, la caractérisation des encres selon ces nombres sans dimension, permettrait de pouvoir les classer entre elles selon leurs propriétés d'écoulement, et permettrait d'adapter aux mieux l'ensemble « techniques d'impression/paramètres d'impression/(bio)encre ».

D'autres part, l'imprimabilité des encres et bioencres, leur capacité à former des filaments continus, leur taille, leur forme, la résolution d'impression et la fidélité des formes sont autant de paramètres qui, une fois les caractéristiques rhéologiques prises en compte, peuvent être dépendantes des **paramètres d'impression**. En effet, le diamètre de la buse, la pression exercée, la hauteur entre la buse et la zone de dépôt, la vitesse de déplacement de la buse affectent de manière significative la largeur du filament et la résolution d'impression des structures 3D. Les travaux de Yuk *et al.* (189) et de Ouyang *et al.* (190) illustrent bien la relation entre la modulation des paramètres d'impression et la fidélité d'impression (**Figure 56 A.** et **B.** respectivement). En règle générale, une petite largeur de filament et une résolution d'impression supérieure peuvent être obtenues en diminuant le diamètre de la buse et la pression exercée, tout en ayant la possibilité d'augmenter la hauteur entre buse et zone de dépôt et la vitesse d'impression (187).



**Figure 55: Représentation schématique d'une méthode d'évaluation de l'imprimabilité d'une encre par extrusion**

1. Sélection initiale des formulations en établissant (a) la formation de fibres par opposition à la formation de gouttelettes et (b) les capacités d'empilement de couches successives sans fusion entre les couches. 2. Evaluations rhéologiques permettant de caractériser (a) l'initiation du flux et le point de rupture, (b) les propriétés rhéofluidifiantes afin de prédire le processus d'extrusion et la survie des cellules, et (c) la récupération des propriétés rhéologiques initiales après impression par expression d'un comportement thixotrope. Extrait de Paxton et al. (188).



**Figure 56: Corrélation entre imprimabilité des encres et paramètres d'extrusion**

A. Différents types de filaments obtenus en modulant la hauteur de buse ( $H^*$ ) et la vitesse de la buse ( $V^*$ ), adapté de Yuk et al. (189). B. Fidélité d'impression de filaments extrudés en jouant sur la vitesse d'extrusion ( $v_{ink}$ ) ou la vitesse de déplacement de la buse ( $v_{noz}$ ), adapté de Ouyang et al. (190).

Ainsi, la bioimpression 3D est un domaine en plein essor au sein de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire. De nombreuses techniques et bioencres ont été développées ces dernières années et plusieurs équipes de recherche ont présenté des travaux remarquables. Malgré cela, ces approches ne permettent pas, au jour d'aujourd'hui, d'envisager d'imprimer un tissu ou un organe sur mesure et de l'implanter chez l'homme sur le long cours.

Les bioencres composées d'hydrogels naturels ou synthétiques souffrent de certaines limites (capacités biomimétiques limitées, faible stabilité dans le temps, constructions difficilement imprimables à grande échelle) qui justifient la continuité de recherche sur la mise au point de nouveaux biomatériaux.

Les hydrogels supramoléculaires sont actuellement peu représentés dans le domaine de la bioimpression 3D. Nous avons cependant pu mettre en avant les avantages présentés par cette catégorie d'hydrogels, notamment les familles des NL et GNL. Les capacités de ces molécules à reconstituer un microenvironnement favorable au développement cellulaire, leur biocompatibilité découlant de leur structures bioinspirées ainsi que leurs propriétés mécaniques favorables à leur utilisation dans un processus d'extrusion en font des candidats potentiels pour la bioimpression 3D. C'est pourquoi nous les avons choisis pour les intégrer dans notre projet de formulation d'une bioencre pour bioimpression par extrusion. Les travaux qui ont été menés seront présentés dans la partie ci-après.

# Travaux personnels

# Introduction

Mon sujet de thèse s'inscrit dans le cadre du projet régional **Multiprint**, multidisciplinaire et impliquant plusieurs partenaires (**Figure 57**). Celui-ci a pour but de réaliser la biofabrication d'un **substitut prévascularisé, pour la reconstitution en 3D d'une niche cellulaire**. Cette niche, doit être **favorable à la production de cellules souches hématopoïétiques (CSH)**, dérivées de cellules souches pluripotentes induites (IPSC), et doit pouvoir être **greffée**.

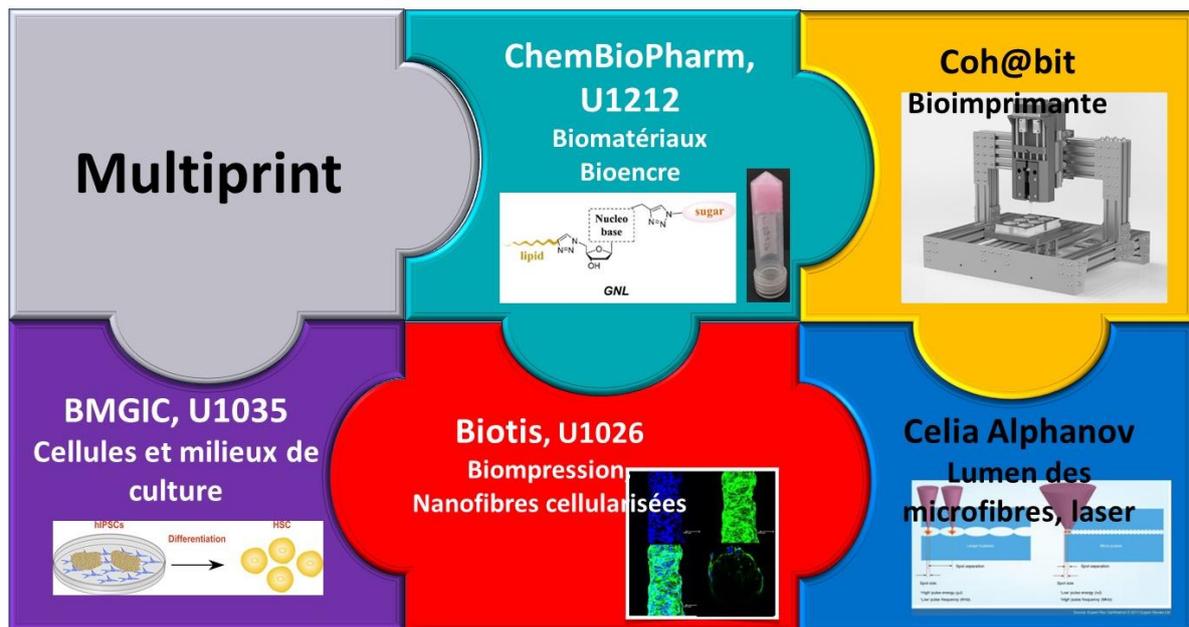


Figure 57: Illustration du projet Multiprint et rôles des différents partenaires

## Projet Multiprint

Le projet Multiprint part du constat que les thérapies utilisant les **cellules souches** sont actuellement considérées comme une voie prometteuse et innovante pour le traitement de diverses maladies. Elles permettent notamment de réparer ou combler des fonctions tissulaires défailantes ou manquantes (191). Dans ce contexte, la découverte des IPSCs offre ainsi de nouvelles possibilités dans le domaine de la greffe de CSH. Cette perspective clinique fait cependant face à un verrou technologique majeur qu'est l'échec de greffe de CSH dérivées d'iPSC (192,193). L'objectif du projet Multiprint est donc de **créer des substituts prévascularisés avec un réseau capillaire interne, reconstituant en 3D une niche favorable à la production de CSH et pouvant être greffés**. La solution proposée est la création de ces substituts par une technique de biofabrication, la **bioimpression par extrusion**.

La création d'une **bioimprimante** personnalisée est confié à la plateforme **Coh@bit** de l'IUT de Bordeaux. Le biomatériau servant de base à la formulation de la **bioencre** doit être développé par l'unité **ChemBioPharm** (Inserm U1212) et doit être favorable à la croissance et aux interactions entre cellules.

Dans un second temps, l'incorporation au sein du matériau, au cours de sa fabrication, de **microfibres cellularisées** doit permettre la production et la délivrance de CSH dérivées d'IPSCs. Les microfibres permettront également la création d'un réseau pseudo-vasculaire sous la forme de capillaires d'une centaine de microns de diamètre. La fabrication des microfibres cellularisées doit être réalisée au sein du laboratoire **Biotis** (Inserm U1026)(194). Cette approche est confortée par des travaux ayant montré qu'une co-culture de cellules souches embryonnaires humaines (hESC) sur des progéniteurs endothéliaux permettrait une reconstitution hématopoïétique (195). De plus, en collaboration avec le laboratoire Biotis, le laboratoire **BMGIC** (Inserm U1035), a obtenu des premiers résultats encourageants en déposant des cellules iPSCs différenciées dans un système 3D en co-culture avec des cellules endothéliales et des cellules mésenchymateuses.

Enfin, l'**usinage intra-volumique** à l'aide d'un laser femtoseconde sera une étape qui permettra de générer la création de réseaux connectés de faible diamètre (50-20 microns) au sein des microfibres cellularisées (196). Ce procédé devra être mis en œuvre sur une station dédiée du laboratoire **CELIA** (UMR 5107, Département Sciences et Technologies) avec le soutien technique et logistique de l'institut **Alphanov**.

En parallèle, le groupe de recherche en économie **GREThA** (UMR 5113, Département Sciences Sociales et Humaines) doit explorer les conditions nouvelles de **brevetabilité** posées par la biofabrication afin de mener une réflexion stratégique avec les différentes équipes impliquées dans le projet Multiprint.

### Projet personnel

Mon sujet de thèse, illustré par la **Figure 58**, s'inscrit au sein de ce vaste projet Multiprint avec pour objectif principal de **développer une encre biologique (bioencre)** pour la bioimpression 3D. Plusieurs formulations de type hydrogels supramoléculaires, à base de molécules amphiphiles bioinspirées, doivent être développées afin d'arriver à l'obtention d'un support bioimprimable le plus adapté pour la croissance cellulaire. Les biomatériaux entrant dans la formulation de l'encre doivent permettre l'adhésion et le maintien des fonctions biologiques et de différenciation de cellules souches ainsi que la maturation du tissu à reconstruire. La **détermination des propriétés mécaniques et rhéologiques** doit permettre de sélectionner les formulations pouvant être imprimées et dont la stabilité devra être préservée après impression afin de garantir la croissance cellulaire. Les hydrogels supramoléculaires combineront également des **nanosystèmes** afin de pouvoir associer en co-formulation des agents nutritifs et/ou médicamenteux favorables à la croissance des cellules de la niche de cellules souches.

De plus les formulations seront développées afin d'être non toxiques, biodégradables et de qualité injectable pour permettre l'implantation ultérieure chez l'homme.

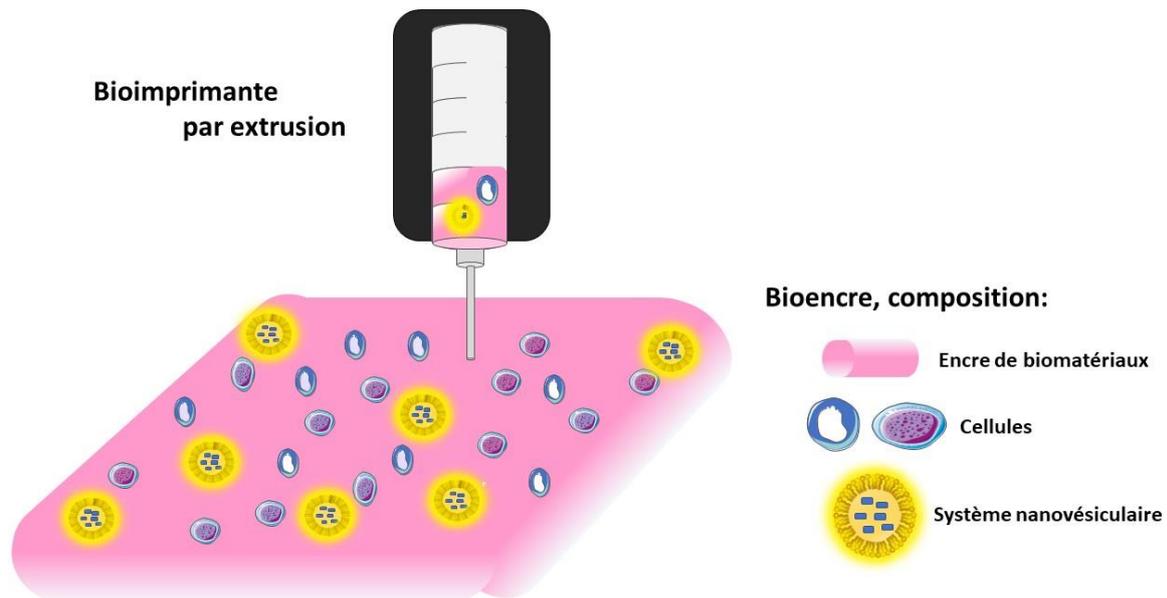


Figure 58: Représentation schématisée du projet de thèse

### Cahier des charges du projet personnel

Plusieurs objectifs ont été fixés afin de mettre au point l'encre de biomatériaux. La formulation de l'encre devra se réaliser à partir d'une **molécule gélifiante amphiphile** (GNL, NL) en utilisant comme milieux aqueux des **milieux de culture** (ex : DMEM). Le protocole de formulation de l'encre devra permettre l'**incorporation ultérieure de cellules** (formulation d'une bioencre) sans interférer avec la viabilité cellulaire (absence de cytotoxicité). Afin de pouvoir être imprimée par le biais d'un processus d'extrusion, l'encre de biomatériaux développée devra posséder des **propriétés rhéologiques de type rhéofluidifiantes et thixotropes**. Cette encre devra pouvoir être extrudée sous forme de **dépôts continus de filaments, prendre en masse rapidement après impression (<5min)** et permettre la superposition de plusieurs couches d'impression les unes sur les autres afin de pouvoir **reproduire des formes en 3D**.

Dans un second temps, la formation d'une bioencre par **addition de cellules** dans l'encre de biomatériaux, devra avoir un **impact limité vis-à-vis des propriétés rhéologiques initiales de l'encre** (propriétés rhéofluidifiantes, thixotropes et cinétique de gélification conservées). Le partenariat avec l'équipe Biotis permettra d'utiliser des cellules gingivales (fibroblastes gingivaux humains (FGh) et cellules souches de la papille apicale (SCAPs)) comme cellules tests à la formulation de la bioencre. Cette preuve de concept sera le socle des travaux qui permettront ensuite l'adaptation de la formulation pour répondre aux objectifs du projet Multiprint : **incorporer des CSH, des cellules souches mésenchymateuses (CSM) et des cellules souches endothéliales (CSE)**. Le processus de

bioimpression par extrusion, ainsi que l'encre de biomatériaux devront **maintenir la viabilité cellulaire** au cours de la phase **de post-impression**. La porosité des constructions imprimées devra permettre la diffusion des nutriments et des produits de dégradation ; **favoriser l'adhésion, la mobilité, les interactions, la prolifération et la différenciation cellulaire**. Un environnement favorable à la création d'une **niche de cellules souches hématopoïétiques** pourra être obtenu à l'aide des propriétés rhéologiques de l'encre de biomatériaux (modules <3 kPa) (197).

Afin d'optimiser le développement des cellules, des **agents nutritifs ou médicamenteux**, contribuant au développement cellulaire, pourront être apportés au sein des constructions. Ceux-ci seront délivrés par des **formes nanovésiculaires**.

Enfin, les **structures** imprimées devront être **manipulables**. La **stabilité** de ces constructions, qui seront incubées à 37°C, devra être **d'au moins 3 semaines**. Afin de réaliser une greffe avec succès, les structures devront être **biocompatibles** et être intégrées aux tissus endogènes **sans générer de réponse immunitaire**. Les constructions devront également être **biodégradables** et leur résorption *in vivo* ne devra pas s'accompagner de relargage de substances cytotoxiques ou de déchets non métabolisables.

# Matériel et Méthode

## I. Matériel

Les milieux aqueux et milieux de culture utilisées dans la formulation des encres et bioencres étaient : Eau Milli-Q® (obtenue par filtration à travers un système PURELAB® ultra ELGA (Veolia Water, Antony, France) avec un filtre 0,22µm); tampon phosphate salin PBS (*phosphate buffered saline*) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); NaCl 0,9% (154 mM) (Fresenius Kabi, Louviers, France); milieux de culture DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) 21885-025, low glucose, GlutaMAX™, pyruvate, Gibco® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis), IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) (Thermo Fisher Scientific) ; StemSpan™ SFEM (*Serum-free medium for culture and expansion of hematopoietic cells*) Q-193122 (StemCell™ Technologies, Vancouver, Canada); *Endothelial cell growth cell medium* MV/MV2 (Promocell®, Heidelberg, Allemagne).

Les matériaux utilisés pour la préparation des liposomes étaient les suivants : Cholestérol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, États-Unis), DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, États-Unis), DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (Sigma-Aldrich), Chloroforme (Sigma-Aldrich).

## II. Formulation d'encres à base d'hydrogels supramoléculaires

### II.1 GNL et NL

Les GNL et NL sélectionnés comme candidats pour la formulation d'une encre de biomatériaux étaient synthétisés par l'équipe de chimistes de l'unité ChemBioPharm. Leur synthèse était basée sur des approches de réaction double-clic. Les différents protocoles sont rapportés dans les publications mises en référence ci-dessous.

GNL :

- Glycosyl-nucleosyl-fluorinated, **GNF** (109).
- Glycoside nucléolipides bola amphiphiles bis urea, **GNBA-BU** (116)
- Glycoside nucléolipides bola amphiphiles bis ether, **GNBA-BE** (108)

NL :

- Thymidine-3'-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate), **diC<sub>16</sub>dT** (101)
- Cytidine (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate) **diC<sub>16</sub>dC** (105)

- Guanosine (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate) **diC<sub>16</sub>dG** (105)

## II.2 Protocole de formation des encres

La poudre de GNL ou de NL (GNL/NL) précisément pesée était mélangée à un milieu aqueux dans un tube à centrifuger de 2ml (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). La concentration en GNL/NL était exprimée en % correspondant à une concentration massique (masse du GNL ou NL /volume de milieu aqueux). Les milieux aqueux utilisés étaient : eau Milli-Q®, PBS, NaCl 0,9% (154 mM), DMEM, StemSpan (**Figure 59, étape 1**).

Le milieu dit « Stemspan complet » (StemspanC) était un milieu préparé par l'unité U1035. Il contenait, en plus du Stemspan, des cytokines et hormones (*Stem Cell Factor* (SCF), *Fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3L), Thrombopoïétine (TPO)), des antibiotiques et antifongiques (pénicilline, streptomycine, amphotéricine, ciprofloxacine), des molécules permettant aux cellules de rester à l'état de cellules souches (SR1 (Stemregenin 1) et VPA (acide valproïque)), des interleukines (IL3, IL6), de la vitamine C. Lorsque cela est précisé, les milieux contenaient du sérum de veau fœtal (SVF) (CVFSVF00-01, EURO BIO, Les Ulis, France). Un des mélanges de milieux aqueux utilisé était le mélange de DMEM et de NaCl 0,9% dans un rapport 70/30 (V/V). Ce mélange de DMEM enrichi en NaCl est nommé DMEM@+ dans ce manuscrit. Son équivalent formé à partir de StemspanC est nommé StemspanC@+. Un mélange similaire mais dont la proportion en milieu de culture était composée de 50% de DMEM, 25% d'IMDM, 25 de StemspanC était nommé D<sub>50</sub>SC<sub>25</sub>I<sub>25</sub>@+.

Les mélanges GNL/NL et milieux aqueux étaient réalisés sous hotte à flux d'air laminaire. Le mélange était agité à l'aide d'un vortex puis chauffé à l'aide d'un Thermomixer® compact (5350, Eppendorf). Durant cette étape, la température de chauffage, la vitesse d'agitation et le temps étaient contrôlés. La solubilité de la poudre de GNL/NL était ensuite inspectée visuellement (**Figure 59, étape 2**). Puis, l'échantillon était laissé au repos à température ambiante (20-25°C).

La gélification était contrôlée par un test d'inversion de l'échantillon (**Figure 59, étape 3**). Pour cela, le tube à centrifuger était retourné. La gélification était considérée comme satisfaisante si la substance ne coulait pas sous l'effet de son propre poids, ainsi que sous l'action d'une agitation manuelle. L'intervalle de temps entre la fin du cycle de chauffage et la réussite du test d'inversion permettait de déterminer la cinétique de gélification. Si la solubilisation, ou la gélification d'un échantillon de GNL/NL n'était pas effective, celui-ci pouvait être soumis à: une ou plusieurs nouvelles étapes de chauffage ; un passage aux ultrasons dans un bain (FB11205, Fisherbrand™ Ultrasonic Cleaner, Thermo Fisher Scientific) (fréq : 37GHz, T°: 20-37°C); l'utilisation d'une sonde à ultrasons (7186, Vibra-Cell™ SONICS®, Newtown, Massachusetts, États-Unis) (Amplitude 20%); un dépôt au réfrigérateur (4-8°C) pendant un temps donné (**Figure 59, étape 4**).

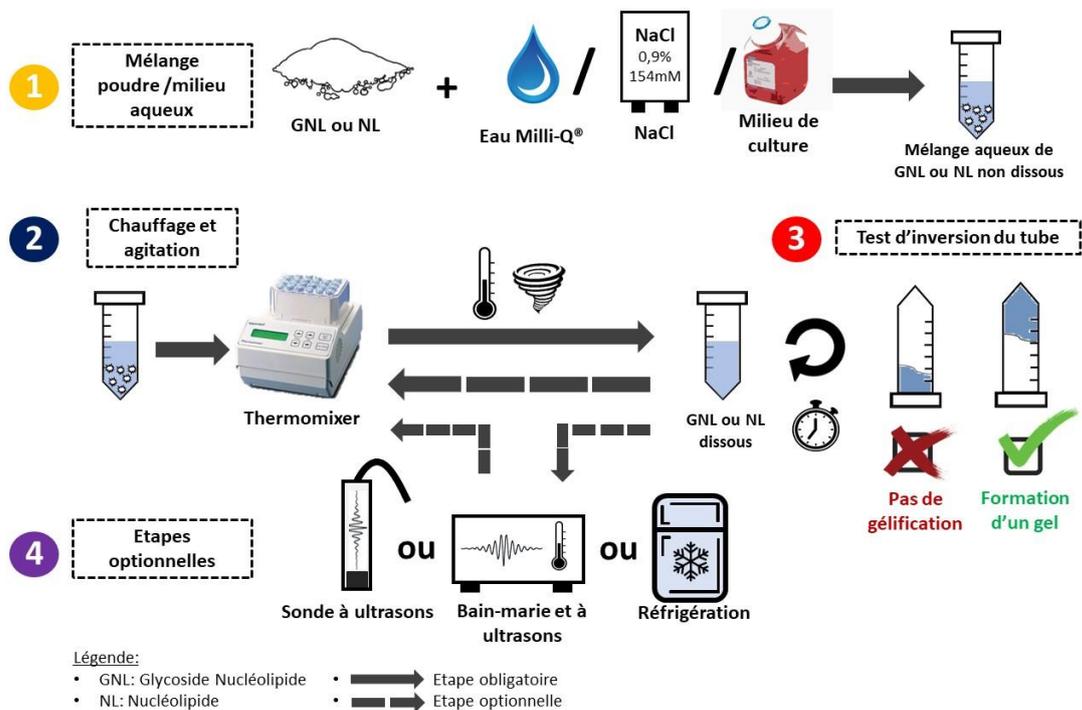


Figure 59: Protocole de formation des hydrogels

### III. Formulation des bioencres

#### III.1 Cellules

L'ensemble des étapes de manipulation d'extraction des cellules utilisées dans cette étude, ainsi que leur culture, ont été réalisées par le laboratoire Biotis.

##### III.1.1 Provenance des cellules

Le laboratoire Biotis possède une expertise quant à l'étude des cellules provenant de la sphère buccale ; c'est pourquoi les cellules utilisées dans cette étude étaient principalement des fibroblastes gingivaux humains (FGh) et des cellules souches de la papille apicale (*stem cell from the apical papilla*, SCAPs). Les FGh sont les constituants majoritaires du tissu conjonctif gingival et représentent 65% des cellules de ce tissu. Ils sont au cœur des phénomènes de réparation tissulaire. Après une lésion, sous l'influence de conditions inflammatoires, ils sont capable de proliférer, migrer et remodeler la MEC et entraîner les mécanismes impliquées dans la cicatrisation du tissu gingival (198). Les SCAPs sont des cellules souches mésenchymateuses de la papille apicale, un tissu mou attaché aux apex des dents permanentes immatures (199).

Les FGh et les SCAPs étaient isolés chez des patients opérés au CHU de Bordeaux. Conformément à la déclaration d'Helsinki de 1975, tous les patients ont donné leur consentement oral éclairé et nié avoir pris récemment des médicaments susceptibles d'affecter le métabolisme du tissu conjonctif. Les

protocoles étaient approuvés par le comité institutionnel pour la protection des sujets humains (comité d'éthique local du CHU de Bordeaux) et dans le cadre de la déclaration pour la conservation et la préparation des éléments du corps humain pour la recherche scientifique numéro DC 2008-412 (ministère de l'Enseignement supérieur français, recherche et innovation).

### III.1.2 Extraction des FGh et des SCAPs

#### **FGh**

Les déchets chirurgicaux de gencive étaient collectés pendant la chirurgie chez des patients en bonne santé, non-fumeurs et sans antécédents de parodontite (n = 4). L'épithélium a été retiré et le tissu conjonctif restant a été coupé en petits fragments, transféré et cultivé dans des flacons de culture cellulaire (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) dans du DMEM complété avec 20% de SVF, 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 2,5 µg/ml d'amphotéricine B (Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Le milieu a été changé tous les 3 jours. Après le premier passage (\*), les FGh étaient cultivés dans du DMEM avec 10% de SVF et utilisés des passages 3 à 5.

*(\*) un passage de cellules correspond à un traitement par trypsine et un changement de boîte de culture.*

#### **SCAPs**

Les troisièmes molaires fraîchement extraites étaient stockées dans du milieu essentiel minimum alpha (alpha-MEM) additionné de 20% de SVF et de pénicilline (100 U/ml) / streptomycine (10µg/ml) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Les papilles apicales dentaires étaient digérées dans un mélange de 3 mg/ml de collagénase et de 4 mg/ml de dispase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, États-Unis) pendant une heure à 37°C. La suspension cellulaire résultante a été filtrée et cultivée dans des flacons de culture (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Le milieu a été changé tous les deux jours jusqu'à ce que les cellules atteignent la confluence. Après le premier passage, les SCAPs étaient cultivés dans de l'alpha-MEM à 10% de SVF et utilisés des passages 3 à 7.

## III.2 Culture cellulaire

Les cellules utilisées dans cette étude étaient cultivées dans plusieurs milieux de culture : DMEM, IMDM ; StemspanC.

Le mélange utilisé lors de l'incubation des cellules en enceinte thermostatée (37°C ± 0,5°C, 5% CO<sub>2</sub>) en phase de post impression était le suivant : DMEM, 10% SVF, 100UI/ml pénicilline, 100µg/ml de streptomycine, 2,5µl d'amphotéricine B. Les milieux étaient changés tous les trois jours.

### III.3 Protocole de formation des bioencres

Pour préparer la bioencre, des cellules FGh ou SCAPs étaient mélangées à une encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ préparée au préalable. Pour cela, l'encre était réchauffée à une température légèrement au-dessus de sa température sol-gel de 39°C pour la rendre plus liquide. En parallèle, les FGh ou les SCAPs étaient trypsinées, comptées, centrifugées, remis en suspension dans l'encre puis homogénéisées à l'aide d'une seringue à déplacement positif, pour obtenir une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/ml. La bioencre ainsi formée était disposée en seringue de 2ml avant que sa gélification ne soit complète. L'ensemble de ces manipulations était réalisé dans un poste de sécurité microbiologique de type II.

## IV. Caractérisation des encres et bioencres

### IV.1 Détermination des propriétés rhéologiques

Le rhéomètre utilisé était un rhéomètre Kinexus Pro +, couplé au logiciel rSpace (Malvern Panalytical, Malvern, Royaume-Uni) (200). Les mesures rhéologiques réalisées au cours de cette étude étaient : recherche du domaine linéaire de viscoélasticité, détermination de la force du gel, recherche de propriétés thixotropes, détermination de la température sol-gel et détermination de la viscosité. Les échantillons étaient déposés sur la géométrie inférieure (PLS55 C0227 SS, Malvern Panalytical) et une géométrie de type cône plan a été utilisée (SR3703 SS, Malvern Panalytical) (diamètre 20mm, angle 1°). Dans le cas où plusieurs mesures étaient réalisées sur le même dépôt un délai d'au moins 30 min était respecté entre chaque mesure ou type de mesure pour permettre au gel de récupérer son état initial. Chaque mesure a été répétée 3 fois au minimum, sauf précision contraire.

- **Recherche du domaine linéaire de viscoélasticité LVER.**

Durant cette expérience, le domaine linéaire de viscoélasticité, c'est-à-dire le domaine d'amplitude de déformation (exprimée en %) au cours duquel les modules élastiques ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) présentaient une stabilité, a été établi. Le pourcentage de déformation variait d'une valeur de 0,001 % à 100% à température fixe de 25°C ou 37°C et la fréquence était de 6,283 rad/s (1Hz). La contrainte de rupture était déterminée graphiquement comme le point d'intersection entre deux droites de régression, celle correspondant au plateau de la LVER et celle correspondant à la région de chute des modules élastiques et visqueux. La valeur à laquelle  $G'$  et  $G''$  se croisaient était également relevée. Une à trois mesures successives étaient réalisées sur le même dépôt.

- **Détermination des modules  $G'$  et  $G''$  en fonction de la fréquence angulaire**

L'amplitude (ou taux) de déformation était fixée à 0,1%, valeur incluse dans le domaine linéaire pour tous les hydrogels testés. La température était fixée à 25°C ou 37°C, et la fréquence angulaire variait entre 0,6283-62,83 rad/s (0,1Hz-10Hz). Trois mesures successives étaient réalisées sur le même dépôt.

- **Evaluation des propriétés thixotropes**

La détermination des propriétés thixotropes consistait en un suivi des modules  $G'$  et  $G''$  en fonction du temps, au cours duquel un enchaînement de séquences de déstructuration et de restructuration (variation de l'amplitude de déformation) étaient appliqués.

*N.B. : Un gel, présentant un caractère solide ( $G' > G''$ ) sous une contrainte initiale faible sera déstructuré par application d'une contrainte importante et passera à un état liquide ( $G' < G''$ ). L'application de nouveau, de la contrainte initiale permettra de récupérer un état solide ( $G' > G''$ ).*

La séquence appliquée durant les manipulations était : 0,1% pendant 10min ; 15 à 30% pendant 2min ; puis 0,1% pendant 30min à 1h. Au cours de cette séquence, la valeur de  $G'$  et  $G''$  avant application de la contrainte forte était relevée, ainsi que le temps nécessaire pour la récupération des modules avant contrainte avec une tolérance de  $\pm 5\%$ . Une à trois mesures successives étaient réalisées sur le même dépôt.

- **Détermination de la température sol-gel**

Les modules  $G'$  et  $G''$  étaient déterminés à une fréquence de 6,283 rad/s et une contrainte de 1Pa en fonction de l'augmentation progressive de la température (25°C-90°C, vitesse : 2°C/min). La mesure était réalisée sur un dépôt. A la fin de l'expérience, l'échantillon étant détruit, il n'était pas possible de renouveler des mesures sur le même dépôt. Les mesures étaient réalisées une fois.

- **Mesure de viscosité**

La détermination de la viscosité des encres était réalisée selon le protocole suivant : application d'une vitesse de cisaillement de 30 s<sup>-1</sup> sur l'échantillon pendant 15min, puis mesure de la viscosité ( $\eta$ ) en fonction de la vitesse de cisaillement (variation de 0.1s<sup>-1</sup>- 500s<sup>-1</sup>). Les mesures étaient réalisées à 25°C et 37°C. Trois mesures successives étaient réalisées sur le même dépôt.

## IV.2 Osmolalité

L'osmolalité de différentes solutions était évaluée à l'aide de l'osmomètre Advanced Instruments 3250 (ThermoFisher Scientific) basé sur le principe de mesure de l'abaissement du point de congélation.

L'osmolalité est la mesure du nombre d'osmoles de soluté par kilogramme de solvant (équation **E13**). L'osmole (Osm) correspond à la quantité de particules (en moles), osmotiquement actives, et dissoutes en solution.

$$\mathbf{E13} : \text{Osmolalité} = \varnothing nC = \frac{\text{osmole}}{\text{kg (solvant)}}$$

Où  $\varnothing$  est le coefficient osmotique, qui tient compte du degré de dissociation moléculaire ;  $n$  est le nombre de particules dans lesquelles une molécule peut se dissocier ;  $C$  est la concentration molaire de la solution.

Pour les substances qui maintiennent leurs structures moléculaires lorsqu'elles sont dissoutes, l'osmolarité et la molarité sont identiques (ex : Glucose). Dans le cas d'une solution molaire pure de NaCl, l'osmolarité sera de 2 osmoles (1 osmole pour l'ion  $\text{Na}^+$ , 1 osmole pour l'ion  $\text{Cl}^-$ ) (201).

*N.B. La concentration osmotique, ou osmolarité, correspond au nombre d'osmoles par litre de solution.*

### IV.3 Mesure du pH

Le pH des gels était mesuré à l'aide d'un pH-mètre FiveEasy™ (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, États-Unis) et d'une sonde de pH (1171-6908, ThermoFisher). L'étalonnage était réalisé quotidiennement avec des solutions de calibration à pH 4,0 et 7,0. Trois mesures successives étaient réalisées sur chaque échantillon avec un lavage de la sonde à l'eau distillée entre chaque mesure.

### IV.4 Microscopie électronique en transmission

Les expériences de TEM étaient réalisées avec un microscope Hitachi H7650 (Hitachi Ltd., Chiyoda, Tokyo, Japon) associé à une caméra ORIUS SC1000 11MPX (GATAN, Pleasanton, États-Unis) gérée par le logiciel Digital Micrograph (GATAN)). Les échantillons (10  $\mu\text{L}$ ) étaient placés sur des grilles de cuivre revêtues de carbone, à température ambiante. L'excès était éliminé et les échantillons étaient séchés pendant 10 minutes. Avant l'imagerie TEM, les grilles étaient contrastées négativement à l'aide d'une solution de lanthanides Uranyless (Delta Microscopies, Mauressac France).

### IV.5 Test d'extrusion manuel et par pousse-seringue

L'extrusion manuelle était réalisée à l'aide de seringues de 2ml (307727, BD Emerald™, Franklin Lakes, New Jersey, États-Unis), et d'aiguilles de 21 gauges (Terumo® Agani™, Tokyo, Japon). La solution de GNL ou NL était aspirée en seringue après chauffage, ou alternativement après liquéfaction d'un gel préformé. Après le temps de reprise dans la seringue, le gel était extrudé à travers l'aiguille et injecté dans un flacon de verre. Le flacon était ensuite retourné pour réaliser un test d'inversion (cf **Figure 59**, page 114) et la cinétique de gélification était évaluée.

En complément des tests manuels et afin d'appliquer un débit contrôlé, les tests d'extrusion étaient également réalisés à l'aide d'un pousse seringue électrique R-99 (Razel Scientific Instrument, Fairfax, États-Unis). Un débit d'extrusion de 14,5ml/h, identique à celui de la bioimprimante, était utilisé.

## IV.6 Test d'extrusion par bioimprimante

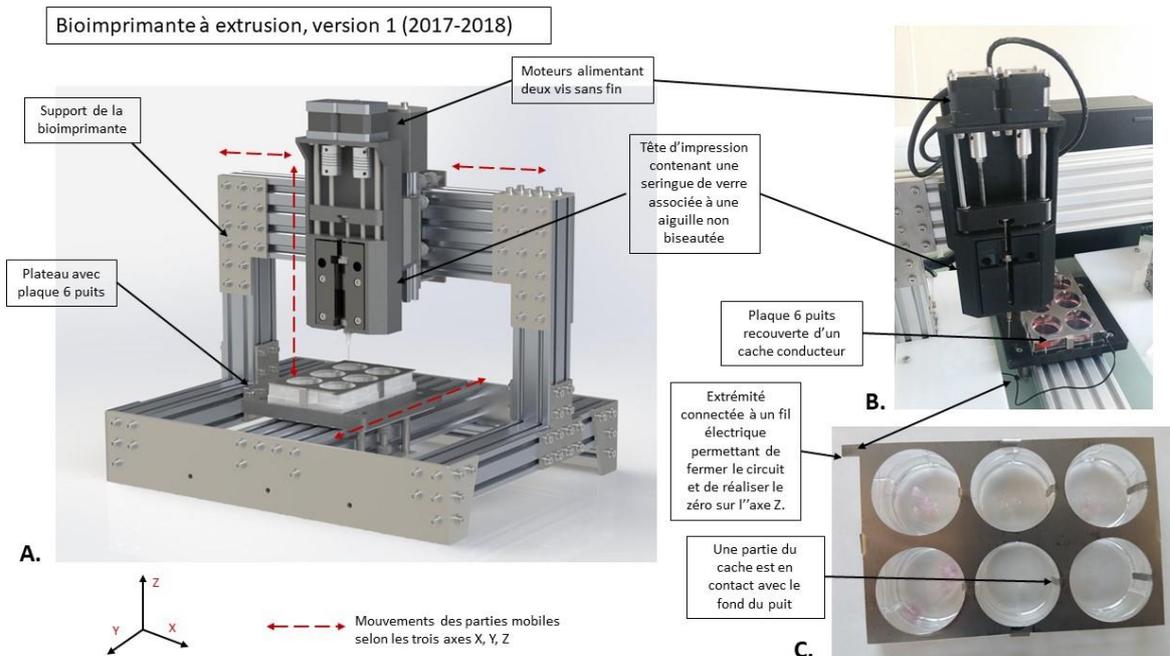
### IV.6.1 Première version de la bioimprimante et principe d'utilisation

La bioimprimante utilisée a été développée spécifiquement pour le projet Multiprint par une équipe de la plateforme Coh@bit de l'IUT de Bordeaux. Il s'agit d'une bioimprimante 3D à extrusion composée de la manière suivante: un support métallique forme le corps de la bioimprimante ; sur ce corps se meuvent la tête d'impression (mouvement sur les axes X et Z) et le plateau permettant d'accueillir des plaques de culture cellulaire de type « plaques 6 puits » (mouvement sur l'axe Y) (**Figure 60**) ; un bloc d'alimentation et une liaison à un système informatique permettent la connexion de la bioimprimante.

Sur la tête d'impression, une loge permet de fixer des seringues de verre de 2ml (Fortuna®, Optima) (**Figure 60 B.**). L'extrusion du composant de la seringue est réalisée par deux moteurs alimentant deux vis sans fin qui vont exercer une pression sur le piston. Les aiguilles ont une extrémité non piquante (non biseautée). Les aiguilles utilisées sont des aiguilles 21 gauges (Terumo® Agani™) dont le biseau était découpé à l'aide d'une scie circulaire de précision.

L'extrusion des bioencres a été réalisée dans des plaques de culture cellulaire 6 puits (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne). Les fonds de puits étaient préalablement recouverts d'un milieu conducteur, constitué d'agarose à 2% reconstituée dans du PBS, afin de pouvoir réaliser le zéro sur l'axe Z. Le réglage de ce paramètre est en effet basé sur la fermeture d'un circuit électrique lors du contact entre l'aiguille et le gel d'agarose (**Figure 60 B. et C.**).

L'imprimante était reliée au logiciel BioPrinter® développé par la plateforme Coh@bit. Le modèle d'impression de type CAD était conçu à l'aide du logiciel SketchUp® sous forme de fichier de type .stl et définissait la forme et la taille des modèles d'impression 3D. Chaque fichier intégrait le découpage de la forme, couche par couche, sur un modèle en 2D (**Figure 61 A.**). Le modèle d'impression principalement utilisé était une grille à 9 pores de dimensions 12x12x5mm (**Figure 62**). D'autres fichiers .stl de mêmes dimensions ont également été utilisés au cours de ce projet : grille de 16 pores et un modèle cubique plein. Parmi les paramètres à régler, le volume de la seringue (en ml) et le diamètre interne (en mm) de l'aiguille non biseautée étaient sélectionnés. La hauteur des couches (**h**) était exprimée en % du diamètre interne de l'aiguille (**d**). Ce paramètre permettait de régler la hauteur



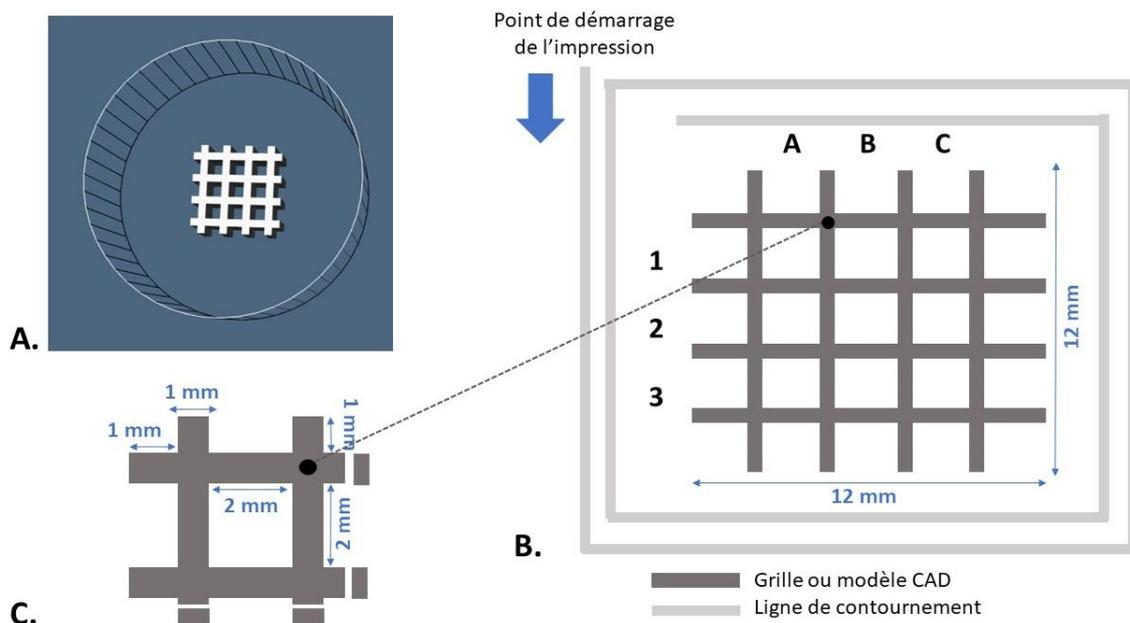
**Figure 60: Première version de la bioimprimante à extrusion**

**A.** Modèle informatique de la bioimprimante 3D. **B.** Photo de la tête d'impression montrant une seringue de verre de 2ml dans sa loge. **C.** La plaque 6 puits est recouverte d'un cache métallique plongeant dans chaque puit. Cette plaque est reliée, par un système électrique filaire, à la tête d'impression et permet de déterminer précisément le point zéro d'impression sur l'axe Z.

des constructions en fonction du diamètre du cylindre d'hydrogel extrudé (**dg1**) (dépendant des propriétés d'expansion volumique ou de rétractation du gel) et des phénomènes d'arasage du dépôt (**Figure 62**). La largeur d'extrusion des couches (exprimé en % de la hauteur de couche) était définie sur un principe similaire à la sélection de la hauteur des couches. Une vitesse d'impression des couches (mm/s) était sélectionnée. Le coefficient d'extrusion (exprimé en %) permettait d'ajuster en temps réel l'impression de l'encre observée et sa fluidité par rapport aux paramètres théoriques enregistrés (volume de la seringue, diamètre interne de l'aiguille et hauteur de la couche). Des lignes de contournement autour de la forme à imprimer (exprimées en nombre) pouvaient être ajoutées. Elles permettaient de réaliser une purge de l'aiguille afin de démarrer l'impression de la grille avec un dépôt continu d'encre. Enfin, le temps de pause entre deux impressions de couches était défini.

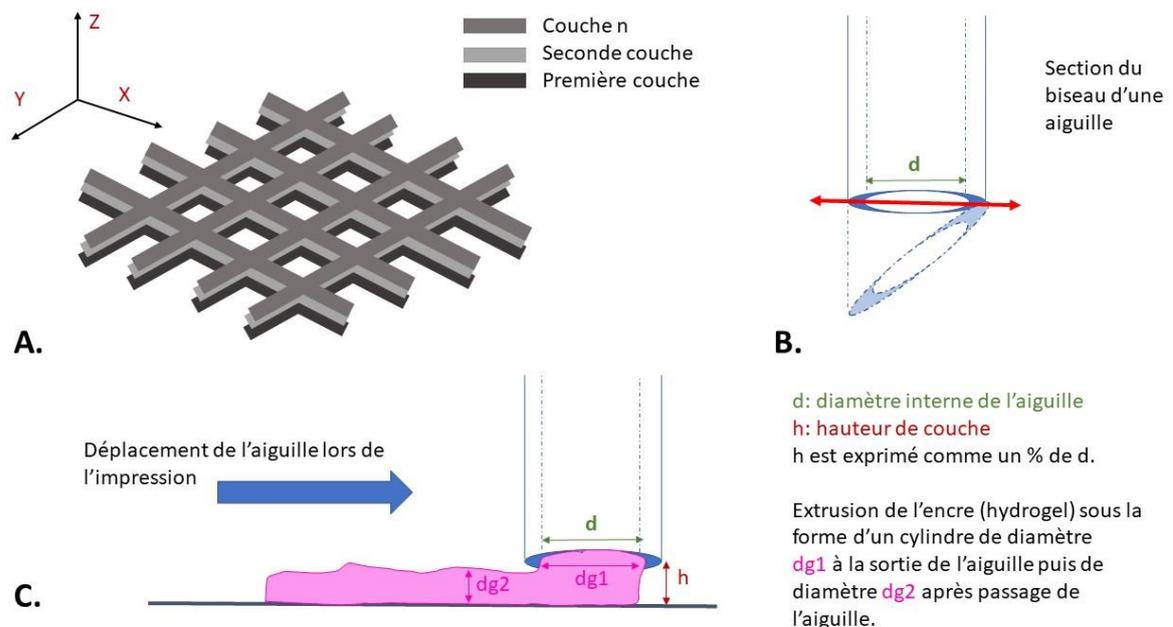
Les essais de bioimpression ont été réalisés à température ambiante, dans une pièce à atmosphère non contrôlée mais climatisée.

La bioimprimante dans sa première version été livrée à partir de janvier 2017 et est restée en fonctionnement jusqu'en novembre 2018. Elle a permis la réalisation d'expérimentations réalisées pour la sélection des molécules gélatrices (Partie 1) et la bioimpression de fibroblastes gingivaux (Partie 2).



**Figure 61: Représentation schématique des grilles imprimées**

**A.** Modèle CAD d'une grille à 9 pores carrés de dimensions 12x12x5mm. La grille est ici représentée dans le puit dans lequel elle sera imprimée (cylindre hachuré). **B.** Représentation schématique d'une grille sur un plan en 2D dont l'impression est précédée de 2 contournements. La grille est formée de brins horizontaux et verticaux d'une longueur de 12mm. La dénomination des pores est réalisée en associant une lettre et un chiffre (ex : A1) représentant respectivement les colonnes et les lignes des grilles. **C.** Agrandissement du pore A1 dont les dimensions internes sont de 2x2mm. Les brins ont une épaisseur de 1mm et dépassent du pore d'une longueur de 1mm.



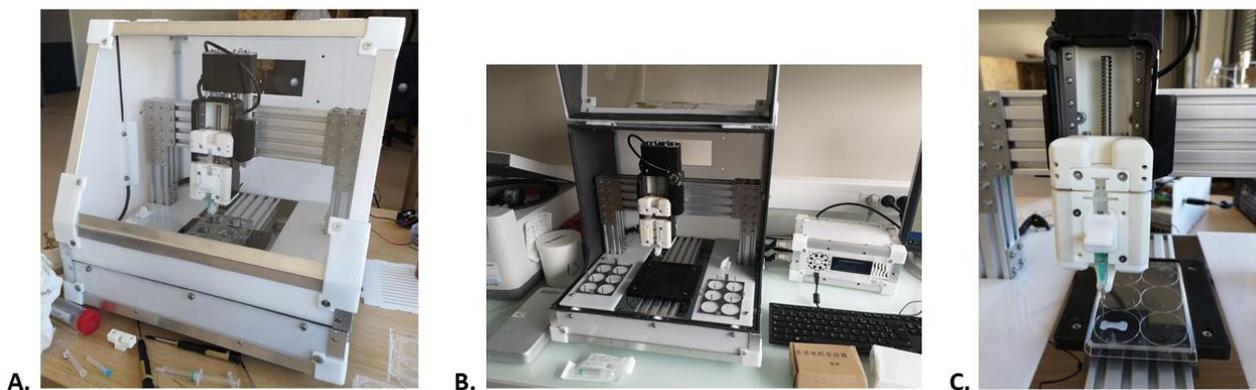
**Figure 62: Hauteur des couches imprimées**

Représentations schématiques d'une : **A.** Construction 3D en forme de grille avec 3 couches superposées les unes sur les autres. **B.** Coupe du biseau d'une aiguille de diamètre  $d$  afin d'éviter les phénomènes d'arasage. **C.** Extrusion d'une encre et illustration de la hauteur des couches des impressions.

#### IV.6.2 Seconde version de la bioimprimante

Après une année d'utilisation, plusieurs améliorations de la bioimprimante et du logiciel ont été demandées à l'équipe Coh@bit dont voici les principales. La motorisation a été entièrement remplacée suite à des problèmes de décalage des vis sans fin et de blocage des moteurs. Les seringues de verre étant trop fragiles, la tête d'impression a été remplacée pour pouvoir accueillir plusieurs formats de seringues Luer-Lock à usage unique en plastique (Seringue 3 pièces 2ml et 5ml, réf 307727 et 307731 respectivement, BD Emerald™). Une enceinte thermostatée a été ajoutée afin de pouvoir réaliser une impression à température contrôlée et notamment à 37°C (**Figure 63**). Les modifications du logiciel ont permis principalement de réaliser des purges de l'aiguille en dehors de l'impression et de pouvoir réaliser des pauses au cours de l'impression. Cette seconde version a été opérationnelle à partir de la fin du mois d'avril 2019 et a permis la réalisation d'expérimentations reportées dans la Partie 2 de ce manuscrit.

Bioimprimante à extrusion, version 2 (2019)



**Figure 63:** Seconde version de la bioimprimante à extrusion

*A. Enceinte thermostatée (fermée) entourant l'imprimante. B. Enceinte thermostatée ouverte et bloc d'alimentation (à droite). C. Nouvelle tête d'impression permettant d'utiliser des seringues Luer-Lock en plastique à usage unique.*

#### IV.6.3 Paramètres d'impression utilisés.

Les paramètres d'impression étaient variés pour permettre d'adapter la qualité d'impression aux capacités d'extrusion des encres testées. Les paramètres majoritairement utilisés et ayant permis d'obtenir les meilleurs résultats d'impression étaient les suivants :

- Aiguille de 21G, diamètre interne de 0,55mm
- Hauteur de la 1ère couche : 70%
- Hauteur des autres couches : 70%
- Vitesse d'impression 8mm/s

- Vitesse d'impression de la 1ère couche : 8mm/s
- Coefficient d'extrusion : 200%
- Largeur d'extrusion de la 1ère couche (% de hauteur de couche) : 100%
- Largeur d'extrusion (% de hauteur de couche) : 100%
- Contournements : 2
- Pausés entre les couches : manuelles (de 2 à 5min)

#### IV.7 Caractérisation des grilles imprimées

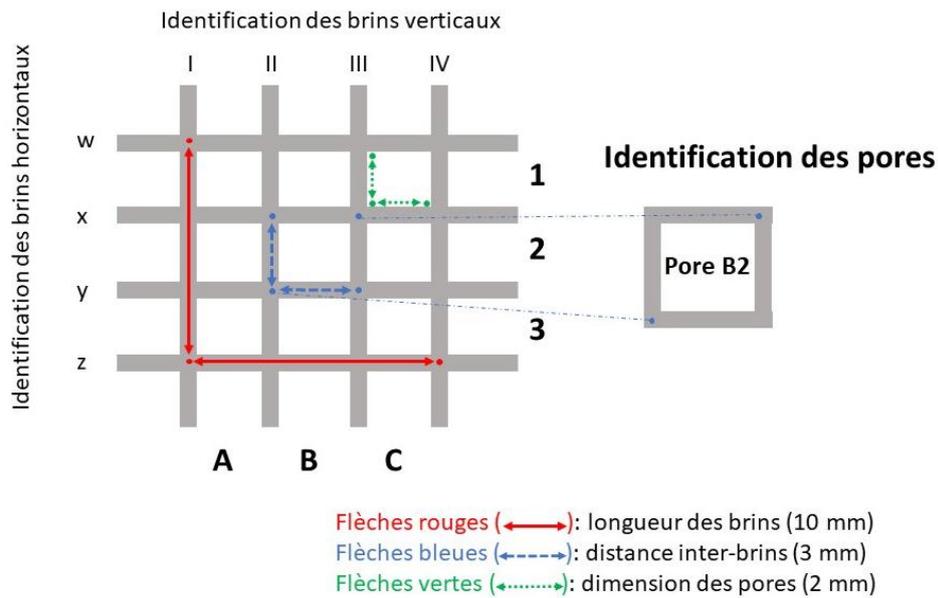
Les grilles imprimées étaient observées à l'aide d'un stéréomicroscope modulaire (MZ10F, Leica Microsystems, Allemagne) couplé à une suite Leica Application (V4.9.0, Leica Microsystems, Allemagne) à un grossissement de x0,8. La distance entre les brins verticaux et horizontaux de chaque grille (**Figure 64**) était déterminée à l'aide du logiciel ImageJ (1.52o, *National Institute of Health*, États-Unis, Java 1.8.0\_112). Les grilles étaient également observées à l'aide d'un microscope inversé manuel (DMI 3000B, Leica microsystems, Allemagne) couplé au logiciel Leica Application Suite (V3.8.0, Leica Microsystems, Allemagne) à un grossissement de x2,5. Les surfaces des couches supérieures et inférieures de chaque pore ont ensuite été déterminées avec le logiciel Leica.

La porosité des grilles  $P_t$  (exprimée en pourcentage) était calculée à l'aide de l'équation **E14**, où  $V_p$  ( $\text{mm}^3$ ) représente le volume de pores mesuré  $V_t$  ( $\text{mm}^3$ ) représente le volume théorique des pores. Les pores de forme sphérique étaient assimilés à des cônes tronqués et l'équation **E15** était utilisée pour déterminer leurs volumes ( $V_p$ ) ( $h$  est la hauteur du réseau (mm), et  $R_1$  et  $R_2$  sont respectivement le rayon des couches supérieure et inférieure (mm)) (**Figure 65**). Le volume théorique des pores  $V_t$  ( $\text{mm}^3$ ) de forme parallélépipédique était calculé à l'aide de l'équation **E16** ( $h$  est la hauteur du réseau (mm),  $L$  est la longueur (mm) et  $l$  est la largeur (mm) du pore). Le réseau était placé sur une lame de microscope et la hauteur était mesurée à l'aide d'un pied à coulisse numérique (Halmart RS PRO, 150 mm, 841-2518) avec une précision de 10  $\mu\text{m}$ . Enfin, une analyse statistique était réalisée sur ces données.

$$\mathbf{E14} \quad P_t = \frac{V_p}{V_t} \times 100$$

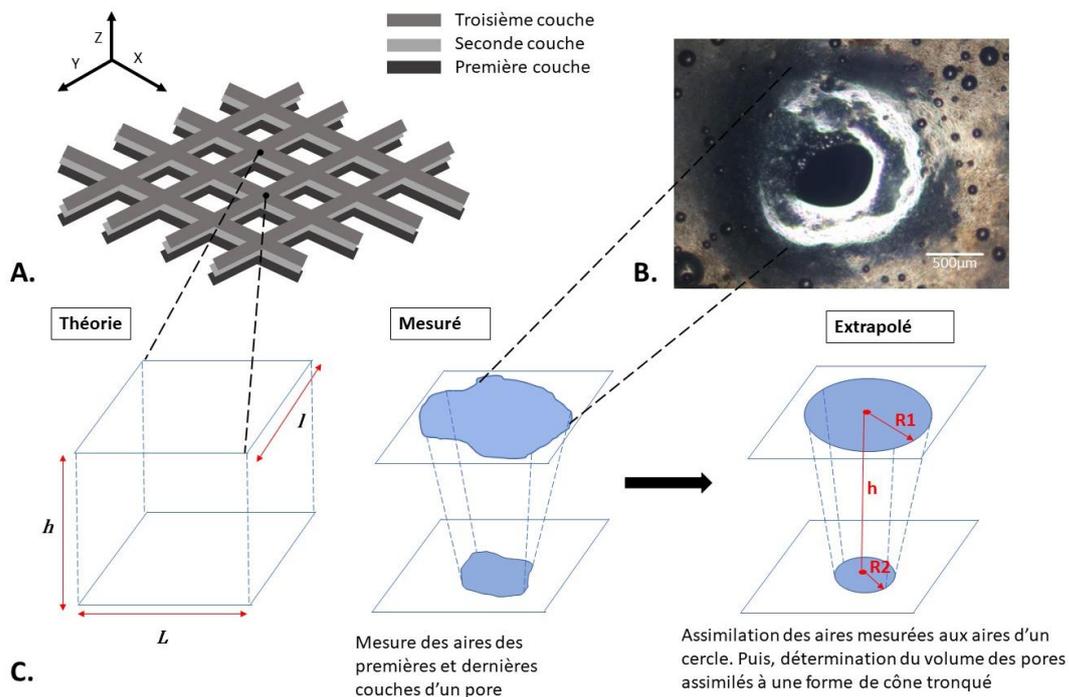
$$\mathbf{E15} \quad V_p = h \times \frac{\pi}{3} \times (R_1^2 + R_2^2 + R_1 \times R_2)$$

$$\mathbf{E16} \quad V_t = h \times L \times l$$



**Figure 64: Détermination de la longueur des brins, de la distance inter-brins et de la dimension des pores**

Les brins verticaux et horizontaux sont désignés par un chiffre romain (I; II; III; IV) et une lettre minuscule (w; x; y; z), respectivement. Les pores sont désignés par l'association d'une lettre majuscule et d'un chiffre arabe (par exemple, pore A.1; B.2; C.3...). Les distances théoriques des brins et les dimensions des pores sont spécifiées entre parenthèses.



**Figure 65: Détermination du volume des pores**

**A.** Représentation schématique d'une grille imprimée à trois couches. **B.** Image microscopique d'un pore d'un réseau à trois couches (grossissement x 2,5). **C.** Processus utilisé pour déterminer le volume des pores. 1) Le volume théorique des pores est calculé à l'aide des paramètres du fichier CAD. 2) La superficie des premières et troisièmes couches des grilles imprimées est déterminée à l'aide du logiciel Leica. 3) Ensuite, ces aires sont assimilées à l'aire d'un cercle. Le volume des pores est calculé à l'aide de la formule E17. Le volume théorique des pores est calculé à l'aide de la formule E18.

#### IV.8 Etude de stabilité des encres

Afin de simuler l'incubation de gels post-impression en étuve à 37°C et d'évaluer la stabilité des gels dans ces conditions, des gels étaient extrudés dans des piluliers de verre. Les constructions formées étaient recouvertes d'1ml de DMEM pur. Les échantillons étaient placés à 37°C dans une enceinte thermostatée pendant une durée d'incubation de 21j. L'aspect des constructions était contrôlé par inspection visuelle aux temps : J1, J2, J3, J7, J14 et J21.

#### IV.9 Détermination de la viabilité cellulaire : test LIVE/DEAD®

Le test de viabilité cellulaire LIVE/DEAD® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis) permet de distinguer par observation au microscope à fluorescence, les cellules vivantes des cellules mortes d'un échantillon traité par deux molécules, l'acétoxyméthyle calcéine et l'homodimère d'éthidium (EthD-1). L'activité estérase intracellulaire des cellules vivantes est déterminée par la conversion enzymatique de l'acétoxyméthyle calcéine, pratiquement non fluorescente, en calcéine à fluorescence intense verte (excitation : 495nm, émission : 515nm). Les cellules mortes dont les membranes sont endommagées, permettent la diffusion de l'homodimère d'éthidium (EthD-1) jusque dans le noyau. En se liant aux acides nucléiques, sa fluorescence sera exacerbée en une émission rouge intense (excitation à 495 nm, émission à 635 nm). L'EthD-1 ne pénètre pas à travers les membranes plasmiques des cellules vivantes (202).

Le test LIVE/DEAD® était réalisé sur des grilles imprimées à différents jours d'étude. Les échantillons étaient observés par microscopie confocale à balayage laser (TCS SPE, CTR 6500, Leica, Wetzlar, Allemagne) et trois images représentatives de trois zones différentes des grilles étaient prises par échantillon. Le nombre de cellules vivantes et mortes était compté manuellement à partir des trois images. La viabilité cellulaire était calculée en pourcentage selon le rapport « nombre de cellules vivantes / nombre total de cellules ».

#### IV.10 Détermination de l'activité cellulaire : test d'AlamarBlue®

Le test d'activité cellulaire d'AlamarBlue® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) est basé sur l'utilisation de la molécule résazurine, un indicateur d'oxydoréduction de couleur bleue. La résazurine, subit un changement colorimétrique en réponse à la réduction métabolique des cellules. Sa forme réduite, la résorufine, est rose et hautement fluorescente. Les cellules vivantes convertissent continuellement la résazurine en résorufine en augmentant la fluorescence totale. L'intensité de la fluorescence produite est ainsi proportionnelle au nombre de cellules vivantes (203).

A chaque temps d'étude, les grilles imprimées étaient incubées avec de la résazurine à 10% dans du milieu de culture pendant 2,5h à 37°C. Des grilles imprimées sans cellules étaient utilisées comme

contrôles. Les milieux étaient transférés sur une nouvelle plaque et l'absorbance était mesurée à 590 nm à l'aide d'un spectromètre (2030 Multilabel Reader VICTOR X3 ; PerkinElmer, Waltham, MA, États-Unis) connecté au logiciel WorkOut®. La moyenne des résultats était calculée sur trois échantillons indépendants. Après le test, les grilles imprimées étaient lavées deux fois, remises à incuber et étaient utilisés pour les jours suivants. Le milieu de culture était changé tous les trois jours.

#### IV.11 Test *in vivo*

Les tests *in vivo* ont été conjointement réalisés par l'équipe Biotis et le centre de résonance magnétique des systèmes biologiques (université de Bordeaux).

- **Animaux**

Les protocoles étaient basés sur les principes de protection des animaux de laboratoire de la Société nationale de recherche médicale et approuvés par le Comité de traitement et d'expérimentation animale de l'Université de Bordeaux, France (réf 201701051243776-V2 APAFIS # 8442). Les expériences étaient effectuées conformément aux recommandations européennes en matière de traitement des animaux de laboratoire (directive européenne 2010/63 / UE pour les expérimentations animales). Quatre souris femelles C57BL/6, âgées de huit semaines (Charles Rivers, France) étaient utilisées pour cette étude. Les souris étaient anesthésiées avec 4,5% de gaz isoflurane via une chambre d'induction et maintenues tout au long de l'intervention chirurgicale avec 2,5% d'isoflurane en utilisant un masque facial.

- **Préparation et administration de l'encre**

8 seringues, contenant 500µL de l'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ étaient préparées selon le protocole de formation des gels de diC<sub>16</sub>dT (cf. II.2 page 113).

- **Injection sous-cutanée de l'encre**

Le site chirurgical était préparé par rasage et la peau exposée était désinfectée avec de la bétadine. Sur chacune des quatre souris, deux préparations de 500 µl d'encre étaient injectées par voie sous-cutanée à l'aide d'une seringue de 1 ml avec une aiguille de calibre 18G (Terumo Europe, Belgique). Chaque souris a reçu deux injections bilatérales.

- **Imagerie RMN**

Les expériences étaient effectuées sur un système Bruker BioSpec de 7 T équipé d'une bobine de gradient d'une résistance maximale de 660 mT.m<sup>-1</sup> et d'un temps de montée de 110 µs. Un résonateur de volume fonctionnant en quadrature était utilisé pour l'excitation (diamètre interne de 75,4 mm, longueur active de 70 mm), et un réseau de phases à protons (RAPID Biomedical GmbH) était utilisé pour la réception du signal (4 éléments de 30 mm de long autour d'un boîtier de cylindre elliptique : 19 × 25,5 mm).

Une séquence de précession libre à l'état d'équilibre (WS-bSSFP) sélective dans l'eau était appliquée à l'image de l'abdomen de souris, puis à une mesure du volume de l'encre au fil du temps. Les paramètres suivants étaient utilisés : champ de vision (FOV) : 25x22x20 mm, résolution spatiale : 195x172x156  $\mu\text{m}$ , TE/TR = 2/4 ms, bande passante de réception (BW) : 75 kHz et angle de retournement : 30 me. Les acquisitions étaient effectuées sur des souris anesthésiées à l'isoflurane à 1,5% le jour de l'injection et aux jours 3, 8, 11, 14, 17, 21 et 24 après injection.

## V. Formulation de liposomes, caractérisation

### V.1 Formation de liposomes par hydratation de film

La méthode utilisée pour la préparation des liposomes était la méthode par hydratation de film adaptée de Zhang *et al.* (204). Le ratio molaire entre les phospholipides et le cholestérol était de 1:1.

Cholestérol et phospholipides étaient solubilisés indépendamment dans du chloroforme à une concentration de 10mg/ml, puis introduits dans un ballon et évaporés par rotavapor pendant 10min à une température de 40-45°C. Le film était ensuite disposé sous vide durant un temps minimum de 2h.

Le film était hydraté par ajout de 2ml d'un milieu liquide (PBS, DMEM, solution de fluorescéine aqueuse à 1%) dans le ballon puis vortexé et soniqué à 37GHz à température ambiante pendant 20min.

Le mélange était ensuite disposé en seringue de verre de 1ml, puis extrudé à l'aide d'un kit extruder 610000 (Avanti Polar Lipids). Chaque échantillon de 1ml était passé 20 fois à travers 4 filtres de 800, 400, 200 puis 100nm (filtres nucleopore, Whatman, Fisher Scientific). Chaque filtre était entouré de deux préfiltres (drain disc, Whatman, Fisher Scientific) (205).

### V.2 Détermination de la taille et du potentiel zêta

La taille (nm) et le potentiel zêta (mV) des échantillons ont été déterminés par diffraction dynamique de la lumière (*Dynamic light scattering, DLS*). L'appareil utilisé était un Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Chaque analyse a été réalisée à partir d'un échantillon de 10 $\mu\text{L}$  dilué au 100<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée et répétée trois fois. Les mesures de taille étaient exprimées en moyenne (Z-Average). Les résultats de mesure de taille étaient considérés comme acceptables si l'indice de polydispersité (pdi) était  $\leq 0,2$ .

La mesure de la taille des liposomes incorporés dans une encre de diC<sub>16</sub>T 3% DMEM@+ a été réalisée par dilution de l'encre. Un échantillon de 100mg était dilué au 1/10 par ajout de PBS puis centrifugé 5min à 3000 rpm. Le surnageant était ensuite prélevé pour être analysé comme évoqué précédemment.

### V.3 Incorporation des liposomes aux encres

Les encres de diC<sub>16</sub>dT DMEM @+ étaient préparées selon le protocole de formation des encres à une concentration de 3,75% et un volume total de 400µL. L'encre était réchauffée à 42°C pour être liquéfiée et 100µL d'un mélange de liposomes étaient ajoutés. Le mélange était laissé à température ambiante et la cinétique de gélification était relevée. La concentration finale en diC<sub>16</sub>dT dans le mélange était de 3%.

## VI. Statistiques

Différentes analyses statistiques ont été réalisées selon les données.

Les données rhéologiques étaient exprimées en tant que moyenne ± écart type (n=3 sauf précision contraire). La normalité de la distribution était évaluée avec un test de Shapiro-Wilk. Le test t de Student (bilatéral) ( $p < 0,05$ ) avec le test de variance de Fisher était réalisé pour déterminer les différences entre les groupes.

Pour la détermination de la distance inter-brin des grilles, un test de Shapiro-Wilk était utilisé pour évaluer la normalité de la distribution. Si la distribution était normale, des tests de variance de Levene étaient effectués. Selon le résultat du test de Levene, les différences entre les groupes étaient déterminées par un test ANOVA (bilatéral) ou par un test de Kruskal-Wallis (bilatéral). Si la distribution n'était pas normale, le test de Kruskal-Wallis (bilatéral) était automatiquement effectué. Trois outils étaient utilisés pour obtenir des résultats : le logiciel XLstat® (Addinsoft, Paris, France), le site web AnaStats (<http://www.anastats.fr/>) et le site web Astatsa (<https://astatsa.com/>). La signification était fixée à  $\alpha < 0,05$ .

Pour le test de Kruskal-Wallis, « H » correspond à la valeur observée et «  $c\alpha$  » à la valeur critique ; le test était significatif lorsque  $H > c\alpha$ . Pour le test ANOVA, une différence significative était fixée à  $p < 0,05$ , où p était la valeur observée.

# Résultats et discussion

Partie 1 : Glycoside  
nucléolipides et nucléolipides  
pour la conception d'une encre  
de bioimpression 3D par  
extrusion

# I. Formulation d'encre de biomatériaux à partir de GNL et NL

## I.1 GNF

Le GNF a été la première molécule de type GNL testée comme candidate pour la formulation d'une encre de biomatériaux dans ce projet. Deux études menées par Godeau *et al.* (109) et Ziane *et al.* (110), avaient auparavant évalué les capacités gélatrices du GNF, son utilisation en culture cellulaire et son implantation *in vivo*. Ainsi, la poudre de GNF nécessitait un chauffage préalable compris entre 65°C et 80°C pour être dissoute dans l'eau milli-Q®, la concentration minimale gélatrice avait été évaluée à 0,1%, et des gels étaient formés à une concentration de 1,5% dans du tampon PBS 30min après chauffage.

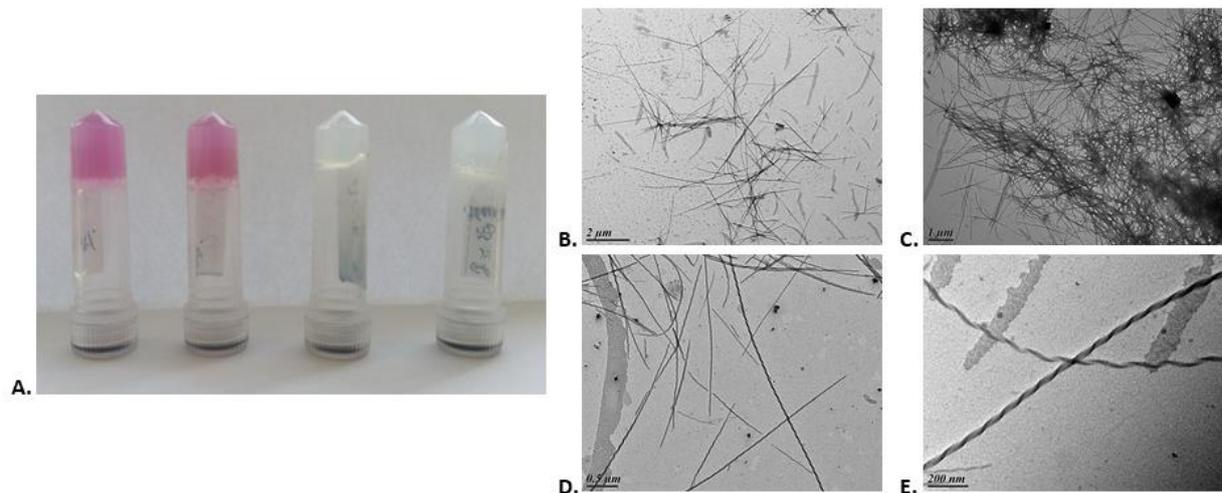
Sur la base de ces travaux, et afin de s'appropriier le procédé de formation des gels de GNF, des échantillons à 3% mélangés dans de l'eau Milli-Q® et du PBS ont été réalisés. L'objectif étant de former un gel d'aspect homogène sur toute la hauteur de l'échantillon, ne présentant pas d'agrégats de poudre visible et ayant incorporé la totalité du milieu aqueux. En effet, plusieurs protocoles variant la température de chauffage (65°C, 75°C, 85°C), l'utilisation d'un bain à ultrasons ou d'une sonde à ultrasons étaient testés (cf. **Figure 59**, page 114). Il n'a pas été possible de former un gel homogène de GNF à 3% dans de l'eau Milli-Q®, une partie de l'eau ne s'incorporant pas. A l'inverse, un gel homogène de GNF 3% dans du PBS a été préparé en adaptant le protocole (**Figure 66 A.**). Pour cela, il était nécessaire de recourir à plusieurs répétitions de l'étape de chauffage de (65°C, 1000rpm, 15min), une agitation manuelle vigoureuse de l'échantillon après chauffage (5min) et de procéder à un temps de repos long (>3h, souvent laissé toute une nuit) à température réfrigérée. Le procédé principal utilisé par Ziane *et al.* (110) n'a ainsi pas été reproduit. De plus, les gels obtenus présentaient une certaine fragilité lors de la manipulation et pouvaient perdre leur intégrité suite à un choc manuel important du tube.

Des tests ont été menés afin de réaliser des gels de GNF à partir de milieu de culture DMEM. Les premiers tests réalisés sur des mélanges de GNF 3% et DMEM, étaient réalisés à des températures comprises entre 20 et 37°C. Le but recherché était de pouvoir envisager l'ajout ultérieur de cellules au cours du processus de gélification. Il n'a pas été possible de former un gel dans ces conditions, la poudre de GNF ne se solubilisant pas, malgré de nombreuses variations du protocole. L'incorporation ultérieure de cellules devrait donc s'envisager dans une seconde étape, après gélification préalable du GNF, ou lors de la redescende en température (à une température voisine de 37°C) après chauffage.

Maisani *et al.* (111) ont formé des gels de GNF 3%, dans des conditions similaires à Ziane *et al.* (110), à savoir une formation à température ambiante après chauffage à 65°C dans du PBS ou du DMEM, mais à des concentrations de 3%. Dans notre cas, la formation de gels de GNF à 1% et 3% dans le

DMEM a pu être obtenue en chauffant le GNF à 65°C pendant une ou plusieurs phases de chauffage, entrecoupées d'un passage au vortex des échantillons afin de casser la poudre de GNF, puis par une étape de refroidissement au réfrigérateur pendant plusieurs heures (**Figure 66 A.**). Après de multiples expériences, il semble que la gélification du GNF dans le DMEM nécessitait moins d'étapes de chauffage que dans le PBS ainsi que dans l'eau Milli-Q®. Les gels formés semblaient également plus résistants à la manipulation dans les tubes. Ceci pourrait s'expliquer par la différence de composition de ces milieux aqueux (investigation et comparaison non réalisée).

Des gels de GNF 3% DMEM ont été observés par microscopie TEM. Sur les images (**Figure 66 B. à E.**), des agrégats de fibres de GNF ont été retrouvés, de longueurs variables entre 0,5 et 10µm de long. De plus près, les fibres de GNF présentaient un aspect de type hélicoïdal, en forme de ressort, avec un diamètre relativement constant entre 30 et 50nm. Cette observation était similaire à celle qui a pu être faite par Godeau *et al.* (109) avec des gels de GNF formés dans de l'eau.



**Figure 66: Formation de gels de GNF et observation en microscopie TEM**

A. Observation de gels de GNF (de gauche à droite respectivement): GNF 1% DMEM ; GNF 3% DMEM ; GNF 3% Eau Milli-Q® ; GNF 3%/PBS. Contrairement aux gels formés dans le DMEM, les gels formés dans de l'eau Milli-Q® étaient moins résistants et moins homogènes (une partie du milieu liquide n'est pas incorporée au gel). B. à E. Observations par microscopie TEM d'un gel de GNF 3% DMEM. Les fibres formées ont une forme hélicoïdale.

Il est à noter que la stabilité des gels formés dans du milieu de culture dépend non seulement de la molécule gélatrice, mais aussi du milieu utilisé. Ainsi, il a pu être observé que des gels de GNF/DMEM présentaient une coloration passant du rose/rouge au jaune après un mois. Ce changement de couleur, lié au rouge de phénol contenu dans le DMEM, est le signe d'une évolution du pH du gel vers un pH acide.

Les profils rhéologiques des gels de GNF DMEM à 1 et 3% ont été analysés à 25°C (**Tableau II**) et sont illustrés dans la **Figure Annexe 1** et la **Figure Annexe 2** (page 220-221). Les caractéristiques d'un solide,

et donc d'un gel, sont confirmées par rhéologie, les modules élastiques  $G'$  étant toujours supérieurs aux modules visqueux  $G''$  lors de la variation de la fréquence angulaire. Les modules des gels à 1% ( $G' = 5571$  Pa) étaient inférieurs à ceux à 3% ( $G' = 7685$  Pa), confirmant que l'augmentation de la concentration rigidifie le gel. Les gels à 1 et 3% présentaient également un profil thixotrope. En effet, après application d'une contrainte de 30%, le  $G''$  devenait supérieur au  $G'$ , l'échantillon n'étant alors plus un solide mais un liquide, et était totalement déstructuré. L'application d'une contrainte de 0,1% permettait, au cours du temps, de récupérer un profil de type solide ( $G' > G''$ ). Les temps nécessaires à la récupération des modules mesurés avant contrainte étaient de 15 et 32min respectivement.

Tableau II: Caractérisation rhéologique des gels de GNF/DMEM à 1 et 3% à 25°C

GNF 1% DMEM				
Mesures rhéologiques	T°	$G'$ (Pa) $\pm \sigma$	$G''$ (Pa) $\pm \sigma$	Observations et mesures
LVER : $G'$ $G''$ vs déformation de cisaillement ( $\gamma$ )	25°C	4504 $\pm$ 2007	677 $\pm$ 237	Contrainte de rupture : 1,4% Croisement $G'/G''$ : 8,0%.
Modules $G'$ $G''$ vs fréquence angulaire (f)		5571 $\pm$ 3586	747 $\pm$ 521	-
Propriétés thixotropes		11830	1912	Retour aux modules initiaux : 15 min
GNF 3% DMEM				
Mesures rhéologiques	T°	$G'$ (Pa) $\pm \sigma$	$G''$ (Pa) $\pm \sigma$	Observations et mesures
LVER : $G'$ $G''$ vs shear strain ( $\gamma$ )	25°C	30750 $\pm$ 8160	5209 $\pm$ 1514	Contrainte de rupture : 1,3% Croisement $G'/G''$ : 4,0%.
Modules $G'$ $G''$ vs fréquence angulaire (f)		7685 $\pm$ 4859	1207 $\pm$ 1460	-
Propriétés thixotropes		36690	5032	Retour aux modules initiaux : 32 min

Des mesures rhéologiques avaient été réalisées par Ziane *et al.* (110). Les gels de GNF 1,5% PBS à 25°C et présentaient des modules de 600 à 700 Pa pour le  $G'$ , et de 100Pa pour le  $G''$  environ. Maisani *et al.* (111) ont également déterminé les modules de leurs gels de GNF 3% DMEM avec des valeurs de l'ordre de 1000Pa ( $G'$ ) et 100Pa ( $G''$ ).

Le test d'extrusion à la seringue a été effectué sur les gels de GNF à 1 et 3%. Pour prélever le gel préformé liquéfié, une température d'au moins 65°C était nécessaire. Cependant la reformation de gel en seringue ne semblait pas complète, et les « simili-gels » reformés semblaient moins solides, même après passage à température réfrigérée des seringues. Alternativement, aucun gel n'a pu être formé directement dans la seringue (**Figure 67 A.**). Cette absence de gélification en seringue n'est pas expliquée, néanmoins, l'étape de liquéfaction des gels de GNF semblerait irréversible et ne permettrait pas de reformer un gel. De plus, les forces mécaniques appliquées sur l'échantillon liquide lors de sa mise en seringue pourraient influencer sur les capacités de gélification de celui-ci.

L'impression par la bioimprimante des gels de GNF 1% a montré qu'ils étaient difficilement extrudables malgré l'augmentation du coefficient d'extrusion de l'imprimante. Il n'a pas été possible d'extruder le

gel sous forme de fibres continues, des gouttes se formant à l'extrémité de la seringue. Les grilles formées (**Figure 67 B.**) étaient très fragiles, d'aspect très liquide, et se sont détruites après mouvement des plaques 6 puits (**Figure 67 C.**)



**Figure 67: Test de formation en seringue et impression par imprimante du GNF 1% DMEM**

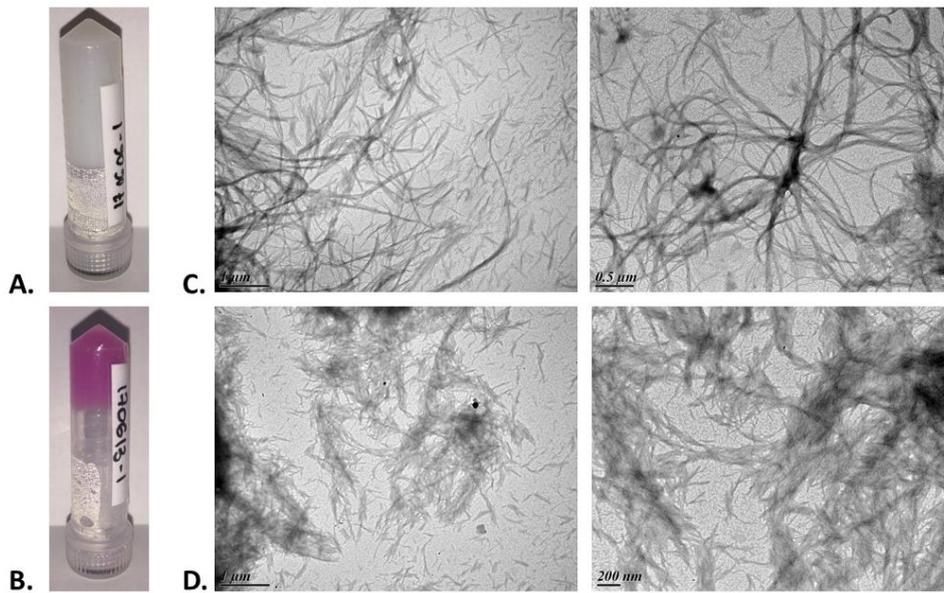
*A. Les mélanges de GNF 1%/DMEM ne formaient pas de gel en seringue en utilisant le protocole habituel de gélification. B. Les grilles formées par impression de GNF1%/DMEM étaient incomplètes. C. Grille imprimée détruite après mouvement de la plaque 6 puits.*

## 1.2 GNBA-BU

Le GNBA possédant une liaison urée entre sa chaîne hydrophobe et ses groupements triazole (GNBA-BU) est la seconde molécule candidate qui a été testée pour la formulation d'une encre de biomatériaux.

Les premiers tests de gélification ont été réalisés en mélangeant du GNBA-BU à une concentration de 1,5% dans l'eau Eau Milli-Q®. L'obtention d'un gel était très rapide après un simple chauffage à 80°C en moins de 2min (**Figure 68 A.**). Plusieurs tests réalisés à des températures inférieures (37°C-60°C) n'ont pas permis de solubiliser le GNBA-BU et de former de gels. De même, le mélange GNBA-BU 1,5%/DMEM chauffé entre 75 et 80°C gélifiait en moins de 5min (**Figure 68 A.**) et des températures plus basses (65°C-70°C) n'ont pas permis d'obtenir une solubilisation du GNBA-BU et une formation de gel dans le DMEM.

L'imagerie en microscopie TEM des gels de GNBA-BU 1,5% formés dans l'eau Eau Milli-Q® ou le DMEM a mis en évidence un réseau fibrillaire, tridimensionnel, d'une centaine de nanomètres. Les fibres présentaient un enchevêtrement différent pour les gels formés dans du DMEM et semblaient plus courtes. La différence de composition des milieux pourrait donc influencer sur les arrangements moléculaires et l'aspect microscopique des gels (**Figure 68 C. et D.**).



**Figure 68: Formation de gels de GNBA-BU et imagerie TEM**

**A.** Gel de GNBA-BU 1,5% /Eau Milli-Q® **B.** Gel de GNBA-BU 1,5% /DMEM **C.** Imagerie TEM d'un gel GNBA-BU 1,5% /Eau Milli-Q® (échelle : gauche 1 $\mu$ m ; droite 0,5 $\mu$ m). **D.** Imagerie TEM d'un gel GNBA-BU 1,5% /DMEM (échelle : gauche 1 $\mu$ m ; droite 200nm).

La caractérisation rhéologique des gels de GNBA-BU 1,5% formés dans l'eau Milli-Q® et le DMEM a été évaluée à 25°C et 37°C. L'ensemble des résultats sont reportés dans le **Tableau III** et illustrés de la **Figure Annexe 3** à la **Figure Annexe 8** (pages 222-227).

L'ensemble des mesures rhéologiques confirmaient le caractère solide du gel, les  $G'$  étant toujours supérieurs aux  $G''$ . A 25°C, les modules élastiques dans l'eau Milli-Q® étaient en moyenne de 3500 Pa. La formulation dans le DMEM renforçait le gel, avec des modules mesurés à près de 15000 Pa. Les mesures des modules à 37°C augmentaient fortement (15500 Pa) pour les gels formés dans l'eau Milli-Q® tandis que pour les gels formés dans le DMEM, les valeurs de modules étaient d'un même ordre de grandeur (13000 Pa). La température sol-gel était l'eau Milli-Q® a été évaluée à près de 64°C. Il n'a pas été possible de déterminer cette température dans le cas des gels de GNBA-BU/DMEM, les modules  $G'$  et  $G''$  ne se croisant pas dans la plage de température testée (25-90°C) (**Figure Annexe 8**, page 227), et ce sur deux essais indépendants.

Des profils thixotropes étaient observés pour chacun des deux types de gels, les modules  $G'$  et  $G''$  regagnant des valeurs similaires à celles mesurées avant déstructuration. Par rapport à la formation dans le NaCl, la formulation dans le DMEM allonge la cinétique de retour (45min contre 78 min respectivement). Pour les formulations dans l'eau Milli-Q®, la cinétique de retour était raccourcie lorsque la température était augmentée, ce qui n'était pas observé dans les formulations de DMEM.

Ramin *et al.* (116) ont mesuré des modules élastiques plus importants de l'ordre de 11000 Pa pour des concentrations similaires et un pourcentage de casse de 40 % dans les mesures de détermination de

la LVER. De même, la cinétique de thixotropie était plus courte et évaluée à une vingtaine de minutes. La température sol-gel a été évaluée à 78°C par DSC.

Dans le cas des gels formés dans le DMEM, un test de transfert entre deux seringues a été entrepris. Le gel de GNBA-BU 1,5% /DMEM n'a pas repris après injection dans l'autre seringue. Aucun protocole testé pour reformer le gel présent dans la seconde seringue (chauffages successifs à 80°C alternés avec des temps de repos supérieurs à 1h, passage à température réfrigérée) n'a permis d'obtenir un gel (Figure 69 C. - E.).

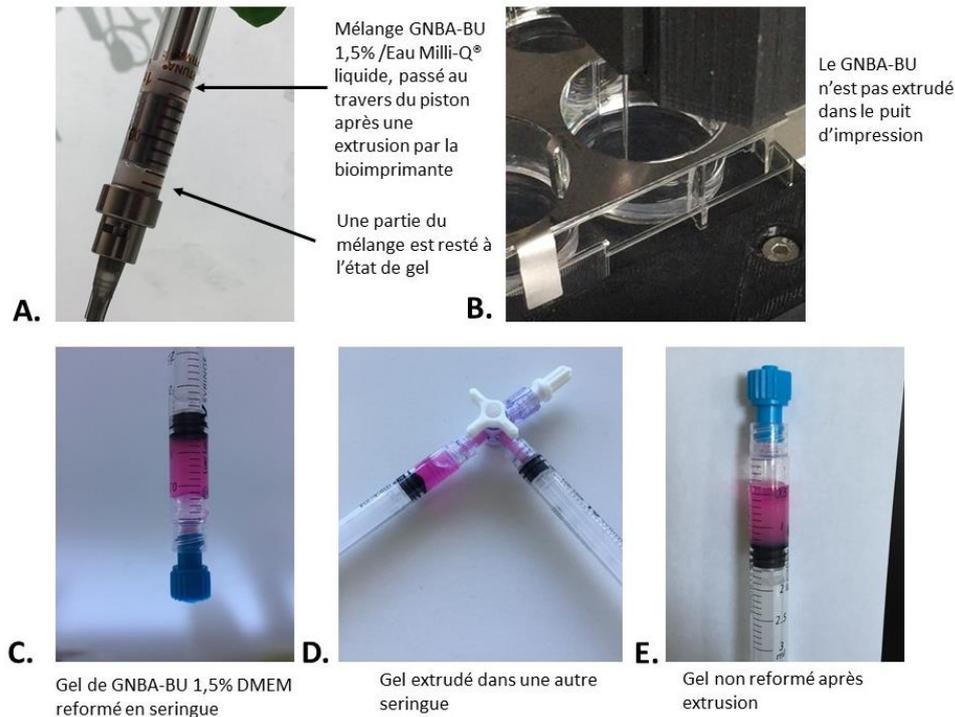


Figure 69: Tests d'extrusion et d'impression de gels de GNBA-BU

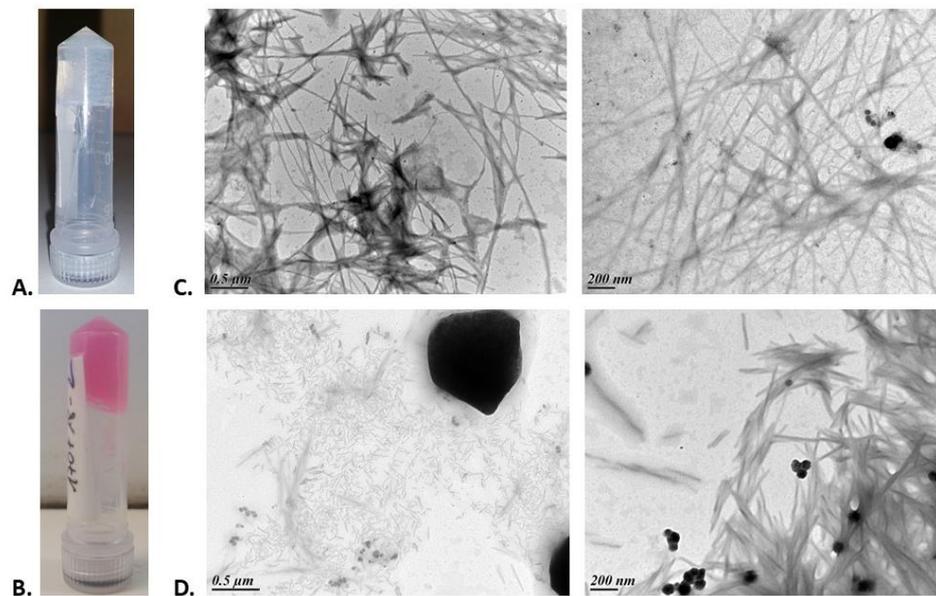
Tableau III: Caractérisation rhéologique des gels de GNBA-BU 1,5% / eau Milli-Q® et DMEM à 25°C et 37°C

GNBA-BU 1,5% eau Milli-Q®				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations et mesures
<b>LVER</b> G' G' vs shear strain (γ)	25°C	3584 ± 1795	630 ± 307	Contrainte de rupture : 1,1% Croisement G'/G'' : 4,0%
	37°C	15542 ± 4496	2079 ± 445	Contrainte de rupture : 0,9% Croisement G'/G'' : 3,2%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)	25°C	6012 ± 3531	1026 ± 540	-
	37°C	18882 ± 14282	3750 ± 2346	-
<b>Propriétés thixotropes</b>	25°C	3165 ± 1361	542 ± 234	Retours aux modules initiaux : 45 ± 5min
	37°C	13412 ± 17344	1678 ± 1765	Retours aux modules initiaux : 24 ± 8min
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	63,9°C
GNBA-BU 1,5% DMEM				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations et mesures
<b>LVER</b> G' G' vs shear strain (γ)	25°C	14849 ± 9495	2133 ± 1306	Contrainte de rupture : 1,0% Croisement G'/G'' : 6,3%
	37°C	13268 ± 12066	1878 ± 1842	Inflexion : 0,8% Croisement : 2,6%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)	25°C	26877 ± 2808	4028 ± 224	-
	37°C	41213 ± 17437	4672 ± 1321	-
<b>Propriétés thixotropes</b>	25°C	11219 ± 3023	1571 ± 447	Retours aux modules initiaux : 78 ± 17min
	37°C	27286 ± 16970	3370 ± 2056	Retours aux modules initiaux : 77 ± 13min
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	Non déterminable, pas de croisement de G' et G'' observé

### I.3 GNBA-BE

La troisième molécule testée était un dérivé éther de GNBA (GNBA-BE). La formation des gels de GNBA-BE à 1,5% a été difficile dans l'eau Milli-Q® et le DMEM. Aucun gel n'a été formé à température ambiante ni à des températures de 37°C à 50°C. Ces choix étaient guidés par de précédents travaux menés sur le GNBA-BE. En effet, Latxague *et al.* (108) ont formé des gels de GNBA-BE 3% PBS à 25°C, ainsi que des gels de GNBA-BE 1,5% eau Milli-Q® à 45°C et à 3% à 55°C. Le protocole retenu pour la formation d'un gel était un chauffage à 55°C pendant 15min, 1000rpm, puis un passage de 15min dans le bain à ultrasons (**Figure 70**). A ce stade, la poudre de GNBA-BE était solubilisée. La cinétique de formation d'un gel était cependant très longue (>10h). Les gels obtenus n'étaient pas tous homogènes (apparition de précipités, non incorporation de tout le milieu liquide), et très souvent, plusieurs cycles de chauffage et de repos étaient nécessaires pour y arriver. Il est à noter qu'un passage à température réfrigérée entraînait une précipitation des gels.

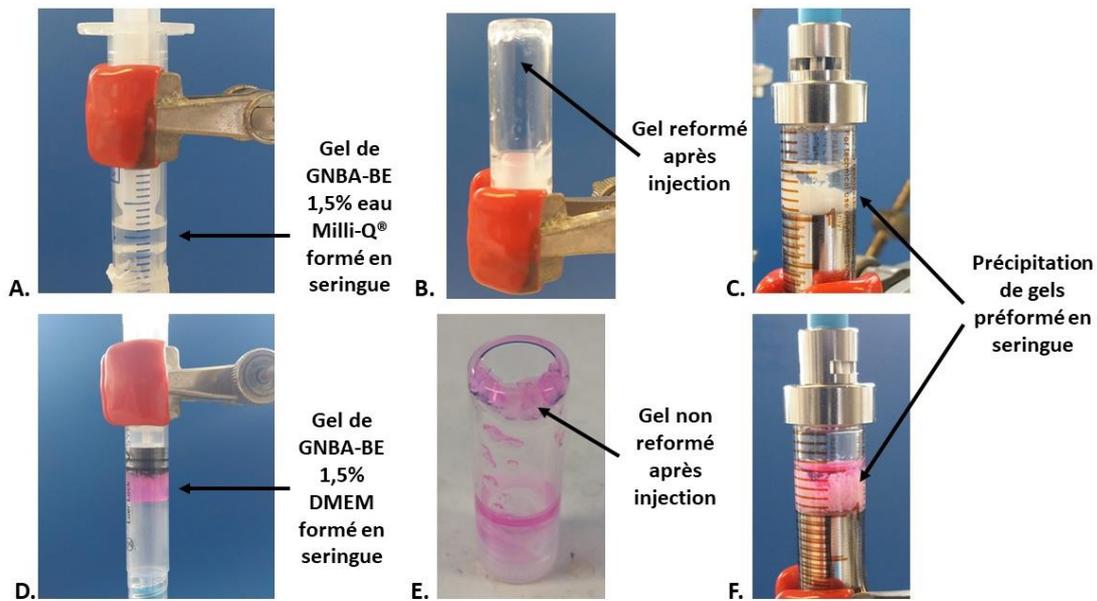
Les images obtenues par microscopie TEM ont permis d'observer un réseau fibreux. Les fibres formées dans l'eau Milli-Q® étaient plus longues et formaient un réseau plus complexe que les fibres formées dans le DMEM, donnant plus l'aspect d'un amas de petites sous-unités (**Figure 70**).



**Figure 70: Formation de gels de GNBA-BE 1,5% et observations en TEM**

**A. et B.** Formation de gels de GNBA-BE 1,5% dans l'eau Milli-Q® et dans le DMEM respectivement. **C. et D.** Observation en imagerie TEM de gels de GNBA-BE 1,5% dans l'eau Milli-Q® et dans le DMEM respectivement (échelle, photo de gauche 0,5µm ; photo de droite 200nm).

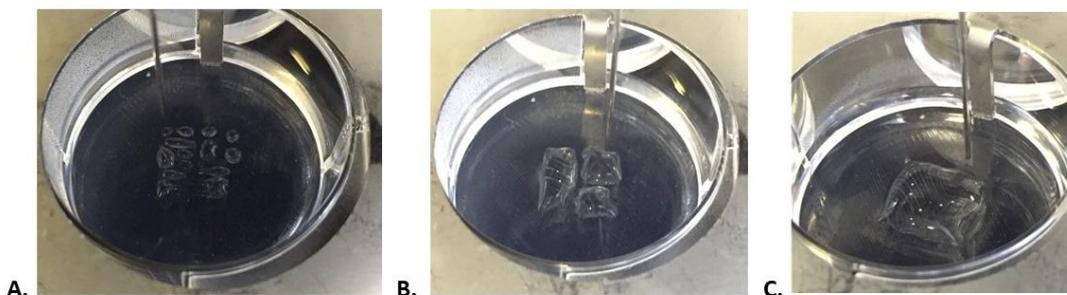
Il a été possible de former des gels de GNBA-BE 1,5% en seringue, dans l'eau Milli-Q® et le DMEM, avec cependant la même difficulté que pour l'obtention des gels dans des tubes à centrifuger. Lors de l'application d'une pression sur ces gels, ceux-ci prenaient un aspect très liquide et étaient extrudés presque goutte à goutte. Contrairement aux échantillons formés dans le DMEM, ceux formés dans l'eau Milli-Q® reprenaient en masse, notamment en moins de 5min. Il n'a pas été possible d'obtenir de nouveau un gel après extrusion des échantillons formés dans le DMEM (**Figure 71**). Il a été observé que malgré la formation de gels en seringues, ceux-ci présentaient une certaine instabilité au cours du temps, notamment avec l'apparition de précipités une fois le gel laissé au repos une journée (**Figure 71**).



**Figure 71: Formation en seringue de gels de GNBA-BE et tests d'injection manuel**

**A. et B.** Formation en seringue d'un gel de GNBA-BE 1,5% eau Milli-Q® et reformation d'un gel après injection. **D. et E.** Formation en seringue d'un gel de GNBA-BE 1,5% DMEM. Le gel injecté présentait un aspect très liquide et ne se reformait pas. **C. et F.** Des gels de GNBA-BE 1,5% eau Milli-Q® et DMEM préalablement formés en seringue de verre pour bioimpression ont précipité après un temps de repos d'une nuit.

Comme il avait été observé dans le test d'extrusion manuel, les gels de GNBA-BE 1,5% eau Milli-Q® se liquéfiaient après application d'une force d'extrusion par la bioimprimante. Les dépôts s'étaient fortement et sortaient de l'aiguille au goutte à goutte, rendant difficile l'impression de formes très précises comme des grilles. C'est pourquoi un modèle cubique a été utilisé dans le cas présent. Le gel reprenait en masse en 5min environ (**Figure 72**). La stabilité des constructions dans le temps était très faible, celles-ci perdant leurs formes après 3 jours d'incubation. Les échantillons précipités de GNBA-BE 1,5% DMEM n'ayant pu reformer un gel après injection, le test de bioimpression n'a pas été appliqué sur eux.



**Figure 72: Impression d'un gel de GNBA-BE 1,5% eau Milli-Q®**

**A. B. C.** Impression en trois étapes d'une forme de type parallépipède à trois niveaux. Le GNBA 1,5% eau Milli-Q® était très liquide à la sortie de la seringue, mais reprenait en masse en 5min environ. Il semblait difficile d'imprimer des formes complexes et précises, le gel s'étalant beaucoup au-delà des points de dépôt.

Au vu des difficultés d'obtention de gels homogènes, l'évaluation rhéologique n'a pas été réalisée. Latxague *et al.* (108) ont déterminé les modules élastiques à environ 30000 Pa pour des gels à 1% formés dans l'eau et ont également observé un profil de gels thixotropes.

#### 1.4 diC<sub>16</sub>dT

La diC<sub>16</sub>dT est un NL comportant un groupement phosphate de charge négative et formant des assemblages supramoléculaires en présence de divers cations : lithium, sodium, potassium, ammonium (101). Dans les travaux publiés par Ramin *et al.* (101), des gels de diC<sub>16</sub>dT étaient formés à des concentrations de 3 et 6% dans le NaCl 0,9% après chauffage à 65°C puis par une étape de sonication dans un bain à ultrasons durant 2 à 3min.

Il a été possible de former des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9% dans les mêmes conditions mais en allongeant quelque peu la durée de passage dans le bain à ultrasons (15min) (**Figure 73 A.**). La gélification s'observait en quelques minutes, voire à la sortie du bain à ultrasons. Comme l'observaient Ramin *et al.* (101), la gélification de la diC<sub>16</sub>dT est fonction de la concentration en cations, dans notre cas les ions Na<sup>+</sup>. Un mélange de diC<sub>16</sub>dT 3% dans l'eau Milli-Q®, traité dans les conditions évoquées, présentait visuellement une certaine viscosité mais ne passait pas le test d'inversion du tube. De même, l'essai de gélification en présence de DMEM pur n'a pas fonctionné (**Figure 73 B.**). La concentration en NaCl du DMEM, 6,4g/L, 110mM, semblait insuffisante pour neutraliser la charge négative du groupement phosphate et induire une gélification, comparée à la solution de NaCl à 0,9% (9g/L, 154mM). C'est pourquoi il a été décidé de supplémenter le DMEM en NaCl.

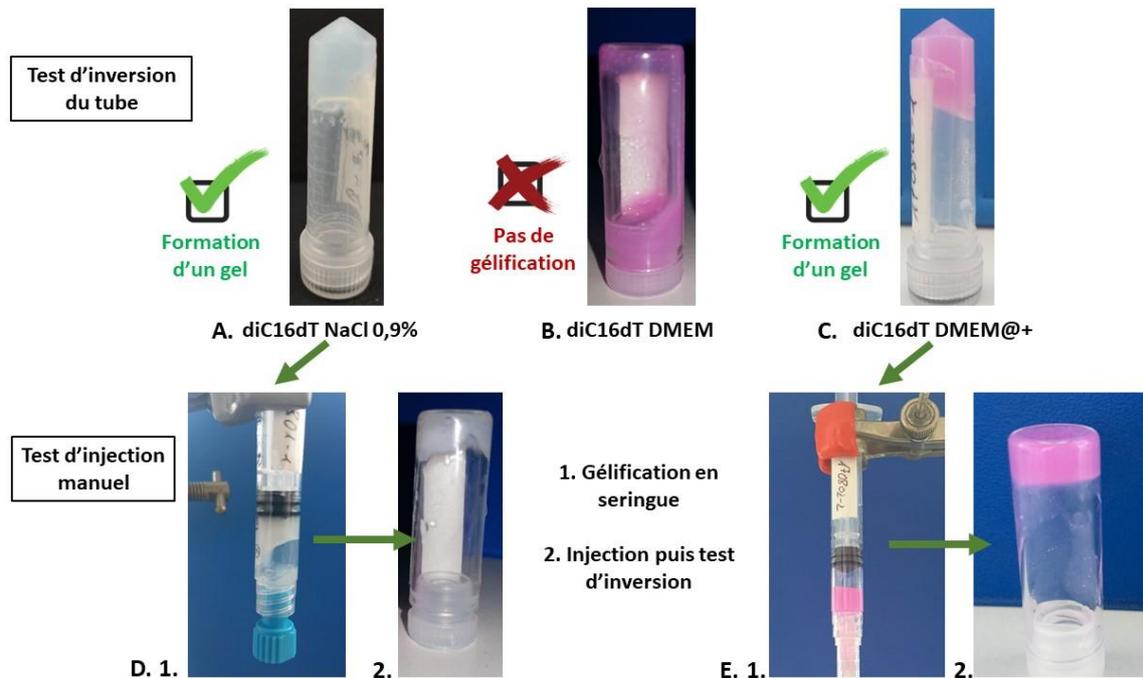
Le DMEM, supplémenté à une concentration en NaCl de 123 mM, a permis de former un gel de deux manières différentes. La première, en ajoutant une quantité suffisante de NaCl sous forme solide. La seconde, en réalisant un mélange composé de 70% de DMEM et de 30 % d'une solution de NaCl 0,9%, nommé DMEM@+. Ces gels étaient formés dans les mêmes conditions opératoires que le gel de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9%, en moins de 5min après chauffage et repos à température ambiante (**Figure 73 C.**).

L'osmolalité des milieux a été mesurée sur les deux mélanges (**Tableau IV**) et comparée à celle du DMEM non supplémenté. L'osmolalité du mélange réalisé à partir de NaCl sous forme solide s'est avérée plus importante (378mOsm) que celle du mélange de DMEM@+ (304mOsm). L'osmolalité des milieux de culture doit être similaire à l'osmolalité de l'environnement naturel des cellules. La gamme d'osmolarité couramment utilisée est de 270 à 330 mOsm/kg (206). C'est pourquoi, la supplémentation du DMEM à l'aide de NaCl en poudre n'a pas été retenue pour la suite des manipulations. L'ensemble des gels de diC<sub>16</sub>dT ont ainsi été formés à partir de DMEM@+.

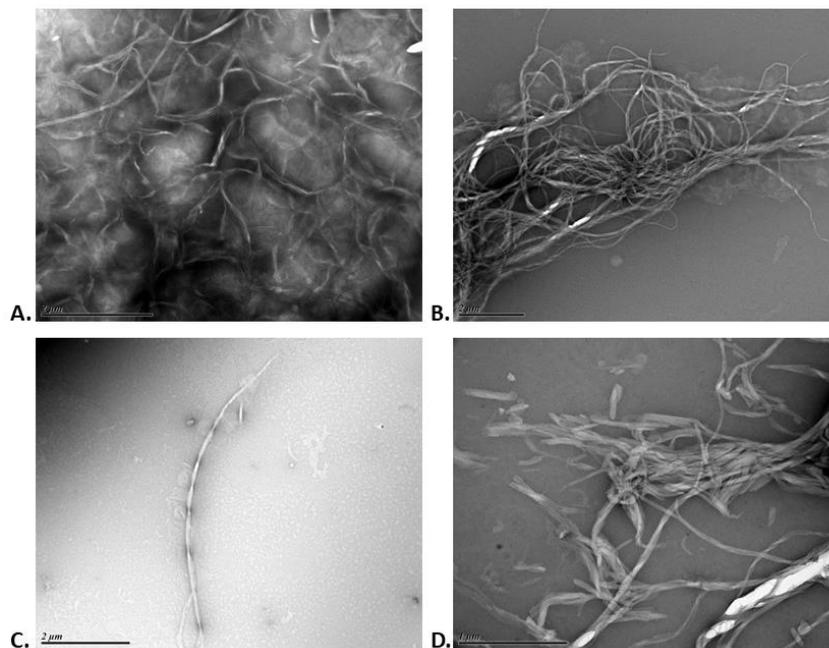
Tableau IV: Mesures de l'osmolalité de diverses préparations de DMEM

Milieu	Concentration en NaCl	Osmolalité
DMEM	110 mM	312 mOsm/kg
DMEM@+ (DMEM/NaCl 0,9% aqueux, 70%/30% v/v)	123 mM	304 mOsm/kg
DMEM@+ (DMEM/NaCl 0,9% solide)	123 mM	378 mOsm/kg

Les propriétés d'extrusion des gels formés à 3% dans le NaCl 0,9% et le DMEM@+ ont rapidement été évaluées. Dans les deux cas, il a été possible de former un gel en seringue après réchauffage puis prélèvement d'un gel préformé. Une fois injectés, les gels ont repris en masse en moins de 3min (**Figure 73 C.**). Comme Ramin *et al.* ont pu l'observer avec des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9%, les images réalisées en TEM montrent que les fibres de gels de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ formaient des amas. Les fibres, d'une forme hélicoïdale, avaient un diamètre compris entre 100 et 200nm (**Figure 74**).

Figure 73: Formation de gels de diC<sub>16</sub>dT et test d'injection

**A.-C.** Les mélanges de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9% formaient un gel contrairement aux mélanges de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM. Le DMEM devait être enrichi en Na<sup>+</sup> (DMEM@+) pour gélifier en présence de diC<sub>16</sub>dT. **D. et E.** Les mélange de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9% et de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ formaient un gel en seringue (1.) et reprenaient en masse après extrusion (2.).



**Figure 74: Observation en imagerie TEM de fibres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+**  
*A. et B. Observation d'amas de fibres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ . C. et D. Les fibres avaient une épaisseur comprise entre 100 et 200nm.*

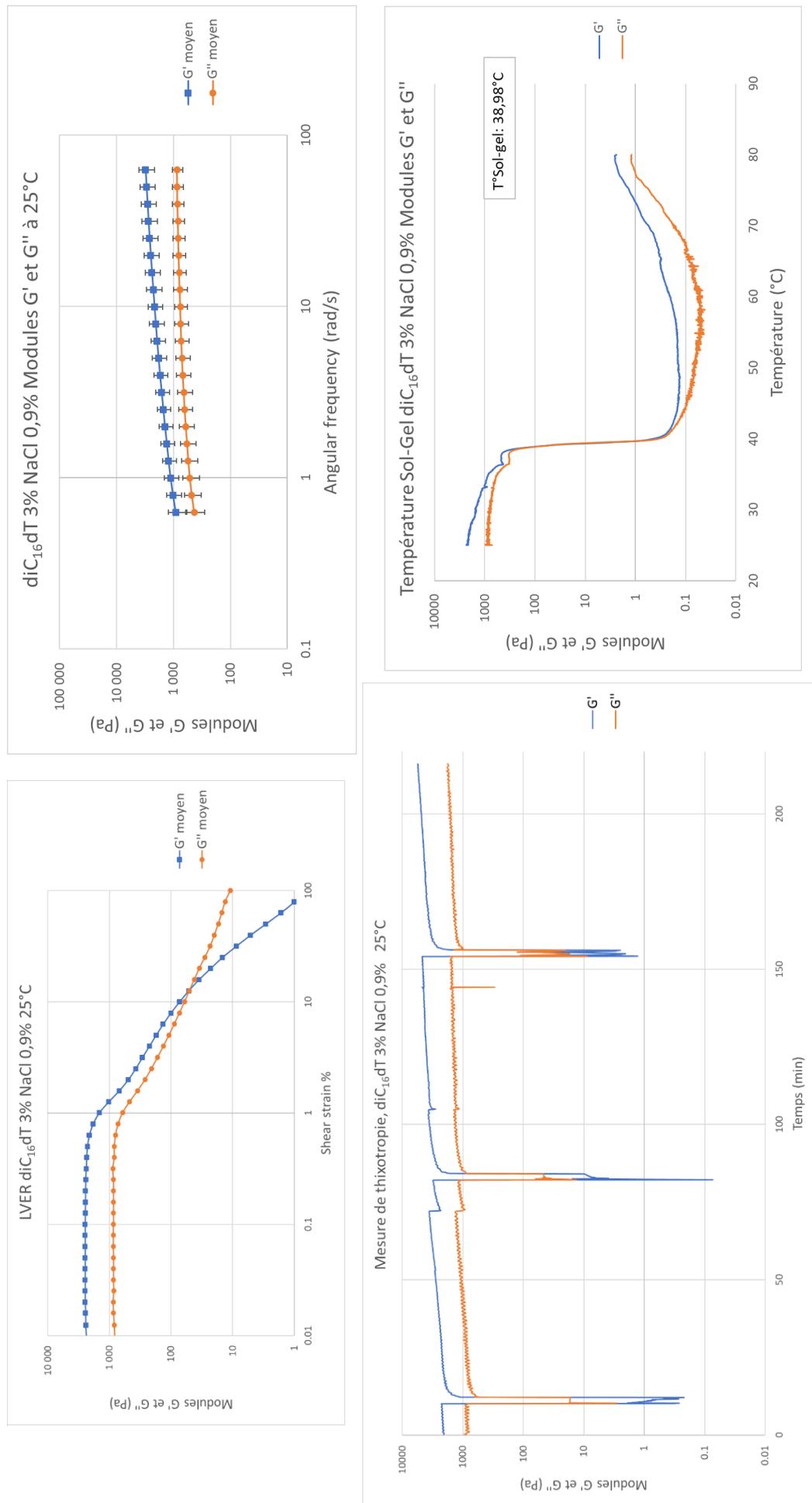
Les propriétés rhéologiques des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9% et DMEM@+ ont été évaluées (**Tableau V, Figure 75 et Figure 76**). Les gels formés dans le NaCl 0,9% possédaient à 25°C des modules élastiques de près de 2000 Pa. Ils présentaient des profils thixotropes et retrouvaient leurs modules initiaux en 16 min en moyenne. Leur température de gélification était de 39°C. Formés dans le DMEM, les modules  $G'$  étaient diminués à une valeur de 1500 Pa. Ils présentaient également des propriétés thixotropes et avaient un temps de reprise des modules de 11min. La température sol-gel n'était pas affectée par le changement de milieu et a été évaluée à 39,3°C. Lorsque la caractérisation rhéologique des gels était réalisée à température physiologique (37°C), les modules élastiques  $G'$  étaient augmentés à près de 2000 Pa. Un profil thixotrope était également observé (**Figure Annexe 10**, page 228), mais le temps de reprise était allongé à 31 min. La proximité des températures sol-gel et physiologiques est très probablement à l'origine de cet allongement, le gel étant proche de sa transition à un état liquide, la reprise des modules s'avérait plus longue.

Réalisée à 25°C ou 37°C, l'observation des profils thixotropes montrait une augmentation progressive des modules tout au long des mesures. Cela peut être expliqué par un séchage de l'échantillon, en dépit des précautions nécessaires prises (utilisation d'une bague d'eau et d'une trappe à solvant) ou à une certaine fatigue du gel, ne supportant pas la réalisation de plusieurs cycles de mesure sur un temps long et sur un même dépôt. C'est pourquoi les rhéogrammes de thixotropie ont également été exprimés lors de la réalisation d'une seule mesure (**Figure Annexe 9 et Figure Annexe 10**, pages 227-228).

Afin d'évaluer le devenir des gels dans des conditions similaires à celles que subiraient des impressions 3D réalisées à partir d'une bioencre, une étude de stabilité a été entreprise sur les gels de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+. En l'absence de la bioimprimante au moment du test, des structures étaient formées dans des piluliers de verre par extrusion à l'aide d'un pousse seringue électrique. 3 structures « imprimées » étaient recouvertes de 1ml de DMEM, 3 autres ont servi de témoin (**Figure 77**). L'ensemble des gels ont été incubés à 37°C, et une inspection visuelle à J1, J2, J3, J7, J14 et J21 a été menée. Comme nous nous y attendions, les gels mélangés à du DMEM n'ont pas adhérents au verre et flottaient. Tout au long de l'étude, les structures n'ont pas perdu leur conformation 3D, hormis, un léger séchage des gels non recouverts de DMEM. Visuellement, une faible dégradation de la structure a été constatée par l'observation de petits fragments de gels libres dans le milieu de culture. Les impressions réalisées à partir de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ ont donc été considérées comme stables sur une durée de 21j.

**Tableau V: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9% et DMEM@+ à 25°C et 37°C**

diC <sub>16</sub> dT 3% NaCl 0,9%				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations et mesures
<b>LVER</b> G' G'' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	2481 ± 1418	861 ± 405	Contrainte de rupture : 0,9% Croisement G'/G'' : 12,6%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)		1945 ± 549	732 ± 200	-
<b>Propriétés thixotropes</b>		3320 ± 1214	1199 ± 381	Retours aux modules initiaux : 16 ± 13min
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	39,0°C
diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations et mesures
<b>LVER</b> G' G'' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	518 ± 282	173 ± 116	Contrainte de rupture : 3,2% Croisement G'/G'' : 15,6%
	37°C	2996 ± 1877	1030 ± 586	Contrainte de rupture : 2,0% Croisement G'/G'' : 25,0%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)	25°C	1527 ± 638	398 ± 66	-
	37°C	1993 ± 920	762 ± 283	-
<b>Propriétés thixotropes</b>	25°C	410 ± 155	134 ± 67	Retours aux modules initiaux : 11 ± 6 min
	37°C	1717 ± 1577	597 ± 521	Retours aux modules initiaux : 31 ± 20 min
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	39,3°C



144 **Figure 75 : Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9% à 25°C**

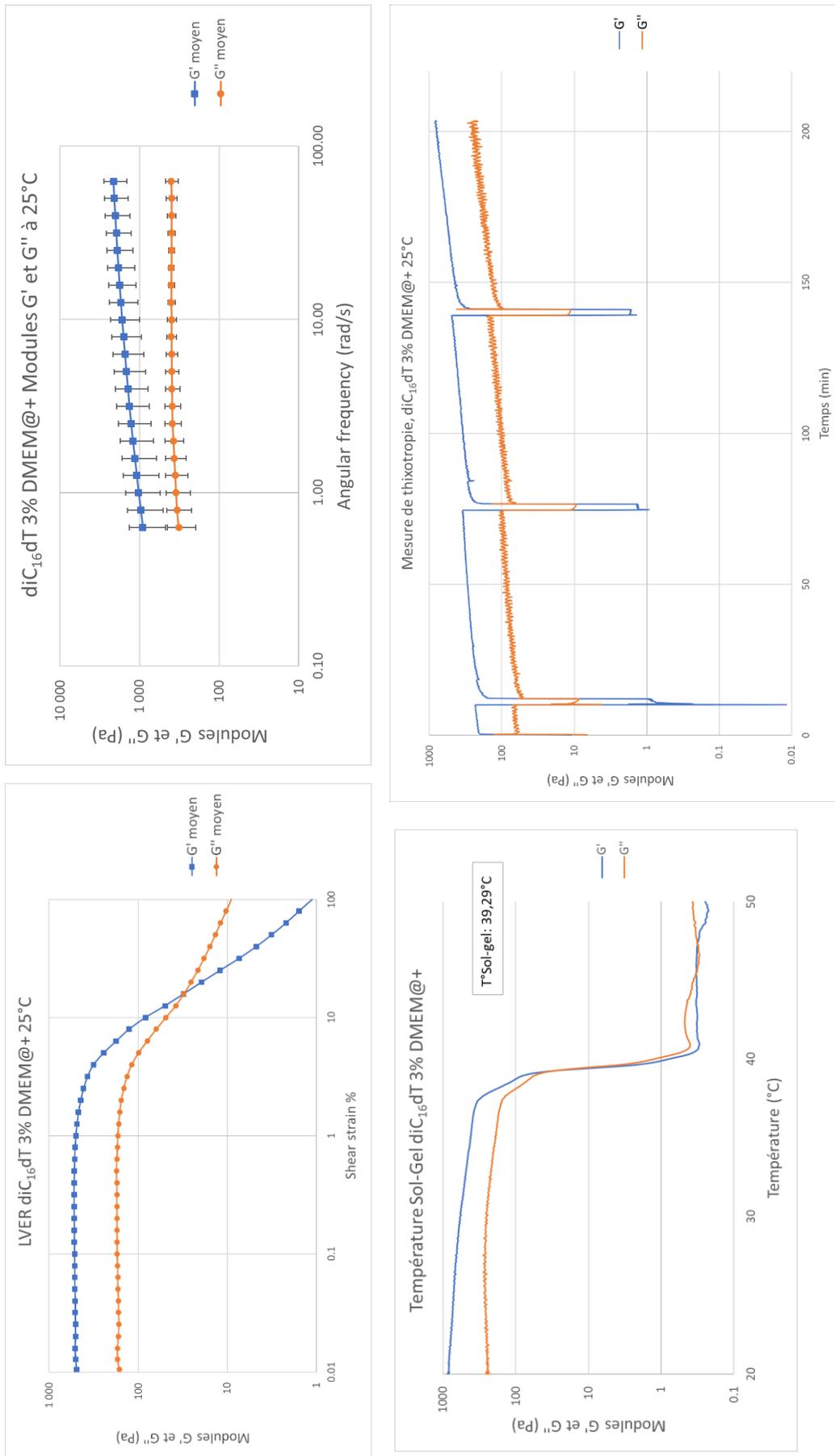
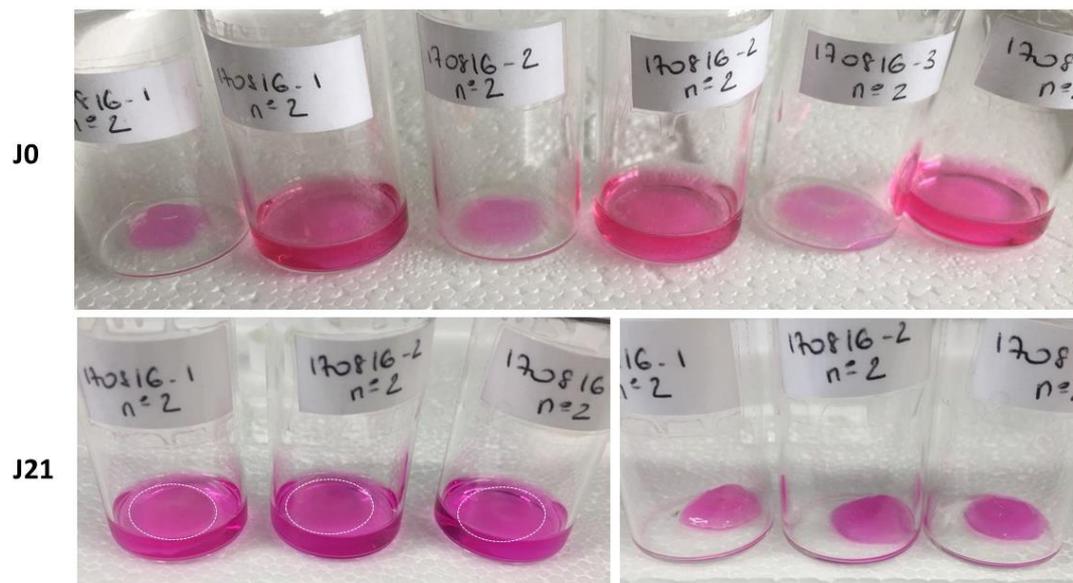


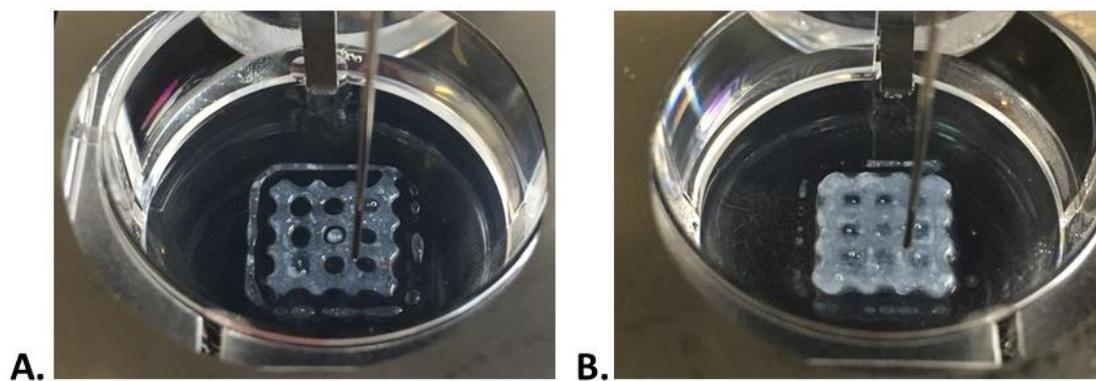
Figure 76: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ à 25°C



**Figure 77: Etude de stabilité de gels de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ extrudés**

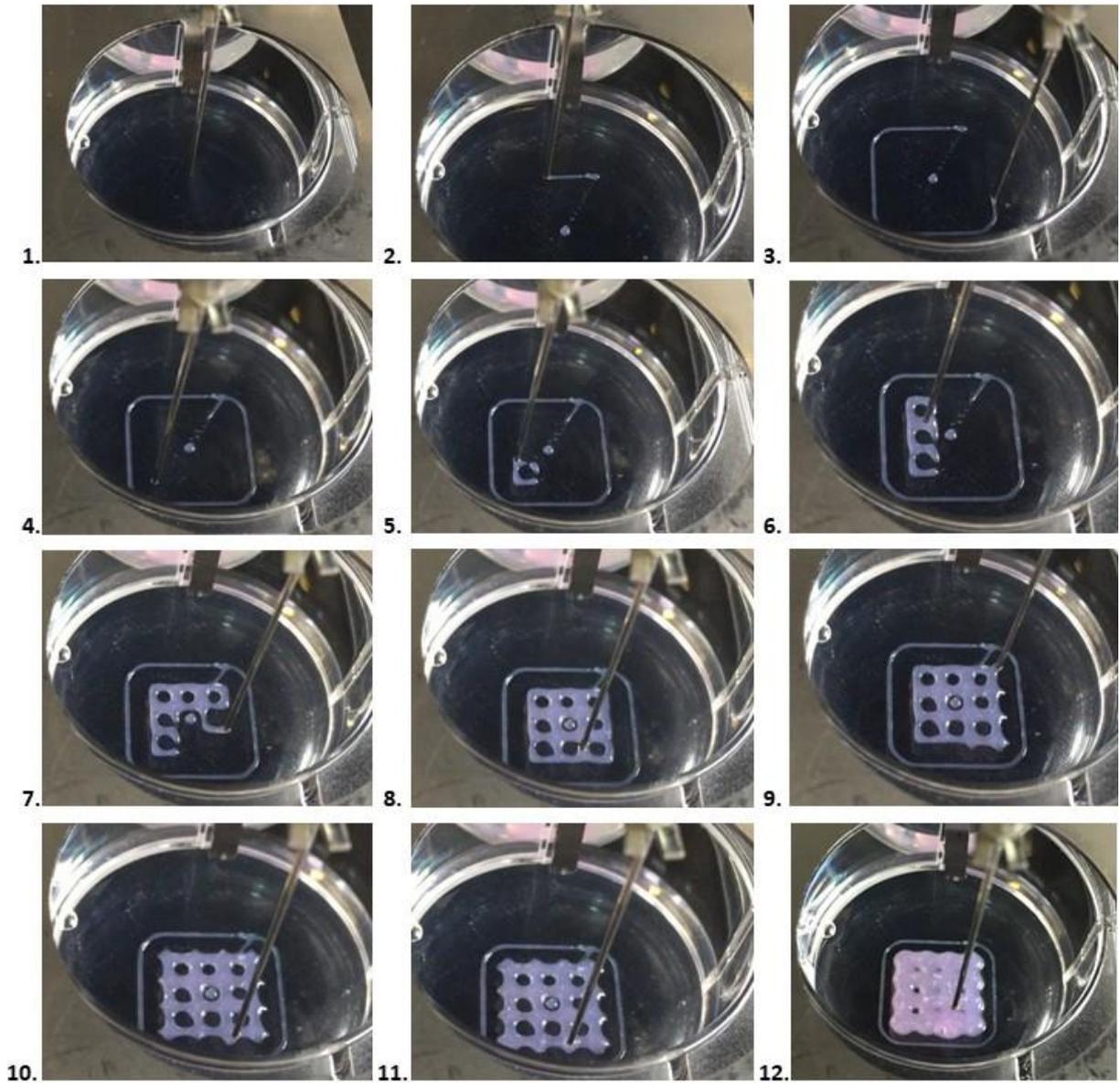
*Observation de gels extrudés par le pousse seringue dans des piluliers de verre. La moitié des gels est recouvert de DMEM. L'ensemble des échantillons son incubés 21j à 37°C. Après 21j, les impressions s'aplatissent légèrement mais conservent leurs formes 3D. Quelques filaments dans le milieux de culture peuvent témoigner d'une légère dégradation des constructions.*

Des tests d'impression à l'aide de la bioimprimante ont par la suite été réalisés sur des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9% et diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+. Dans les deux cas, l'extrusion a été possible avec les paramètres de la bioimprimante. Les gels présentaient une extrusion continue et ont permis d'imprimer des structures complètes. Les modèles de grilles choisis étaient imprimés couche par couche sur 5 niveaux. Un intervalle de temps de 3min entre chaque couche a été respecté pour laisser le temps au gel de reprendre en masse. La **Figure 78** et la **Figure 79** illustrent respectivement l'impression des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9% et de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+.



**Figure 78: Impression d'une grille à partir d'une encre de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9%**

*A. Grille après 1 couche imprimée. B. Grille après 5 couches imprimées.*



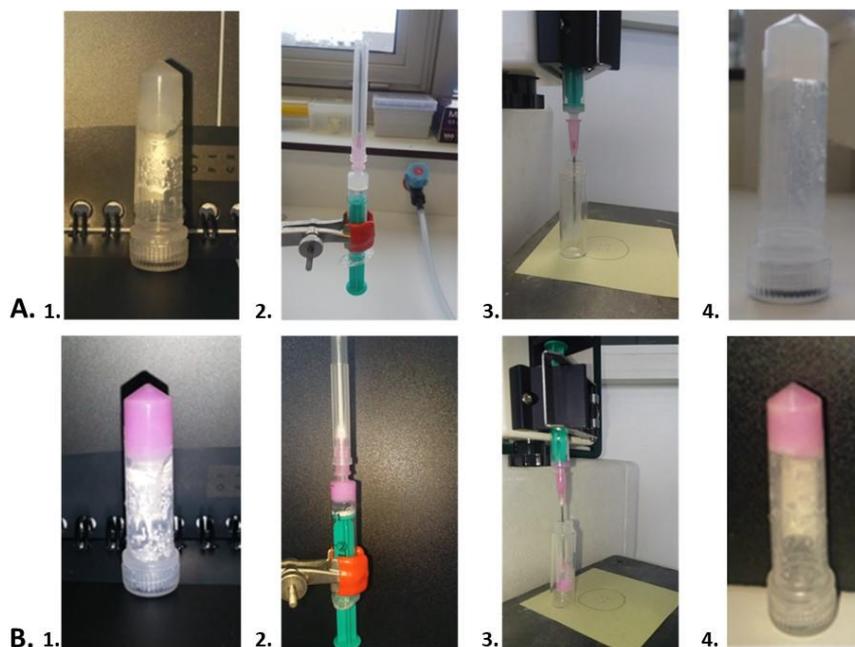
**Figure 79: Impression étape par étape de la 1ère couche d'une grille à partir d'une encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+**

**1.** Détermination du point zéro d'impression sur l'axe Z. **2.-3.** Démarrage de l'impression par une ligne de contournement, permettant de chasser l'air de l'aiguille et d'obtenir une extrusion continue de l'encre **4.** Fin d'impression de la ligne de contournement **5.** Impression du premier pore. **6.** Fin d'impression de la première colonne **7.-8.** Impression des autres pores **9.-10.** Impression des arrêtes de la grille **11.** Fin d'impression de la première couche de la grille. La couche suivante sera imprimée à partir du point d'arrêt de l'impression après un temps de latence de 3min **12.** Fin d'impression d'une grille à 5 couches.

## 1.5 diC<sub>16</sub>dC

La diC<sub>16</sub>dC a été formulée initialement à une concentration de 2% dans une solution de NaCl 0,9% (154mM) comme décrit par Alies *et al.* (105). Pour dissoudre totalement la diC<sub>16</sub>dC, un temps de chauffage de 30 min à 60°C était nécessaire. Le mélange gélifiait alors rapidement, en moins de 5min, à température ambiante. Le même protocole a été appliqué pour former un gel de diC<sub>16</sub>dC 2% DMEM@+ (**Figure 80-1.**). Ces gels formés étaient facilement prélevés après liquéfaction par chauffage à 60°C et reprenaient très rapidement en seringue (<5min). Une fois extrudés, à l'aide du pousse-seringue électrique, les gels reprenaient également très rapidement en masse (<5min) (**Figure 80-2-4.**).

En utilisant le même protocole, il a également été possible de formuler des gels de diC<sub>16</sub>dC à des concentrations de 1,5 et 3%, dans le NaCl 0,9% et le DMEM@+. Ceux-ci présentaient des cinétiques de gélification et des capacités d'extrusion similaires à ceux formés à 2%.



**Figure 80: Formation et extrusion de gels de diC<sub>16</sub>dC 2% DMEM@+**

**A.** Gel de diC<sub>16</sub>dC 2% NaCl 0,9% **B.** Gel de diC<sub>16</sub>dC 2% DMEM@+ **1.** Gélification dans un tube à centrifuger **2.** Reformation en seringue après chauffage **3.** Extrusion à l'aide du pousse-seringue **4.** Reformation du gel extrudé.

La caractérisation rhéologique des gels formés avec la diC<sub>16</sub>dC à 25°C, a confirmé la présence d'un gel avec des G' toujours supérieurs aux G'' tout au long des expériences (**Tableau VI** à **Tableau VIII**). Pour les gels formés dans le NaCl 0,9%, une augmentation croissante des modules était observée lorsque la concentration en diC<sub>16</sub>dC était augmentée : environ 900, 1000 puis 2500 Pa pour les concentrations de 1,5, 2 et 3% respectivement. Formulés dans le DMEM@+, ces modules étaient diminués de près de

moitié pour les gels à 1,5 et 3%, ce qui n'était pas le cas des gels à 2% qui étaient augmentés (passage de 1000 à 1200Pa).

Formés dans les deux milieux et aux trois concentrations d'étude, des profils thixotropes étaient observés pour l'ensemble des gels formés dans la diC<sub>16</sub>dC (**Figure Annexe 11** à **Figure Annexe 16**, pages 229-234). Le temps de reprise des modules variait de 25 à 44 min. Concernant les températures sol-gel, elles étaient légèrement diminuées pour les gels formés dans le DMEM@+ par rapport à ceux formés dans le NaCl 0,9%. La concentration en diC<sub>16</sub>dC n'impactait pas la température sol-gel (mesurée entre 39,6°C et 41,2°C).

**Tableau VI: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dC 1,5% NaCl 0,9% et DMEM@+ à 25°C**

<b>diC<sub>16</sub>dC 1,5% NaCl 0,9%</b>				
<b>Mesures rhéologiques</b>	<b>T°</b>	<b>G' (Pa) ± σ</b>	<b>G'' (Pa) ± σ</b>	<b>Observations</b>
<b>LVER</b> G' G' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	706 ± 43	343 ± 262	Contrainte de rupture : 2,0% Croisement G'/G'' : 25,0%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)		894 ± 95	246 ± 27	-
<b>Propriétés thixotropes</b>		677 ± 13	178 ± 9	Retours aux modules initiaux : 31 ± 10 min
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	41,2°C
<b>diC<sub>16</sub>dC 1,5% DMEM@+</b>				
<b>Mesures rhéologiques</b>	<b>T°</b>	<b>G' (Pa) ± σ</b>	<b>G'' (Pa) ± σ</b>	<b>Observations</b>
<b>LVER</b> G' G' vs shear strain (γ)	25°C	351 ± 18	123 ± 2	Contrainte de rupture : 1,0% Croisement G'/G'' : 7,9%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)		492 ± 41	170 ± 12	-
<b>Propriétés thixotropes</b>		165	65	Retour aux modules initiaux : 39min
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	39,6°C

Tableau VII: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dC 2% NaCl 0,9% et DMEM@+ à 25°C

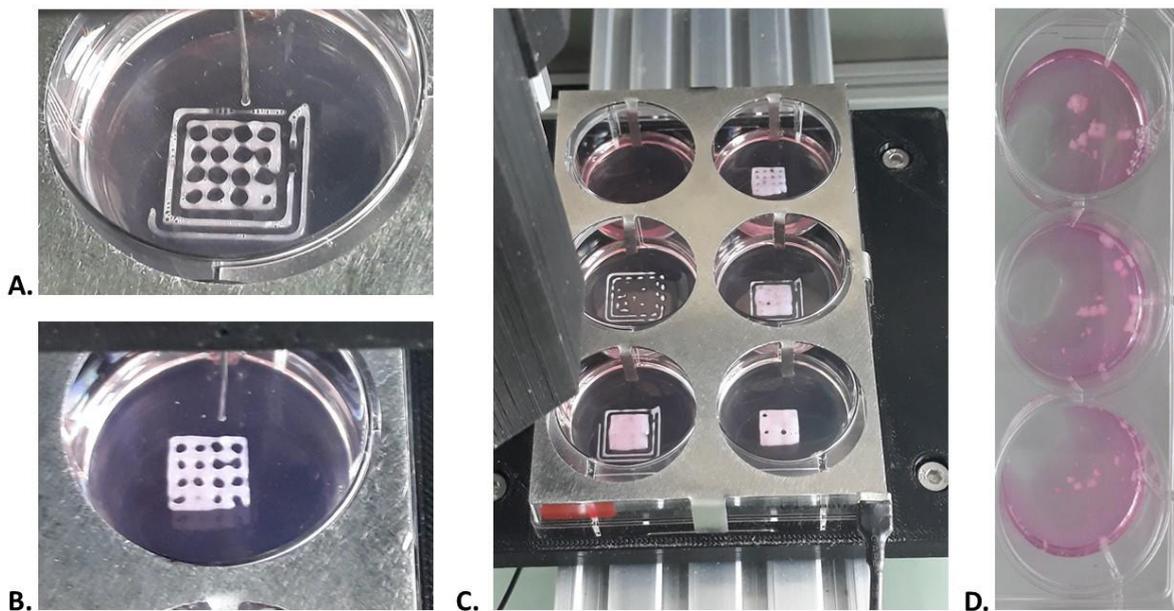
diC <sub>16</sub> dC 2% NaCl 0,9%				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations
<b>LVER</b> G' G'' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	1271 ± 45	367±12	Contrainte de rupture : 1,4% Croisement G'/G'' : 20,0%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)		991 ± 168	294± 48	-
<b>Propriétés thixotropes</b>		1076 ± 82	154 ± 61	Retours aux modules initiaux : 43 ± 5min
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	40,9°C
diC <sub>16</sub> dC 2% DMEM@+				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations
<b>LVER</b> G' G'' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	1217 ± 54	435 ± 8	Contrainte de rupture : 0,5% Croisement G'/G'' : 5,0%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)		1195 ± 549	479 ± 200	-
<b>Propriétés thixotropes</b>		267 ± 11	69 ± 6	Retours aux modules initiaux : 32 ± 1min
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	39,9°C

Tableau VIII: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dC 3% NaCl 0,9% et DMEM@+ à 25°C

diC <sub>16</sub> dC 3% NaCl 0,9%				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations
<b>LVER</b> G' G'' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	2229 ± 1336	713 ± 360	Contrainte de rupture : 0,9% Croisement G'/G'' : 12,6%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)		2510 ± 256	748 ± 62	-
<b>Propriétés thixotropes</b>		3022 ± 168	881 ± 49	Retours aux modules initiaux : 44 ± 8 min
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	40,4°C
diC <sub>16</sub> dC 3% DMEM@+				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations
<b>LVER</b> G' G'' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	1357 ± 166	439 ± 42	Contrainte de rupture : 0,8% Croisement G'/G'' : 3,2%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)		1394 ± 122	440 ± 31	-
<b>Propriétés thixotropes</b>		1036 ± 128	380 ± 52	Retours aux modules initiaux : 25 ± 13 min
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	40,3°C

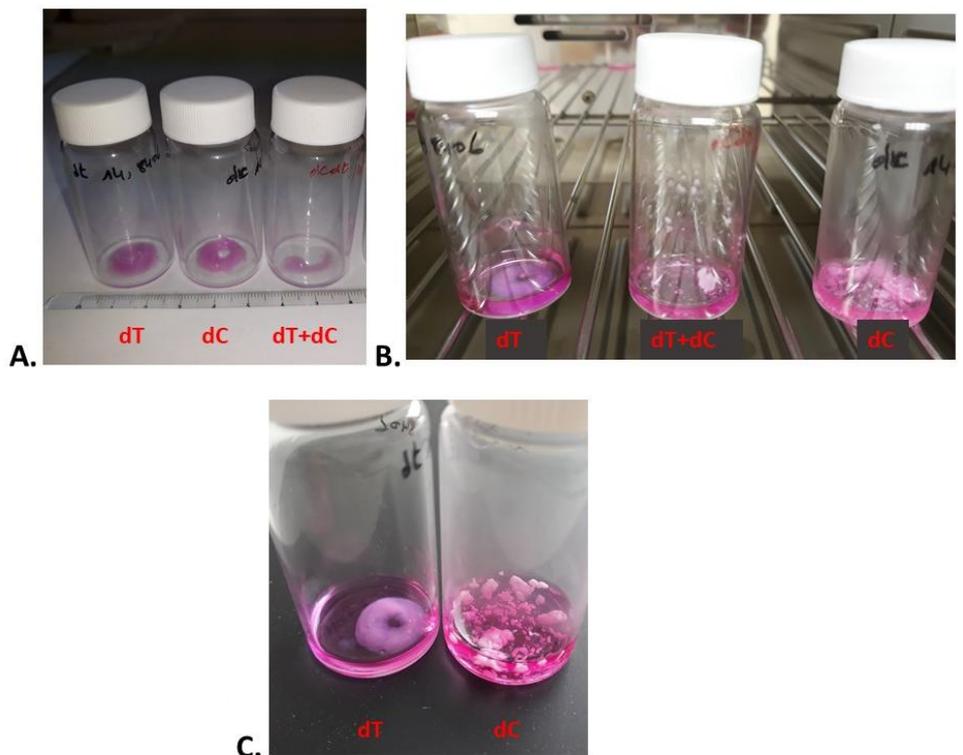
Des tests d'impression ont été réalisés avec des gels de diC<sub>16</sub>dC 3% DMEM@+ et ont permis de former plusieurs grilles (**Figure 81**). Il est à noter que durant ces tests, un modèle de grille 4x4 a été utilisé. Cependant, le gel testé ne permettait pas d'atteindre la résolution souhaitée, la plupart des pores ayant fusionnés à la fin de l'expérience. De façon surprenante, les grilles recouvertes de DMEM et incubées à 37°C se sont toutes délitées en moins de 24h (**Figure 81 D.**).

Cette expérience a été mimée, comme ce qui avait été réalisé pour la diC<sub>16</sub>dT, en extrudant à l'aide du pousse seringue, des gels de diC<sub>16</sub>dC 3% DMEM@+ dans des piluliers de verre. Un témoin diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ ainsi qu'un gel hybride diC<sub>16</sub>dT 1,5% diC<sub>16</sub>dC 1,5% DMEM@+ ont également été extrudés en parallèle. Recouverte de DMEM et incubée à 37°C, les constructions formées de diC<sub>16</sub>dC se sont délitées 3h environ après incubation (**Figure 82**).



**Figure 81: Impression d'un gel de diC<sub>16</sub>dC 3% DMEM@+**

*A. Impression de la première couche d'une grille 4x4. B. Grille imprimée après 3 couches. C. Observation des 5 grilles imprimées. D. Grilles conservées dans du DMEM, incubées à 37°C puis observées à J1.*



**Figure 82: Test de stabilité de gels de diC<sub>16</sub>dC et dT extrudés**

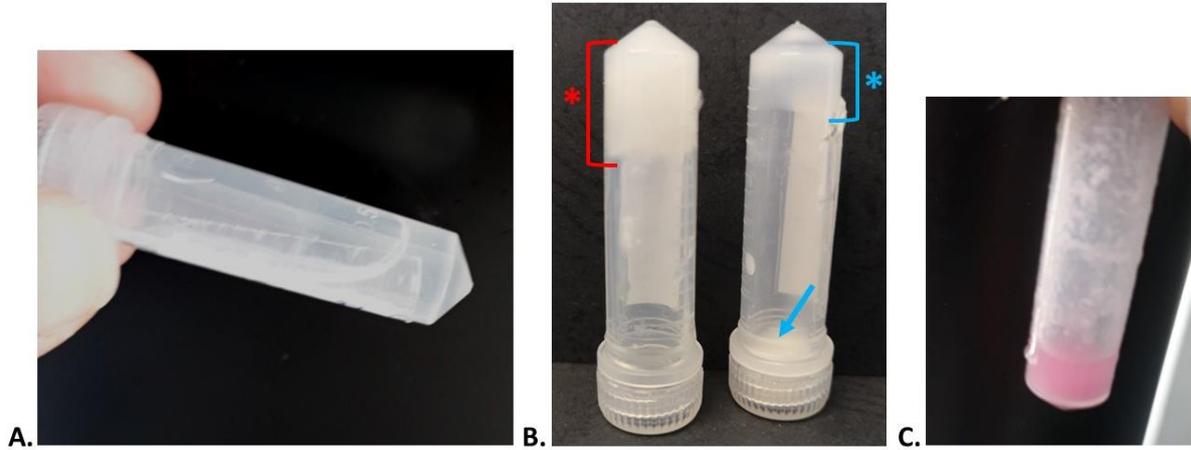
**A.** Extrusion dans des piluliers de verre, à l'aide du pousse seringue, de trois gels : diC<sub>16</sub>dT 1,5% DMEM@+; diC<sub>16</sub>dC 1,5% DMEM@+; un mélange 50/50 de diC<sub>16</sub>dT 1,5% DMEM@+ et de diC<sub>16</sub>dC 1,5% DMEM@+. Les gels sont ensuite recouverts de 2ml de DMEM. **B.** Observation des gels 3h après incubation à 37°C. Le gel de diC<sub>16</sub>dT était intact contrairement au gel de diC<sub>16</sub>dC et du mélange diC<sub>16</sub>dC/diC<sub>16</sub>dT. **C.** Zoom sur les gels de diC<sub>16</sub>dT et diC<sub>16</sub>dC.

## 1.6 diC<sub>16</sub>dG

L'analogue diC<sub>16</sub>dG a été évalué comme molécule gélatrice à 3% dans l'eau Milli-Q®, chauffé à une température de 60°C. Aucun gel n'a été obtenu malgré la solubilisation apparente de la poudre de diC<sub>16</sub>dG. L'ajout d'un passage au bain à ultrasons n'a pas non plus permis de former de gel. Plusieurs protocoles ont été tentés en renouvelant les cycles de chauffage, de bain à ultrasons, de temps de repos à température ambiante ou réfrigérée. La gélification des échantillons n'a jamais été observée (**Figure 83 A.**).

Alies *et al.* ont publié la formation de gels à 10% dans de l'eau Milli-Q® (105), mais la diC<sub>16</sub>dG ne gélifiait pas dans des milieux salins (NaCl 154mM). C'est pourquoi plusieurs essais ont été réalisés en augmentant la concentration de nos mélanges à 5, 10 et 12% de diC<sub>16</sub>dG. Une apparente augmentation de viscosité des échantillons en augmentant la concentration en diC<sub>16</sub>dG a été observée, mais l'obtention d'un gel n'a pu être reproduite, même en apportant les modifications au protocole de préparation précédemment citées (**Figure 83 B.**).

En parallèle, des essais avaient été menés pour la formation de diC<sub>16</sub>dG 3% dans du DMEM. La poudre de diC<sub>16</sub>dG ne semblait pas soluble à 60°C. Pour cela, il a fallu augmenter la température de chauffage du mélange. Malgré des températures croissantes de 60 °C à 80°C et l'utilisation d'un bain à ultrasons, aucun gel n'a été formé de cette manière (**Figure 83 C.**).



**Figure 83: Essais de gélification d'échantillons de diC<sub>16</sub>dG**

**A.** Mélange de diC<sub>16</sub>dG 3% et d'eau Milli-Q®. Après plusieurs variations du protocole, le mélange reste toujours liquide. **B.** A gauche (astérisque et colonne rouge) gel de diC<sub>16</sub>dT 3% eau Milli-Q® ; à droite, échantillon de diC<sub>16</sub>dG 5% et d'eau Milli-Q® qui présente une certaine viscosité mais ne forme pas de gel (un reste du mélange est dans le fond du tube (astérisque et colonne bleue), l'autre partie est dans le bouchon (flèche bleue)). **C.** Mélange de diC<sub>16</sub>dG 3% DMEM n'ayant pas gélifié.

## II. Choix d'une molécule gélatrice: comparaison des encres formulées

Les GNL et NL étudiés ont été choisis pour plusieurs raisons. Ces molécules amphiphiles sont bioinspirées (combinaison synthétique d'unités biologiques), biocompatibles, possèdent des propriétés gélatrices et ont des capacités à mimer la MEC favorables à la culture cellulaire (100–102,105,110) La première partie des présents travaux consistait à sélectionner, parmi ces molécules, celle qui permettrait de former une encre de biomatériaux dans du milieu de culture DMEM et dont les propriétés rhéologiques permettraient l'impression par extrusion de formes tridimensionnelles. Les résultats de cette étude sont résumés dans le **Tableau IX**, page 158.

Le **DMEM** est un milieu de culture composé principalement de glucides, d'acides aminés, d'électrolytes et de vitamines (**Tableau Annexe I**, page 235). Cette composition complexe pourrait interférer dans le processus de gélification. La transposition, de la formation d'un gel en présence d'eau Milli-Q® ou de NaCl 0,9%, vers la formation d'un hydrogel dans le DMEM pourrait s'avérer difficile. Parmi les 6 molécules candidates, seule la diC<sub>16</sub>dG n'a pas été formée dans le milieu de culture malgré plusieurs variations dans le protocole de préparation. Outre la composition du DMEM pouvant entrer en jeu, la diC<sub>16</sub>dG présente une gélification différente de celle de la diC<sub>16</sub>dT et la diC<sub>16</sub>dC comme le rapportent *Alies et al.* (105). En effet, sa gélification n'a pas été observée en présence de NaCl 154mM, ni à 123,5mM dans nos propres expériences. Le changement de base nucléique engendrant un encombrement stérique différent, serait à l'origine de ces différences (105).

Dans le but de former une bioencre contenant des cellules, le **protocole de formation de l'encre** de biomatériaux dans le DMEM se devait d'être le plus simple possible et notamment d'éviter tout stress aux cellules. Les cellules étant sensibles à des variations de température importante, plusieurs essais ont été menés afin de permettre l'obtention d'hydrogels à des températures ne provoquant pas de chocs thermiques aux cellules. Aucune des molécules n'a présenté une gélification à température comprise entre 20 et 37°C. Toutes les molécules nécessitaient un chauffage préalable pour être solubilisées dans le DMEM : GNF (65°C), GNBA-BU (80°C), GNBA-BE (55°C), diC<sub>16</sub>dT (65°C), diC<sub>16</sub>dC (60°C). Ce chauffage ne permettait donc pas d'envisager par la suite un mélange direct entre la molécule gélatrice et les cellules pour former une bioencre en seule une étape. Deux possibilités pouvaient alors être envisagées : ajouter les cellules durant la phase de refroidissement du mélange et avant la formation de l'hydrogel, ou réchauffer un hydrogel préformé à une température proche de sa température sol-gel, pour le rendre plus liquide, avant d'ajouter des cellules. La seconde méthode apparaissait la plus simple, ne nécessitant pas un suivi de température en continu. La température sol-gel des molécules de diC<sub>16</sub>dT (39°C) et diC<sub>16</sub>dC (40°C) proche de la température physiologique ainsi que leur cinétique de reprise de 3 à 5 minutes apparaissait alors comme un avantage certain. Elles étaient

préférables notamment en regard des hydrogels de GNBA-BU ayant une température sol-gel plus élevée (63,9°C dans le NaCl 0,9%, non mesurable dans le DMEM au cours de nos expérimentations) et une reprise en masse trop rapide, inférieure à 2 minutes, rendant plus complexe la possibilité d'y incorporer des cellules.

Indépendamment de la température de chauffage, en considérant les protocoles de formation des hydrogels dans leur globalité, le GNF et le GNBA-BE avaient un processus de gélification variable et long, passant notamment par une étape de réfrigération obligatoire de plusieurs heures pour le GNF. A l'inverse, les hydrogels de GNBA-BU, diC<sub>16</sub>dT, diC<sub>16</sub>dC se formaient très rapidement en peu d'étapes après simple chauffage.

Concernant les **propriétés rhéologiques**, les hydrogels formés à partir de GNL étaient plus consistants que les hydrogels formés par les NL. En effet, les modules G' étaient de plus de 25000 Pa pour les hydrogels formés à partir de GNBA-BU (1,5%), près de 8000 Pa pour le GNF (3%), et d'environ 1500 Pa pour la diC<sub>16</sub>dT (3%) et diC<sub>16</sub>dC (3%). L'ajout d'un sucre dans la structure chimique et l'augmentation du nombre de liaisons possibles entre les molécules en était potentiellement la raison. Une tendance observée au cours de nos expérimentations était l'augmentation des modules des hydrogels lorsque la température de caractérisation passait de 25°C à 37°C. Cette observation a pu être constatée pour la diC<sub>16</sub>dT (x1,3) et le GNBA-BU (x1,5) et pourrait être le reflet d'une déshydratation progressive.

La rigidité d'une matrice d'hydrogel conditionne la niche que l'on souhaite reproduire ainsi que le devenir des cellules qui la composent (132,133). En effet, les **niches de CSH** sont des microenvironnements spécialisés localisés dans la moelle osseuse. La structure tridimensionnelle complexe et constituée de multiples types cellulaires permet aux CSH de conserver leur état cellulaire quiescent et, en réponse à un stimuli physiologique, de modifier leur activité et d'entraîner leur différenciation. Les niches de CSH sont composées de tissus de rigidité croissante, allant de la moelle et des tissus adipeux (<1 kPa) aux tissus périvasculaires (1-3 kPa), s'entourant de l'ostéoïde (30 kPa) puis d'un tissu osseux (>100 kPa) (132,197,207). Selon certains auteurs, la localisation des CSH au sein des niches évoluerait en fonction de leur activité : à l'état quiescent elles seraient retrouvées au contact du tissu osseux ; à l'état actif elles seraient localisées près des tissus périvasculaire (208). C'est pourquoi, l'objectif de reproduire un tissu favorable au développement et à la différenciation de CSH par bioimpression semble pouvoir s'atteindre par le biais de biomatériaux ayant les caractéristiques d'un tissu mou à semi-rigide (<3 kPa). Parmi les hydrogels formulés, ceux obtenus à partir de diC<sub>16</sub>dT et de diC<sub>16</sub>dC présentaient les modules plus proches de cet objectif.

L'ensemble des hydrogels formés par les molécules candidates ont présentés un **profil de type thixotrope**, propriété essentielle afin de permettre la formation de structures 3D post-impression. La cinétique de reprise des modules G' et G'' était également un facteur important car il conditionne le

temps nécessaire au processus de bioimpression. La diC<sub>16</sub>dT a présenté la cinétique de reprise la plus courte (11min) contrairement au GNF (32min), la diC<sub>16</sub>dC (39min) et le GNBA-BU (78min). Cependant, ces capacités thixotropes n'ont pas systématiquement été constatées pour tous les hydrogels lors des **tests d'extrusion à la seringue**. En effet, dans le cas des GNL, la formation en seringue puis l'extrusion n'ont pas ou peu permis la reformation d'un hydrogel contrairement aux NL.

Outre la capacité à être extrudées manuellement, les encres de biomatériaux devaient pouvoir être **extrudées par la bioimprimante**, combinant ainsi des propriétés rhéofluidifiantes et thixotropes. Des tests standardisés évaluant les capacités d'impression n'existent pas (78). C'est pourquoi, la capacité des encres de biomatériaux à former des filaments en continu, permettant de suivre les mouvements de l'imprimante et de réaliser un dépôt homogène a été évaluée. Les **contraintes de déformation**, correspondent aux contraintes mécaniques qu'il est nécessaire d'appliquer pour obtenir un écoulement des hydrogels. Évaluées graphiquement sur les rhéogrammes de LVER, les contraintes de déformation étaient proches pour l'ensemble des hydrogels (0,5-3,2%), permettant une extrusion des hydrogels en conservant des paramètres d'impression relativement identiques d'un hydrogel à l'autre. Néanmoins, la diC<sub>16</sub>dT et la diC<sub>16</sub>dC ont été les seules molécules dont les hydrogels ont pu être imprimés sous forme de filaments continus et former des constructions tridimensionnelles sous forme de grilles de 3 à 5 niveaux de hauteur. Dans le cas du GNF et du GNBA-BE, l'extrusion des hydrogels formaient des gouttes à l'extrémité des aiguilles et ne permettait pas de former des constructions de façon continue.

Prédire les propriétés d'extrusion d'hydrogels à partir des données obtenues par leur caractérisation rhéologiques n'est pas chose aisée comme le rapportent Paxton *et al.* (188). En effet, leur étude portant sur la détermination de l'imprimabilité par extrusion de quatre types d'encres différentes, était scindée en deux parties : évaluation des capacités d'impression par extrusion manuelle, puis caractérisation rhéologique basée sur la mesure de viscosité et l'évaluation de trois paramètres (contrainte de déformation, détermination des capacités rhéofluidifiantes, mesure des capacités thixotropes). L'ensemble de ces mesures permettait de définir, pour chaque échantillon, une fenêtre d'imprimabilité (force d'extrusion à appliquer en fonction du diamètre interne de l'aiguille). Malgré une apparente relation entre le profil de viscosité (démonstration de capacité rhéofluidifiantes) et l'extrusion sous forme de filaments en continu pour la plupart des échantillons, un gel de poloxamer 407 à 20% ne permettait pas d'établir cette relation. Paxton *et al.* concluaient donc sur l'importance de mener l'évaluation mécanique et rhéologique de façon conjointe.

La possibilité d'extrusion des encres de diC<sub>16</sub>dT et de diC<sub>16</sub>dC ( $G' = 1500$  et  $1400$  Pa respectivement) sous forme de filament continu, contrairement aux encres de GNF et de GNBA-BE ( $G' = 7700$  et  $27000$  Pa) peut amener à chercher une relation entre la mesure des modules  $G'$  et  $G''$  et les capacités d'extrusion des encres. D'après les observations de Paxton *et al.*, cette relation ne pourrait être établie.

En effet, la crème Nivea utilisée comme encre témoin ( $G' = 4500$  Pa (209)) et les encres de poloxamer 407 à 25 et 30% ( $G' = 10000$  Pa et  $12000$  Pa respectivement (210)) étaient imprimables sous forme de filaments. L'encre de poloxamer 407 à 20% ( $G' = 9000$  Pa (210)), présentait une extrusion sous forme de filaments, alternant avec des extrusions sous forme de gouttes. Ces observations nous montrent qu'il n'était pas possible dans nos expérimentations de prévoir la non extrusion sous forme de filaments des hydrogels de GNF et de GNBA-BE d'après la détermination de leurs modules.

Concernant la stabilité des grilles imprimées, les grilles de diC<sub>16</sub>dT se sont avérées stables sur plus d'une vingtaine de jours. Cela n'a pas été le cas de la diC<sub>16</sub>dC dont les structures se sont délitées en quelques heures. A ce jour, nous ne pouvons fournir d'explications à la différence de stabilité de ces deux types de structures formées dans les mêmes conditions opératoires. Les hydrogels de diC<sub>16</sub>dC formés dans nos tubes à centrifuger, non recouverts de milieu de culture, ont présenté une stabilité physique de plusieurs jours voire plusieurs semaines. C'est donc l'étape d'incubation des structures dans du DMEM, à 37°C qui semble à l'origine des perturbations observées.

Pour conclure, parmi les 3 GNL et 3 NL testés, notre choix s'est porté sur la diC<sub>16</sub>dT comme molécule gélatrice entrant dans la formulation d'une bioencre. En effet, les hydrogels de diC<sub>16</sub>dT remplissaient l'ensemble des premiers critères de sélection fixés : formulation d'hydrogels dans le DMEM, processus de formation simple, capacités rhéofluidifiantes et thixotropes, modules <3 kPa, capacité à être imprimée. A ce jour, peu de bioencres comptent dans leur formulation, un LMWG, et, à notre connaissance, aucune n'intègre de NL. L'utilisation des hydrogels de diC<sub>16</sub>dT comme matrice de culture cellulaire n'avait également jamais été expérimentée. L'étape suivante consistait donc à étudier le devenir de cellules dans les hydrogels de diC<sub>16</sub>dT et à étudier l'impact des cellules sur les propriétés précédemment citées de ces hydrogels.

Tableau IX: Récapitulatif des manipulations réalisées pour la sélection d'une molécule candidate

Molécule candidate	Milieu	C (%)	Formulation	Cinétique de gélification	Caractérisation rhéologique			Capacité d'extrusion (manuelle)	Capacité d'impression (*)	Stabilité dans le temps	
					T°	YS (%)	Modules (Pa)				Thixotropie
GNF	DMEM	1	Difficile	1-3h à 4°C	25°C	1,4	G' = 5571 G'' = 747	15 min	-	Non imprimable	-
		3			1,3	G' = 7685 G'' = 1207	32 min	-	Faible	-	
GNBA-BU	DMEM	1,5	Simple	2 min à T° amb	25°C	1,0	G' = 26877 G'' = 4028	77 min	NC	Non imprimable	-
		37°C			0,9	G' = 41213 G'' = 4672	78 min	-	-	-	
GNBA-BE	DMEM	1,5	Très difficile	> 10h à T° amb	25°C	-	-	-	-	Non extrudable	Non imprimable
		37°C			2,0	G' = 1993 G'' = 762	31 min	-	-	-	
diC <sub>1</sub> edT	DMEM@+	3	Simple	3-5min à T° amb	25°C	3,2	G' = 1527 G'' = 398	11 min	39,3°C	Extrudable	Stabilité > 21j
		DMEM@+ 1,5			1,0	G' = 492 G'' = 170	39 min	39,6°C	-	-	
diC <sub>1</sub> edC	DMEM@+	2	Simple	< 5min à T° amb	25°C	0,5	G' = 1195 G'' = 479	32 min	39,9°C	Extrudable	-
		DMEM@+ 3			0,8	G' = 1394 G'' = 440	25 min	40,3°C	Imprimable	Instabilité après 3h	
diC <sub>1</sub> edG	DMEM	3	Non formé	-	-	-	-	-	-	-	

C= Concentration ; YS= contrainte de déformation (yield stress) ; NC= résultats non conformes ; « - » = non mesuré ; (\*) Capacité d'impression à l'aide de la bioimprimante par extrusion. L'objectif recherché était l'extrusion d'un filament en continu.

# Partie 2 : La diC<sub>16</sub>dT dans la formulation d'encre et bioencre

## I. Caractérisation de l'encre de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ et de son impression

La diC<sub>16</sub>dT a été choisie comme molécule candidate pour la suite de notre étude, notamment vis-à-vis de ses propriétés rhéologiques. En effet, les capacités rhéofluidifiantes, permettant une extrusion des encres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+, ont été constatées lors des précédents essais d'injection et d'impression. Elles ont également été confirmées en réalisant des mesures de viscosité. Les courbes observées étaient typiques d'un fluide non newtonien, et une diminution progressive de la viscosité des encres soumises à une augmentation constante de la vitesse de cisaillement a été observée (**Figure Annexe 17**, page 236).

Une caractérisation rhéologique supplémentaire a été réalisée afin d'évaluer l'impact de l'étape d'extrusion sur les encres. Après extrusion, à température ambiante, les encres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ exprimaient des modules 3 fois plus faibles, passant de près de 1500Pa (cf. **Tableau V**, page 143) à 470 Pa environ (**Tableau X**, **Figure 84**).

**Tableau X : Caractérisation rhéologique des encres de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9% et DMEM@+ après extrusion**

diC <sub>16</sub> dT 3% NaCl 0,9% Après extrusion				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations et mesures
<b>LVER</b> G' G' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	1901 ± 282	747 ± 74	Contrainte de rupture : 0,8% Croisement G'/G'' : 8,0%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)	25°C	1723 ± 640	576 ± 171	-
<b>Propriétés thixotropes</b>	25°C	1006 ± 310	397 ± 84	Retours aux modules initiaux : 13 ± 14min
diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ Après extrusion				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations et mesures
<b>LVER</b> G' G' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	394	131	Contrainte de rupture : 1,6% Croisement G'/G'' : 3,2%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)	25°C	468 ± 27	135 ± 5	-
	37°C	153 ± 5	53 ± 6	-
<b>Propriétés thixotropes</b>	25°C	Décroissance constante, pas de retours aux modules initiaux		
	37°C	2586 ± 66	966 ± 144	Retours aux modules initiaux : 52 ± 3min

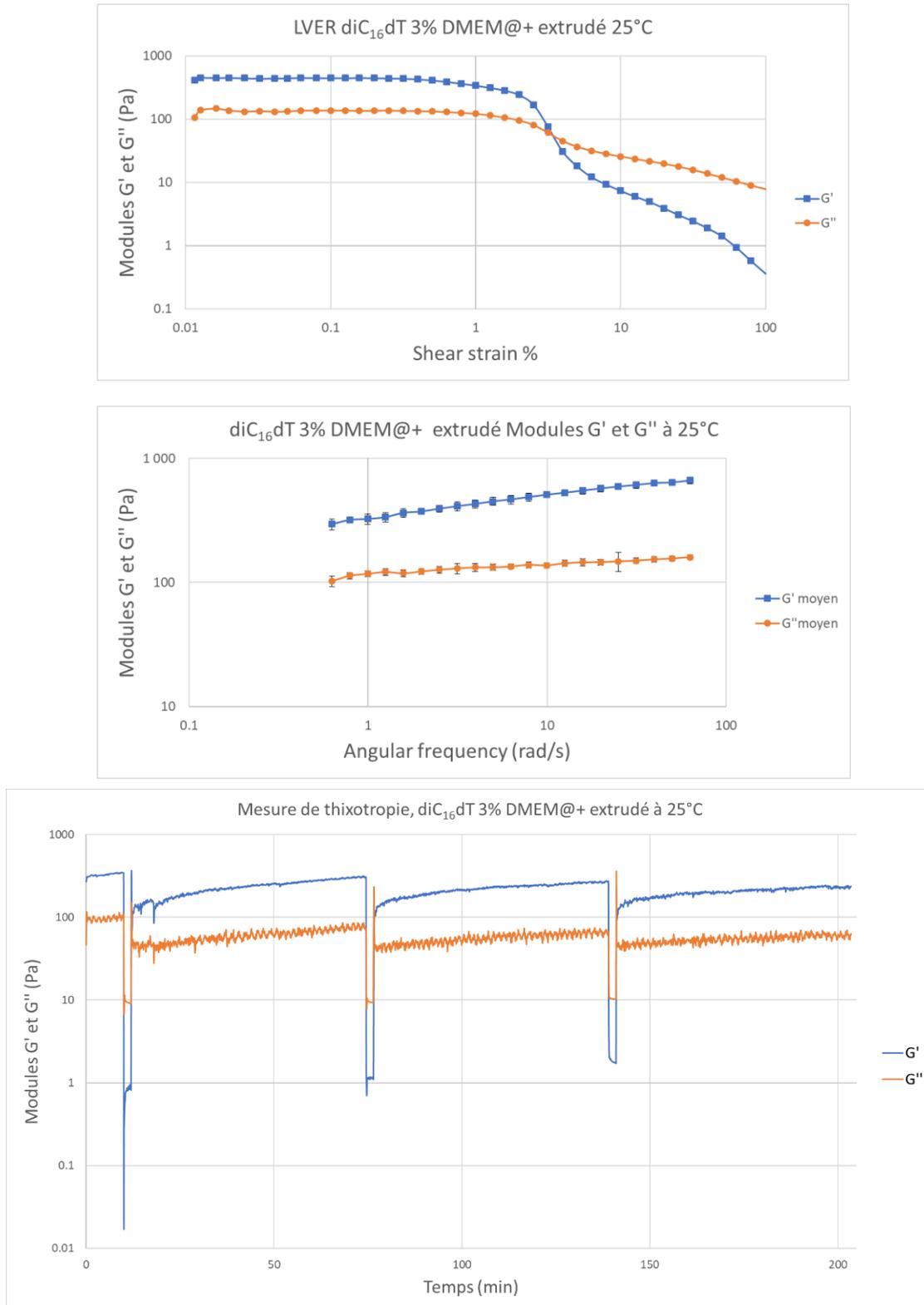


Figure 84: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ extrudés à 25°C et 37°C

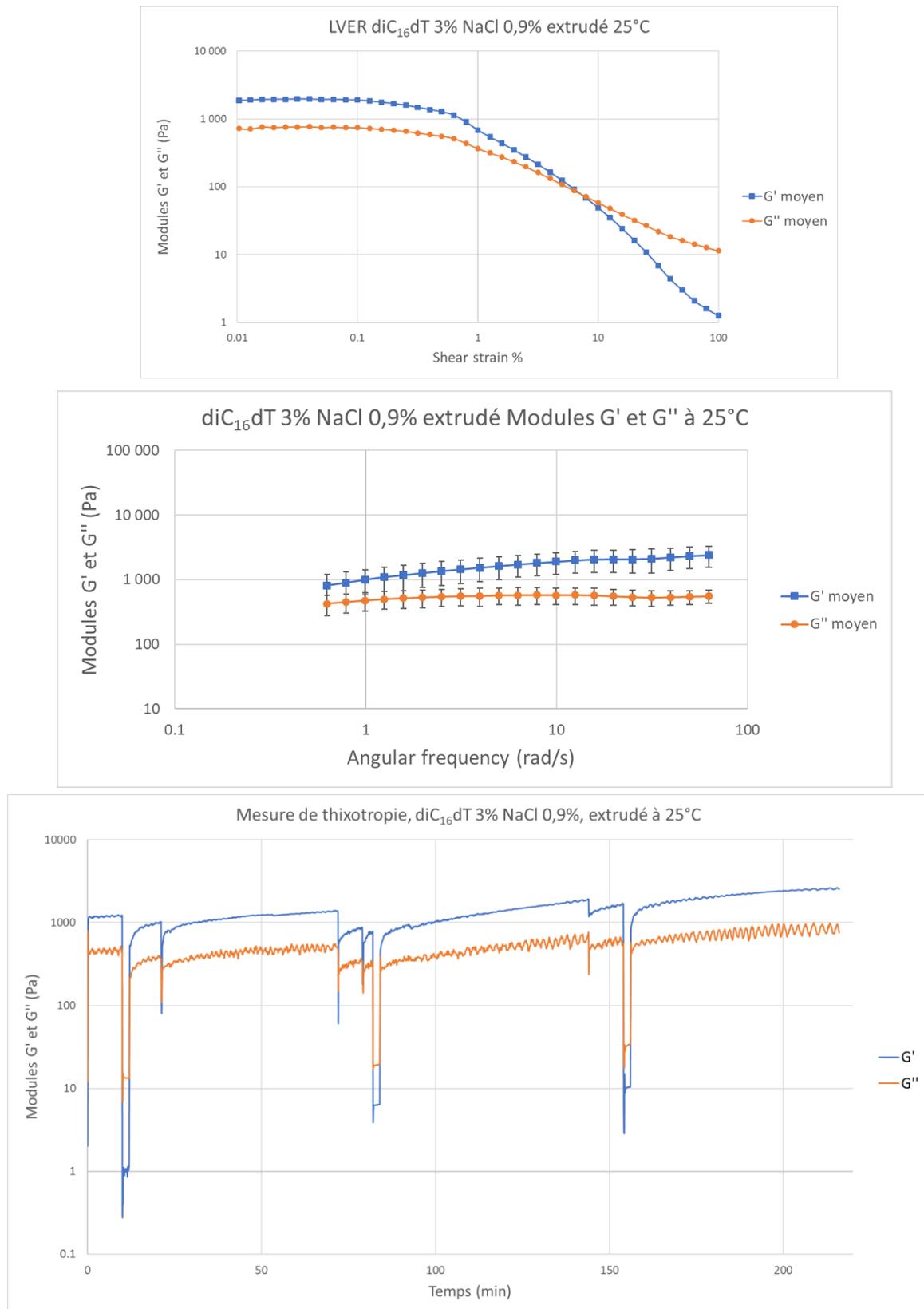


Figure 85: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% NaCl 0,9%, extrudés à 25°C

Cette diminution était plus importante que celle observée pour les gels formés dans le NaCl 0,9% : 1900 Pa avant extrusion, 1700 Pa après extrusion (**Figure 85**). Mesurés à 37°C, les modules de l'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ étaient encore plus faibles et passaient à une valeur d'environ 150Pa. Lors de la détermination des propriétés thixotropes à 25°C, les valeurs des modules observés avant contrainte n'étaient pas atteintes au bout d'une heure de mesure. De plus, à chaque cycle, les modules diminuaient en valeurs. Un profil thixotrope a cependant été constaté à 37°C, similaire à celui observé dans les mêmes conditions sans extrusion, mais avec un temps de reprise allongé (52 min contre 31min) (**Figure Annexe 18**, page 237). Ainsi, ces résultats démontrent que l'étape d'extrusion a un impact significatif sur les encres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ en abaissant notamment la valeur des modules.

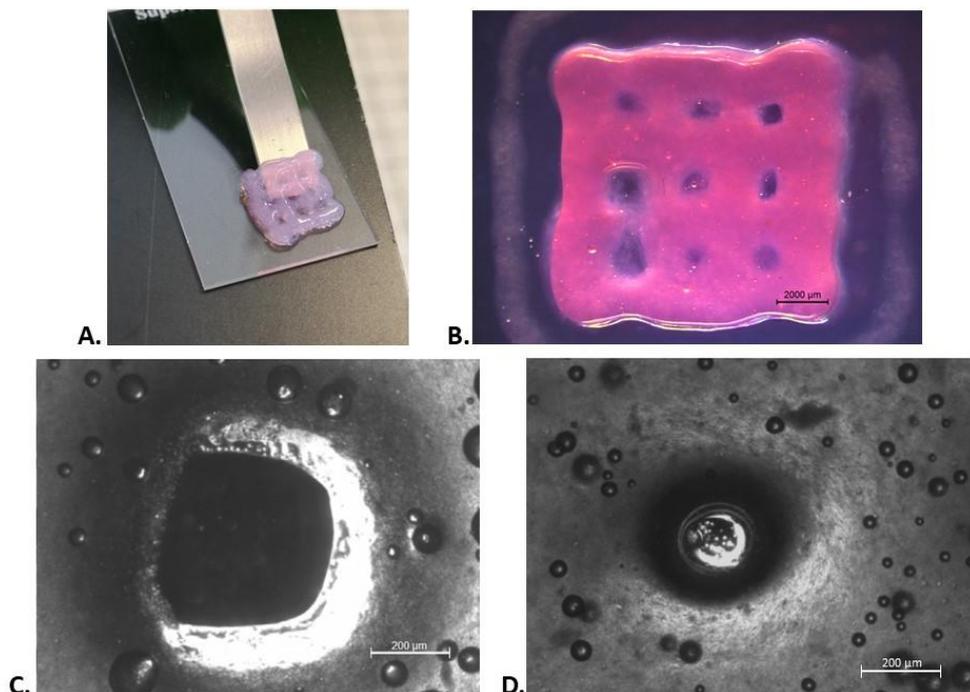
Les modèles de grilles sont couramment utilisés lors des études de bioimpression (75,122,127,128,190,211,212). Ces modèles poreux facilitent les échanges entre les cellules contenues dans les constructions et le milieu de culture dans lequel sont incubées les grilles. De plus, la diffusion des éléments nutritifs peut s'avérer limitée à quelques centaines de µm si les constructions ne sont pas pourvues d'un réseau vascularisé (213).

Afin de déterminer la reproductibilité d'impression de l'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+, cinq grilles de modèle 12x12mm de 9 pores à 3 niveaux ont été imprimées. L'observation des grilles a permis de constater que leur forme était similaire tout au long des expériences menées. En outre, lors de leur manipulation, elles présentaient également une certaine souplesse et avaient la possibilité d'être manipulées (**Figure 86 A.**). Les examens réalisés à l'aide d'une loupe binoculaire (**Figure 86 B.**) et par un microscope optique (**Figure 86 C. et D.**) ont permis d'évaluer pour chaque grille les longueurs des brins, les distances inter-brins et de calculer leur porosité. L'ensemble des résultats sont reportés dans le **Tableau Annexe II** (distance inter-brin) page 238 et le **Tableau Annexe III** (volume des pores et calcul de la porosité) page 239.

La reproductibilité des objets imprimés à partir de l'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ a été démontrée. En effet, les distances entre chaque brin vertical et horizontal étaient statistiquement similaires d'une grille à l'autre (Kruskal-Wallis :  $H = 3,83 < \alpha = 9,49$ ), avec une moyenne de  $2,98 \pm 0,14$  mm pour une distance théorique de 3 mm. Certains des pores observés montraient une diminution de leur lumière (**Figure 86 D.**), voire une obstruction qui pourrait s'expliquer de deux manières. D'un côté, l'impression de couches successives les unes sur les autres provoque une fusion de l'encre, un affaissement naturel des couches inférieures par gravité et une diffusion de l'encre aux intersections (214). Cette observation est en lien direct avec les propriétés rhéologiques de l'encre. De l'autre, la trajectoire de l'aiguille au cours du processus d'impression effectuée, de façon aléatoire, des passages secondaires sur des zones déjà imprimées, provoquant un entrainement de l'encre qui n'a pas totalement gélifié de nouveau. Ces observations expliquent ainsi le choix du modèle conique de détermination du volume

des pores. Malgré ces inconvénients, le volume moyen des 9 pores mesurés pour chaque grille et la porosité calculée étaient similaires d'une construction à l'autre (ANOVA :  $p > 0,05$  ; Kruskal-Wallis :  $H_4 < \alpha 9,49$ , respectivement). Le volume moyen des pores était de  $1,63 \pm 0,46 \text{ mm}^3$  (volume théorique de  $4,62 \text{ mm}^3$ ) et la porosité totale du réseau (volume total des pores / volume total du réseau) était de  $8,61 \pm 2,29\%$  (porosité théorique de 36 %).

Ainsi, les dimensions et la porosité étaient conservées dans toutes les structures imprimées, démontrant la reproductibilité des constructions réalisées à partir de l'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+. Ces résultats permettaient alors d'envisager une incorporation des cellules au sein de l'encre et leur développement au sein des grilles bioimprimées.



**Figure 86: Evaluation de la reproductibilité d'impression de grilles à partir d'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+**

**A.** Retrait d'une grille imprimée depuis sa plaque 6 puits et dépôt sur une lame de verre. Les grilles imprimées peuvent être facilement manipulées et présentent une certaine souplesse. **B.** Grille observée à la loupe binoculaire (grossissement  $\times 0,8$ , échelle de  $2000 \mu\text{m}$ ). **C.** Observation microscopique de la lumière d'un pore (grossissement  $\times 2,5$ , échelle de  $200 \mu\text{m}$ ), l'épaisseur de la grille est facilement distinguable. **D.** Certains pores ont une lumière partiellement obstruée voire bouchée.

## II. Impact du changement de milieu de culture dans la formulation d'encres de diC<sub>16</sub>dT

L'objectif final du projet Multiprint vise à imprimer conjointement plusieurs types cellulaires : CSH, CSM, CSE. Cependant, chaque type cellulaire possède une exigence qui lui est propre en termes d'apports nutritifs et nécessiteront donc une adaptation de l'encre pour y répondre.

Les CSM peuvent être cultivées dans le DMEM, les CSE sont cultivées dans l'IMDM et les CSH dans du Stemspan. L'IMDM est un milieu de culture similaire au DMEM (215) mais dont la composition varie au niveau de la présence et la quantité de certains acides aminés, électrolytes et vitamines (216). Le Stemspan est un milieu développé spécifiquement pour la culture de CSH et composé majoritairement d'IMDM (217). L'IMDM et le Stemspan varient par la présence dans le Stemspan de sérum-albumine bovine, d'insuline recombinante humaine, de transferrine humaine et de 2-mercaptoethanol. La composition précise de ces trois milieux est détaillée dans le **Tableau Annexe I**, page 235. Ces milieux sont commercialisés sans facteurs de croissance, cytokines et molécules annexes qui doivent être ajoutés avant utilisation. Dans le cadre de projet, l'unité 1035 a développé une formule de Stemspan, appelée Stemspan complet (StemspanC), et adaptée à la croissance des CSH. De même, des travaux préliminaires menés par cette équipe (travaux non publiés) ont permis de définir un mélange de milieux de culture de proportions adéquates à la culture simultanée des trois types cellulaires (CSH, CSE et CSM) : DMEM 50%, IMDM 25%, StemspanC 25%.

Des tests de formulation d'encre dans ces différents milieux ont ainsi été débutés en commençant par le StemspanC. Le Stemspan contient une quantité de NaCl inférieure à celle du DMEM (4500 mg/L - 77,7 mol/L vs 6500 mg/L - 110 mmol/L). Un protocole de formation similaire à celui utilisé pour former l'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ a été employé en conservant le même apport supplémentaire en NaCl : 70% de Stemspan, 30% de NaCl 0,9% (StemspanC@+). Après chauffage à 65°C pendant 15min, le mélange a permis la formation en une dizaine de minutes à température ambiante d'un hydrogel (**Figure 87**).

Gels de diC<sub>16</sub>dT 3% formés dans:

1. DMEM @+
2. StemspanC @+
3. D<sub>50</sub>S<sub>25</sub>I<sub>25</sub>\* @+

\*= DMEM 50%, StemspanC 25%,  
IMDM 25%  
@+ = 70 % milieu + 30% NaCl 0,9%

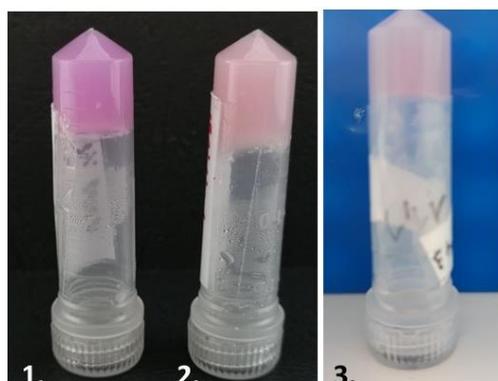


Figure 87: Formation de gels de diC<sub>16</sub>dT 3% dans différents milieux

Les mesures d'osmolalité réalisées sur les encres de diC<sub>16</sub>dT 3% Stemspan@+ montraient une osmolalité similaire à celles obtenues dans le DMEM@+, compatibles avec la culture cellulaire (**Tableau XI**). De plus, les encres formulées dans le StemspanC avaient un pH similaire par rapport au milieu d'origine contrairement aux encres de DMEM@+ (**Tableau XII**). Cette observation confirme donc les remarques faites précédemment sur l'absence de milieu tampon HEPES dans le DMEM contrairement au Stemspan.

Lors des tests d'extrusion en seringue, les encres formulées dans le Stemspan@+ présentaient des difficultés à se reformer en seringue avec un temps de reprise très long, près de 24h. Une fois extrudés, les échantillons n'ont pas repris en masse.

**Tableau XI: Mesure de l'osmolalité du milieu de culture Stemspan**

Milieu	Concentration en NaCl	Osmolalité
DMEM@+ (70/30 DMEM/NaCl 0,9% aqueux)	123,5 mM	304 mOsm
Stemspan	77,67 mM	302 mOsm
Stemspan @+ (70/30 DMEM/NaCl 0,9% aqueux)	100,57 mM	294 mOsm

**Tableau XII: Mesure de pH d'un gel de diC<sub>16</sub>dT 3% StemspanC**

Echantillon	pH	Ecart type
StemspanC	7,7	< 0,1
diC <sub>16</sub> dT 3% StemspanC	7,9	< 0,1

De la même manière, le mélange de DMEM 50%, IMDM 25%, StemspanC 25% a été réalisé avec un ajout de NaCl dans les mêmes proportions (D<sub>50</sub>SC<sub>25</sub>I<sub>25</sub>@+). Un protocole de chauffage à 65°C avec un temps allongé à 30min, pour solubiliser totalement la diC<sub>16</sub>dT, a permis la formation de l'encre (**Figure 87**). Une fois extrudée, l'encre a repris en masse.

La caractérisation rhéologique des encres de diC<sub>16</sub>dT 3% StemspanC@+ et de diC<sub>16</sub>dT D<sub>50</sub>SC<sub>25</sub>I<sub>25</sub>@+ est reportée dans le **Tableau XIII**. Les encres formulées dans le StemspanC@+ présentaient des modules de plus de 3000 Pa, plus importants que ceux formés dans les mêmes conditions dans le DMEM@+ (cf. **Tableau V**, page 143). La T° sol-gel mesurée de 39,6°C était inchangée par rapport aux encres formulées dans le DMEM@+. Un profil thixotrope était également observé (**Figure Annexe 26**, page 248). Cependant, l'échantillon extrudé à la seringue n'a pas repris sa forme gélifiée.

Dans le cas des encres de D<sub>50</sub>SC<sub>25</sub>I<sub>25</sub> @+, les modules diminuaient de façon importante (253 Pa). Un profil thixotrope était observé (**Figure Annexe 27**, page 249). Les encres extrudées reprenaient en masse après injection.

**Tableau XIII : Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% formés dans le StemspanC@+ et le mélange D<sub>50</sub>SC<sub>25</sub>I<sub>25</sub> @+ à 25°C**

diC <sub>16</sub> dT 3% StemspanC@+				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations et mesures
<b>LVER</b> G' G' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	2748 ± 91	416 ± 32	Contrainte de rupture : 0,7% Croisement G'/G'' : 2,0%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)	25°C	3336 ± 241	540 ± 49	-
<b>Propriétés thixotropes</b>	25°C	1329 ± 80	227 ± 21-	Retours aux modules initiaux : 38 + 6min
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	39,6°C -
diC <sub>16</sub> dT D <sub>50</sub> SC <sub>25</sub> I <sub>25</sub> @+				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations et mesures
<b>LVER</b> G' G' vs shear strain (γ)	25°C	256 ± 1	72 ± 7	Contrainte de rupture : 0,6% Croisement G'/G'' : 2,0%
<b>Modules</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)	25°C	253 ± 34	97 ± 12	
<b>Propriétés thixotropes</b>	25°C	316 ± 29	130 ± 6	Retours aux modules initiaux : 5 ± 2min

Les différences de résultats obtenus au cours des tests menés sur les encres formées dans le StemspanC@+ et le D<sub>50</sub>SC<sub>25</sub>I<sub>25</sub> @+ sont inattendues. Comme nous le précisions précédemment en évoquant les travaux de Paxton *et al.* (188), la relation entre l'évaluation rhéologique et les tests d'extrusion réalisés n'est pas aisée. Elle l'est encore moins lorsque les mécanismes de gélification impliquent des liaisons non covalentes, faibles et réversibles, qui peuvent être déstabilisées du fait de la composition complexe des milieux aqueux utilisés. Une investigation plus approfondie devra être reconduite pour établir des conclusions quant aux caractéristiques rhéologiques de ces encres.

Si ces modules se confirment, leurs valeurs inférieures à 3000 Pa s'avèreraient satisfaisante vis-à-vis de l'objectif fixé et des exigences des cellules souches. Des tests d'impression permettront également d'évaluer leur possibilité d'impression.

Au cours de cette étude, une autre observation a été faite lors de l'ajout de sérum de veau fœtal (SVF) à 10% dans du milieu de culture StemspanC fourni par l'U1035. Le SVF est le sérum le plus couramment utilisé en culture cellulaire. Il est ajouté en complément des milieux de référence pour favoriser une croissance optimale de plusieurs types de cellules en raison de son contenu nutritionnel élevé et de la présence de facteurs de croissance. Sa composition est complexe et peut être variable d'un lot ou d'un fournisseur à l'autre. Bien que la composition totale ne soit pas exactement connue, il est décrit que

le SVF contient en majorité des protéines, des facteurs de croissance, des vitamines, des oligo-éléments et des hormones (218,219).

Les mélanges de diC<sub>16</sub>dT 3% StemspanC@+ SVF 10% n'ont pas permis de former un hydrogel contrairement à ce même mélange dépourvu de SVF, confirmant nos suppositions. Le SVF interfère dans la formation des gels en perturbant la solubilité de la diC<sub>16</sub>dT.

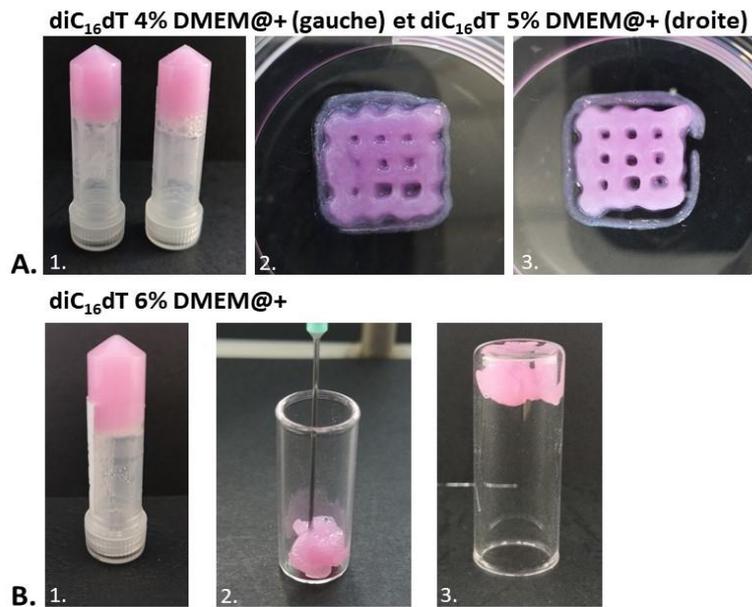
Des essais ont été menés pour savoir si une diminution de la concentration en SVF permettrait de former des hydrogels. A 5% de SVF, les échantillons de diC<sub>16</sub>dT 3% StemspanC@+ n'ont pas gélifiés. Les mêmes observations ont été faites en diminuant la concentration de SVF à 2%. En parallèle, des hydrogels de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ en présence de 5% de SVF ont pu être formés mais avec beaucoup plus de difficultés, en renouvelant notamment plusieurs fois les cycles de chauffage.

Ainsi, cette étude nous montre toute la complexité à former des gels à partir de milieux de culture. A l'heure actuelle il n'est pas possible de dire quel serait le composant du SVF à l'origine des problèmes de gélification. Le SVF est cependant indispensable à la culture des trois types cellulaires et sera rajouté aux milieux de cultures utilisés. Il serait intéressant d'utiliser des approches permettant d'apporter du SVF, tout en n'interférant pas avec la gélification de la diC<sub>16</sub>dT. Une des possibilités est d'envisager d'encapsuler le SVF dans une forme nano- ou micro-particulaire pour en ensuite le libérer au sein de la forme imprimée.

### III. Impact de la variation de la concentration de la molécule gélatrice sur les propriétés rhéologiques de l'encre de diC<sub>16</sub>dT

En utilisant un protocole identique à celui utilisé pour la formulation d'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+, il a été possible de formuler des encres à 4,5 et 6% (**Figure 88**). Celles-ci ont démontré des capacités d'extrusion et ont pu facilement être imprimées. Par rapport aux encres à 3%, la consistance des gels était constatée visuellement. Par exemple, l'extrusion des encres à 6% permettait aux échantillons de gélifier quasi instantanément, alors qu'un repos d'au moins une minute était nécessaire à 3%. De même, en comparant l'aspect des grilles imprimées à 4 et 5%, il était constaté que les lumières des pores étaient plus importantes et l'effet d'affaissement était plus limité (cf. **Figure 86**, page 164). Cependant, la mesure de porosité des grilles formées à 4 et 5% n'a pas été réalisée pour être comparée à celles des grilles à 3%.

La concentration de 3% a été la valeur pour laquelle les encres et bioencres de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ ont été caractérisées (cf. IV. Etude *in vitro* de la bioencre, page 171). En fonction du type cellulaire étudié, la création d'une niche particulière pourrait nécessiter des milieux d'une dureté plus importante. Cet objectif pourrait être atteint en augmentant la concentration en molécule gélatrice (78,85). C'est pourquoi, une étude de formulation d'encres à des concentrations de 4 à 6% a été menée.



**Figure 88: Formation de gels de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ à des concentrations de 4,5 et 6%**  
*Les gels diC<sub>16</sub>dT formés à des concentrations de 4 (A.1. gauche et 2.) et 5% (A.1. droite et 3.) permettent l'impression de grilles 5 couches. Les gels formés à 6% (B.1.) sont également facilement extrudables et reprennent immédiatement en masse (B.2 et 3.).*

Les encres formées à 4,5 et 6% ont été caractérisées sur le plan rhéologique. L'ensemble des résultats sont reportés dans les **Tableau XIV** à **Tableau XVI** et dans les **Figure Annexe 19** à **Figure Annexe 24**, pages 240-245. En considérant la détermination des modules, peu de différences entre les encres à 3% (1945 Pa, cf. **Tableau V**, page 143) et 4% (2033 Pa) à 25°C ont été constatées. Cet écart était plus important à 5% (2400 Pa), mais de façon surprenante, les encres formées à 6% voyaient leurs modules abaissés à 1833 Pa. De même, la caractérisation à 37°C montrait une augmentation des modules des encres à 3%. C'est également le cas pour les encres à 4% pour lesquelles les modules étaient multipliés par 1,5. Néanmoins, les modules étaient maintenus dans le cas des encres à 5% et diminués pour celles à 6%.

En considérant les propriétés thixotropes, le profil de l'encre à 6% (**Figure Annexe 24**, page 245) observé était plus linéaire que celui obtenu à 3% (cf. **Figure 76**, page 145) et les modules étaient récupérés plus rapidement. Cela allait dans le sens des observations faites lors des essais d'injection avec une encre à 6% reprenant quasi-instantanément après injection. Il avait été déterminé que l'injection avait un impact non négligeable sur les encres à 3%, faisant chuter leurs modules. La même constatation a été faite sur les encres à 4% avec une diminution de près d'1/4 des valeurs de modules.

Ainsi, formuler des encres à des concentrations supérieures, permet d'améliorer les propriétés d'impression en augmentant la valeur des modules. Cependant, la variabilité observée lors de la mesure des modules, peut s'expliquer par le fait que ces caractérisations n'ont pas été réalisées le

même jour, ni avec les mêmes sources de diC<sub>16</sub>dT. De plus, ces évaluations n'ont pas pu être répétées suffisamment contrairement aux encres à 3%.

Comme il a été évoqué précédemment, le choix de la concentration en molécule gélifiante, influe sur la rigidité des bioencres. Dans notre cas, il serait judicieux d'ajuster ce paramètre en fonction des besoins qui seront exprimés par les cellules étudiées (CSH, CSM, CSE) et la précision des constructions bioimprimées (78,85,220).

**Tableau XIV: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 4% DMEM@+, avant et après extrusion, à 25°C et 37°C**

diC <sub>16</sub> dT 4% DMEM@				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations et mesures
<b>LVER gels non extrudés</b> G' G' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	1468	569	Contrainte de rupture : 0,6% Croisement G'/G'' : 2,5%
<b>Modules gels non extrudés</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)	25°C	2033 ± 181	747 ± 52	-
	37°C	3009 ± 773	1356 ± 220	-
<b>LVER gels extrudés</b> G' G' vs shear strain (γ)	25°C	313	91	Inflexion : 0,3% Croisement : 8,0%
<b>Modules gels extrudés</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)	25°C	1463 ± 567	498 ± 177	-
	37°C	2039 ± 398	640 ± 95	-
<b>Propriétés thixotropes gels extrudés</b>	25°C	974 ± 678	344 ± 226	Retour aux modules initiaux : 45 min
	37°C	Décroissance constante, pas de retours aux modules initiaux		

**Tableau XV: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 5% DMEM@+, avant extrusion, à 25°C et 37°C**

diC <sub>16</sub> dT 5% DMEM@				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations et mesures
<b>LVER</b> G' G' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	1794	674	Contrainte de rupture : 5,0% Croisement G'/G'' : 16,0%
<b>Modules gels non extrudés</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)	25°C	2408 ± 231	867 ± 70	-
	37°C	2425 ± 898	1013 ± 329	-

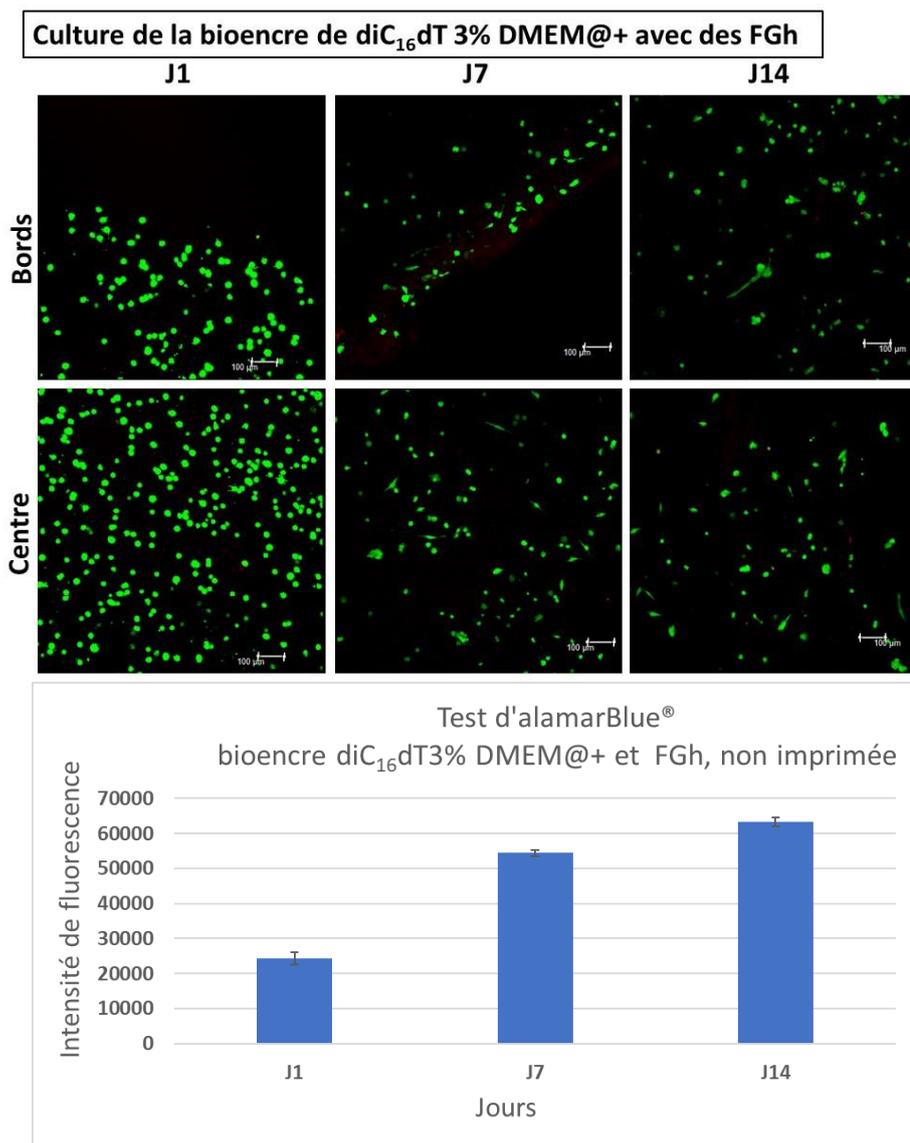
Tableau XVI: Caractérisation rhéologique des gels de diC<sub>16</sub>dT 6% DMEM@+, avant extrusion, à 25°C et 37°C

diC <sub>16</sub> dT 6% DMEM@				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations et mesures
<b>LVER</b> <b>gels non extrudés</b> G' G' vs déformation de cisaillement (γ)	25°C	1804	720	Contrainte de rupture : 0,5% Croisement G'/G'' : 1,3%
<b>Modules</b> <b>gels non extrudés</b> G' G'' vs fréquence angulaire (f)	25°C	1833 ± 36	726 ± 10	-
	37°C	753 ± 390	181 ± 93	-
<b>Propriétés thixotropes</b> <b>gels non extrudés</b>	25°C	1984 ± 48	736 ± 180	Retours aux modules initiaux : 7 ± 3min
	37°C	Décroissance constante, pas de retours aux modules initiaux		

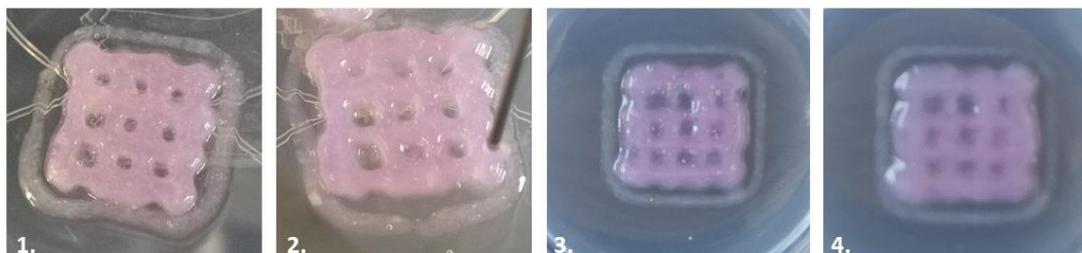
#### IV. Etude *in vitro* de la bioencres

L'ajout de cellules à des encres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ a été aisément accompli par simple chauffage, facilité notamment par une température sol-gel peu élevée de 39°C. Un essai préliminaire de viabilité a été réalisé en mettant en culture des cellules FGh au sein de la bioencres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+. Ce mélange, non imprimé, a démontré une viabilité cellulaire tout au long des 14 jours d'étude (**Figure 89**). A J1, les FGh avaient une forme bien ronde, liée au stress de leur manipulation (étape de trypsination), à leur encapsulation au sein de l'encre. Cette forme était progressivement remplacée par une forme plus allongée (J14) (c'est-à-dire leur forme conventionnelle en culture 2D). Les tests réalisés par alamarBlue® confirmaient également le maintien d'une activité cellulaire au cours de l'étude (**Figure 89**).

Dans la littérature, des études ont démontré que les cellules FGh et SCAPs étaient résistantes aux contraintes de cisaillement et à la pression exercées lors des processus d'impression par extrusion (221–223). Dans notre étude, les bioencres chargées en FGh et SCAPs ont pu facilement être mis en seringue. Les mélanges ont rapidement repris un état solide de gel et ont pu être bioimprimés. L'extrusion des bioencres n'a pas nécessité d'ajustements des paramètres d'impression de la bioimprimante par rapport à l'encre de biomatériaux. Lors de chaque essai, il a été possible de former plusieurs grilles de 3 niveaux dans des plaques de culture cellulaire (**Figure 90**).



**Figure 89: Mise en culture de la bioencre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ chargée en FGh, non extrudée**  
La bioencre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ chargée avec 10<sup>6</sup> FGh/ml a été incubée durant 14j. Suivi à J1, J7, J14 de la viabilité par test LIVE/DEAD® (Haut) et de l'activité cellulaire par test AlamarBlue® (bas). Au cours du test LIVE/DEAD®, les cellules vivantes sont en vert, les mortes en rouge. Les FGh présentent une bonne viabilité et activité tout au long de l'étude, malgré la forme ronde conservée plusieurs jours.



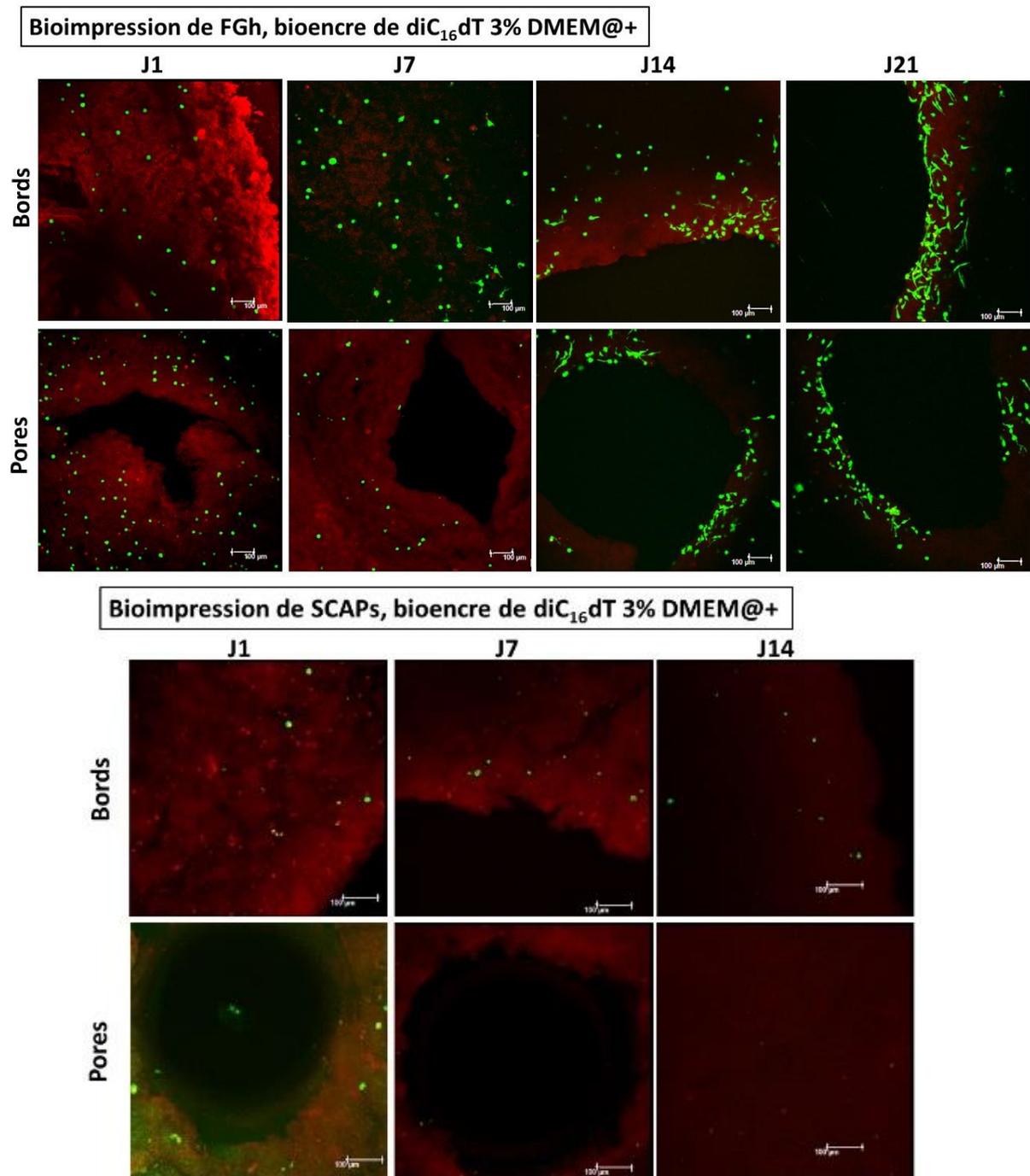
**Figure 90: Exemples de grilles bioimprimées de 3 niveaux à partir d'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ chargées en FGh (1.-2.) ou SCAPs (3.-4.)**

Les grilles formées étaient ensuite recouvertes d'un mélange de DMEM, de SVF et d'antibiotiques puis incubées à 37°C (cf.III.2, page 115).

La viabilité des FGh en post-impression a été évaluée à 93% à J1. Cette viabilité a été maintenue tout au long de l'étude, 91% à J7, 95% à J14, avec une légère baisse à 86% à J21. (**Figure 91**). Les tests d'AlamarBlue® confirmaient ces données de viabilité avec une augmentation progressive et importante de l'activité cellulaire. L'intensité de la fluorescence avait plus que triplé à J14 par rapport à J1 (**Figure 92**). L'ensemble de ces résultats étaient statistiquement significatifs ( $p < 0,05$ ). Comme observé dans les tests préliminaires, les FGh conservaient une forme ronde aux premiers jours d'étude (J1). Progressivement, des changements morphologiques s'opéraient, les FGh s'étalant (J7) et récupérant, pour certains, un aspect fusiforme (J14). Les FGh s'étaient notamment sur les bords ainsi que les pores des grilles, et en épousaient progressivement les contours (J21). Il est normal de retrouver les cellules à ces endroits stratégiques car ce sont les lieux où les échanges entre milieu de culture et cellules sont les plus importants.

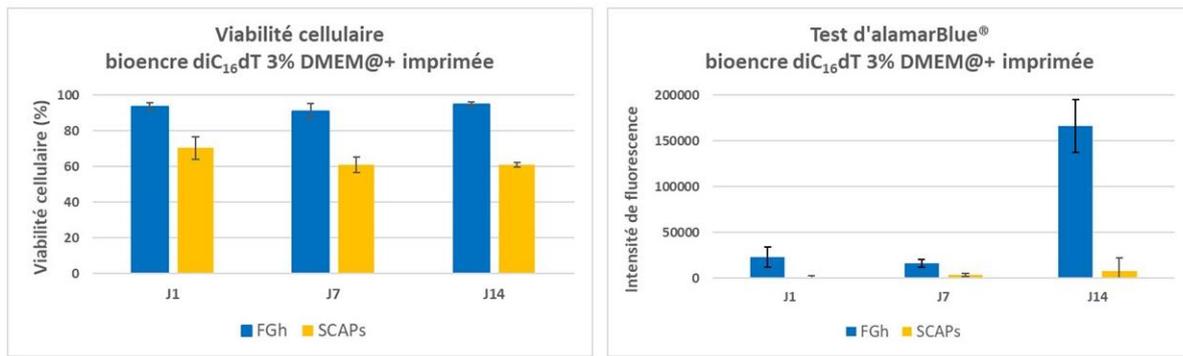
On peut supposer que l'étalement progressif et la prolifération des cellules au sein du gel serait dû aux modifications des propriétés viscoélastiques après l'incorporation de cellules. Ces modifications ont déjà été décrites pour les hydrogels d'alginate, de méthacrylate de gélatine et d'agarose (55,224,225). Dans ces études, les variations à long terme des propriétés des constructions étaient principalement dues à la prolifération et à la migration des cellules, conduisant au remodelage des matrices d'hydrogel.

A ce jour, aucun travail de bioimpression utilisant des FGh n'a été publié. Aucune étude ne précise également les caractéristiques mécaniques (modules) des milieux nécessaires à la prolifération des FGh. Cependant, il est connu que les fibroblastes ont une capacité d'adaptation à un large éventail de milieux différents, dont les modules de certains peuvent atteindre jusqu'à 10 kPa (226). Des travaux similaires aux nôtres ont été réalisés par l'équipe de Raveendran *et al.* (220). Cette équipe s'est penchée sur la bioimpression de cellules ligamentaires, encapsulées dans des échafaudages de GelMa, pour la régénération parodontale. Leur étude visait à rechercher les meilleurs paramètres influant sur le processus de bioimpression (concentration optimale en molécule gélatrice et en photoinitiateur, temps d'exposition aux UV, pression d'extrusion, diamètre de l'aiguille) et permettant d'obtenir la meilleure viabilité cellulaire post-impression. Parmi les bioencres formulées entre 5 et 20%, ce sont celles à 12,5%, présentant des modules de près de 1800 Pa, qui ont été sélectionnées. Les cellules avaient une viabilité cellulaire de 85% en post-impression et présentaient également une forme ronde. Cette viabilité fût maintenue sur les 14j de l'étude, les cellules s'étalant progressivement en colonisant une grande partie de la construction bioimprimée.



**Figure 91: Tests LIVE/DEAD® réalisés sur des grilles bioimprimées à partir de bioencres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ chargée en FGh ou en SCAPs**

*Suivi de la viabilité par test LIVE/DEAD® de cellules contenues dans des grilles bioimprimées. Les cellules vivantes sont représentées en vert, les mortes en rouge. L'encre de diC<sub>16</sub>dT présente une auto-fluorescence rouge. Le suivi des impressions contenant des FGh (haut) a été réalisé sur 21j et démontre un bon développement tout au long de l'étude. A l'inverse, le suivi réalisé sur les cellules SCAPs imprimées démontre une mauvaise viabilité de ces cellules bioimprimées.*



**Figure 92: Représentation graphique des tests de viabilité cellulaire et d'AlamarBlue® d'encres bioimprimées de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ contenant des FGh et des SCAPs**

Concernant les cellules SCAPs, nos résultats étaient moins bons que ceux reportés pour les FGh. En effet, la viabilité cellulaire était évaluée à 70% à J1. Cette viabilité décroissait à 61% à J7 puis J14 (**Figure 91**). Une faible augmentation d'activité cellulaire, à des taux très en deçà des FGh, était observée (**Figure 92**). L'ensemble de ces résultats étaient statistiquement significatifs ( $p < 0,05$ ). L'étude n'a pas pu être prolongée au-delà de 14 jours pour ces cellules. Les SCAPs ont conservé une forme ronde, et étaient en majorité isolées dans les constructions, montrant que les bioencres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ n'étaient pas adaptées à leur développement.

Athirasala *et al.* (222) en bioimprimant des cellules SCAPS dans des bioencres composées de 3% d'alginate (6000 Pa) ont observé des résultats comparables avec une viabilité de 60% 7 jours après bioimpression. Dans leurs travaux, la viabilité cellulaire fut augmentée (90%) par addition de protéines extraites de la dentine à une proportion de 1:1 avec l'alginate 3%. Cette addition faisait cependant chuter les modules à 400 Pa et diminuer de 10% la précision des grilles imprimées. La faible viabilité des SCAPs observée durant nos expériences pourrait s'expliquer par le fait que ces cellules souches sont plus fragiles et moins résistantes, notamment vis-à-vis du processus d'extrusion. La pression d'extrusion ainsi que le diamètre et la forme (conique, cylindrique) de la buse (permettant de définir la précision des constructions), sont en effet des paramètres reconnus comme limitant la viabilité des cellules (78,85). Ces paramètres jouent en effet sur les contraintes appliquées aux cellules, notamment les forces de cisaillement exprimées durant le processus d'impression. Dans nos expériences, l'absence de supplémentation en protéines spécifiques dans les milieux de culture, sur le modèle d'Athirasala *et al.* pourrait expliquer la faible activité cellulaire observée.

L'ensemble des résultats des études menées sur les FGh et les SCAPs montre que, malgré l'encapsulation et le stress lié à l'étape de bioimpression, ainsi qu'une prolifération mitigée pour les cellules SCAPs, les cellules étaient capables de survivre dans les grilles imprimées. L'encre de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ étaient donc cytocompatibles. Un axe d'amélioration permettant de favoriser le développement tissulaire des constructions serait d'augmenter la concentration initiale des cellules ajoutées à la bioencres. Cependant, la concentration cellulaire est un paramètre influant sur les

propriétés rhéologiques des bioencres (85). La viscosité pouvant être diminuée, ou la gélification de la bioencre pouvant s'avérer impossible au-delà d'une grande concentration cellulaire (25 x 10<sup>6</sup> cellules/ml) (55). Dans notre cas, la caractérisation rhéologique de la bioencre de diC<sub>16</sub>dT, a montré que l'ajout de FGh provoquait une augmentation des modules à 37°C, passant de 2000 Pa (cf. **Tableau V**, page 143) à 9800 Pa pour des bioencres chargées à 1 millions de cellules/ml (**Tableau XVII** ci-dessous et **Figure Annexe 25**, page 246).

**Tableau XVII: Caractérisation rhéologique des bioencres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ chargées en cellules**

diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ avec cellules (FGh)				
Mesures rhéologiques	T°	G' (Pa) ± σ	G'' (Pa) ± σ	Observations et mesures
Modules G' G'' vs fréquence angulaire (f)	37°C	9837 ± 2794	3115 ± 997	1 millions de cellules/ml

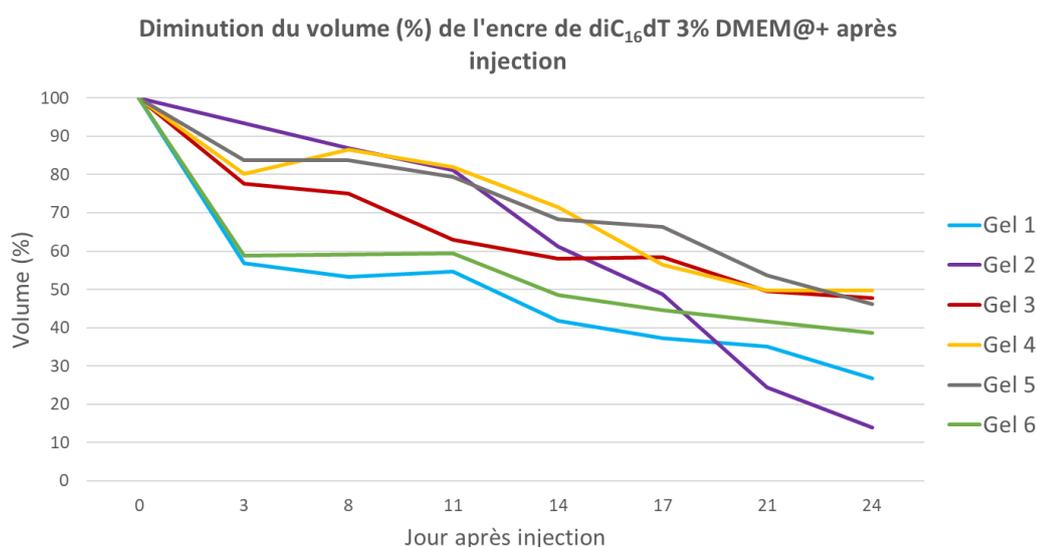
Le pH des milieux de culture est un facteur important, pouvant affecter la viabilité des cellules. C'est pourquoi le pH de milieux similaire à ceux utilisés pour la bioimpression des cellules FGh et SCAPs a été évalué. Les données sont reportées dans le **Tableau XVIII**. La formation de gels à partir de diC<sub>16</sub>dT 3% augmente d'au moins une unité le pH des milieux. Dans le cas du DMEM, les hydrogels de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ avaient en moyenne un pH de 8,6. Cette valeur élevée peut être expliquée par la composition du DMEM et l'absence de tampon de type HEPES (**Tableau Annexe I**, page 235). Ce pH élevé pourrait être un frein au développement des cellules, notamment les plus fragiles comme les cellules souches. L'utilisation de milieux de type DMEM, comportant un tampon HEPES pourrait être envisagée dans la suite des travaux. Cependant, ce changement pouvant affecter la capacité de gélification de la diC<sub>16</sub>dT, il nécessiterait la réalisation d'une nouvelle évaluation des propriétés rhéologiques des gels formés dans ce milieu.

**Tableau XVIII : Mesure de pH des hydrogels de diC<sub>16</sub>dT 3%**

Echantillon	pH	Ecart type
NaCl 0,9%	6,3	0,3
DMEM	7,7	0,1
diC <sub>16</sub> dT 3% NaCl 0,9%	7,76	0,2
diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+	8,6	0,2

## V. Etude de la tolérance et de la biodégradabilité *in vivo*

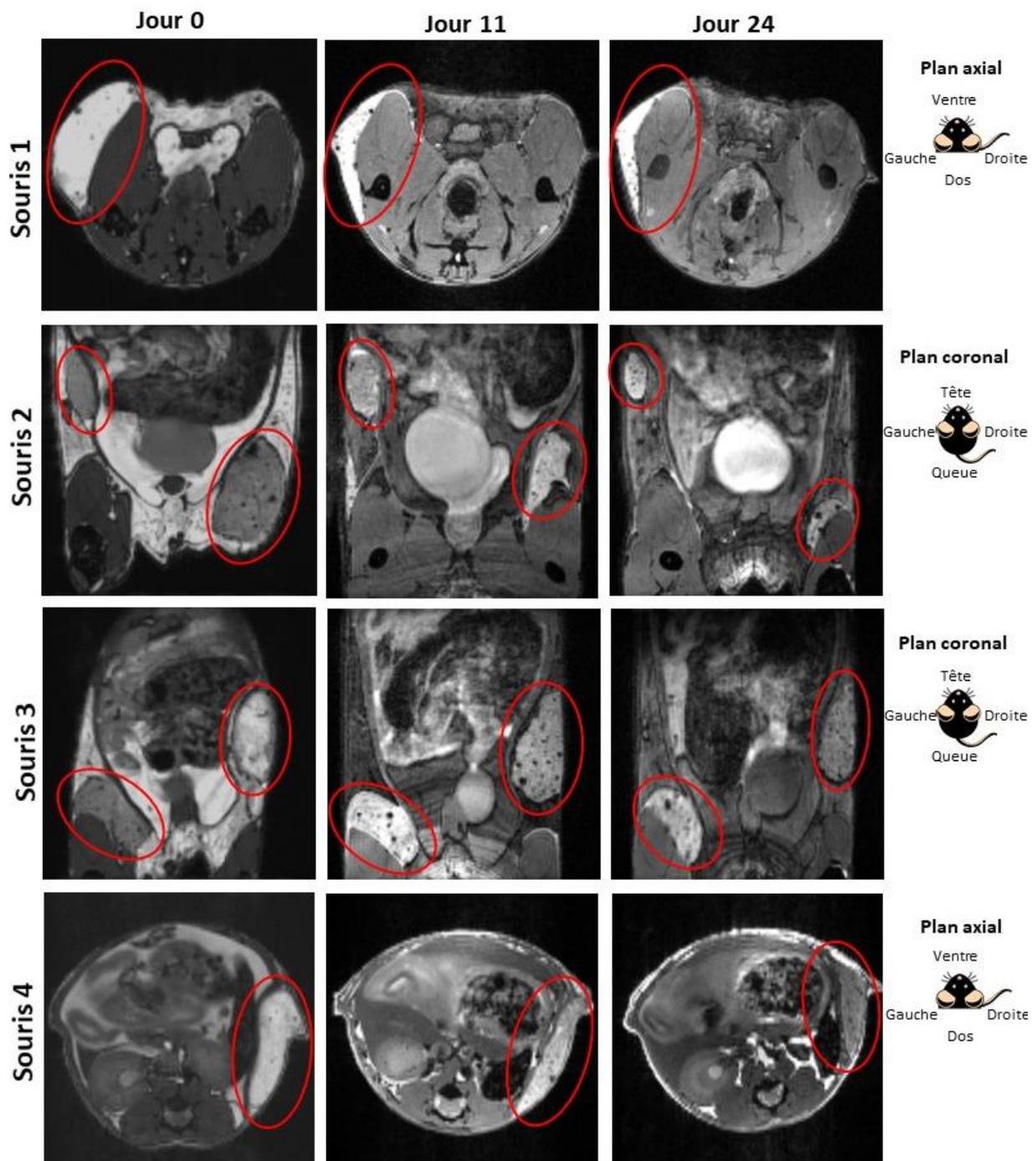
L'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ ayant permis la réalisation de constructions 3D et la croissance cellulaire au sein de ces impressions, il est intéressant d'envisager le comportement que pourrait avoir cette encre dans un organisme vivant. Afin de déterminer sa tolérance et sa biodégradabilité *in vivo*, l'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ (non chargée en cellules) a été injectée en sous-cutané à des souris. Sur les huit injections, deux encres n'ont pas pu être suivies à J0 (probable erreur d'injection). Le suivi IRM a pu être réalisé pour les six échantillons restants. Trois jours après injection, une diminution de volume de 20 à 40% a été observée, suivie d'une diminution progressive jusqu'à 50 à 85% du volume initial à J24 (**Figure 93**). La diminution du volume des encres injectées est également illustrée par les images IRM de la **Figure 94**. L'analyse statistique réalisée sur le pourcentage de dégradation de l'encre a révélé une dégradation comparable d'un gel à l'autre (Test de Kruskal-Wallis :  $H_5 < C\alpha_{11,07}$ ). Les données de suivi du volume et de la dégradation des encres sont reportées dans le **Tableau Annexe IV** et le **Tableau Annexe V**, page 247.



**Figure 93: Suivi de la diminution du volume (%) des encres injectées chez des souris de J0 à J24**

Aucune diffusion visuelle du gel dans d'autres tissus n'a été observée. De plus, aucun signe d'inflammation n'a été détecté en imagerie IRM chez toutes les souris au cours de la surveillance, démontrant la tolérance de l'encre de diC<sub>16</sub>dT 3%-DMEM@+ *in vivo*.

Les résultats que nous avons observés sont similaires à ceux de Ramin *et al.* (101). En effet, le devenir d'hydrogels de diC<sub>16</sub>dT formés à 6% dans du NaCl 0,9%, et utilisés comme réservoir pour la délivrance de sérum-albumine avait été évalué. Au cours de cette étude, les gels étaient stables et aucun signe d'inflammation n'avait alors été constaté. Ainsi, les formulations dans le DMEM@+ n'ont pas eu d'impact sur la tolérance de la diC<sub>16</sub>dT, restant toujours biocompatible.



**Figure 94: Suivi par technique IRM du devenir des encres injectées *in-vivo***

Images IRM des encres injectées chez 4 souris à J0, J11 et J24. Les images IRM permettent de suivre la décroissance du volume des gels injectés suivants : gel 1 (souris 1), gel 2 et 3 (souris 2), gel 4 et 5 (souris 3), gel 6 (souris 4). La séquence IRM à J0 ne permettait pas de supprimer le signal de la graisse, représentée en blanc sur les images à J0. Ce détail a été corrigé pour les autres jours, permettant de mieux mettre en évidence l'encre imprimée.

Il est à noter qu'au cours de nos travaux l'implantation par injection a été étudiée au lieu de la chirurgie par lambeau pour limiter l'inflammation liée à la procédure. De plus, afin de se concentrer uniquement sur l'impact de l'encre de diC<sub>16</sub>dT, il a été décidé de ne pas les charger en cellules. Cette étude préliminaire *in vivo* montre que la formulation serait compatible pour de futures implantations de formes bioimprimées.

Ainsi, pour la première fois, nos expérimentations ont permis de formuler une encre, puis une bioencre de bioimpression par extrusion, à partir d'un LMWG de type NL. La diC<sub>16</sub>dT formulée dans le DMEM à une concentration de 3% gélifie selon un protocole simple, rapide et ne nécessitant pas de stimulant extérieurs pour favoriser sa réticulation (apport d'ions, utilisation d'une source UV). Cette encre présente des propriétés rhéologiques favorables à la reproduction d'une niche cellulaire de CSH (modules < 3kPa), ainsi que des capacités rhéofluifiantes et thixotropes lui permettant d'être extrudée à l'aide de notre bioimprimante. Les constructions imprimées sont stables dans le temps sur une durée de 21j et reproductibles.

L'incorporation de cellules n'a pas influé sur ses capacités d'extrusion. La bioencre de diC<sub>16</sub>dT est favorable à l'attachement et au développement de cellules de type FGh sur 21j, mais n'a pas permis la croissance de cellules souches de type SCAPs, probablement par absence d'apport de nutriments spécifiques à leur croissance au cours de l'étude.

Il est possible de formuler et d'imprimer des encres de diC<sub>16</sub>dT à des concentrations supérieures (4-6%). L'augmentation de la rigidité des encres observées permet ainsi d'adapter les propriétés mécaniques des constructions aux besoins spécifiques des cellules étudiées.

Enfin, l'encre de diC<sub>16</sub>dT formulée dans le DMEM a démontré une biodégradation progressive dans des modèles *in vivo* (50% minimum sur 24j), liée notamment à la nature de sa composition bioinspirée, ainsi qu'une absence de signes inflammatoires visibles à l'IRM.

L'ensemble de ces résultats ont été publiés dans le journal Scientific Reports (4,122) en février 2020 :  
**Document Annexe 2**, pages 271-287

## VI. Etude de faisabilité de l'incorporation de liposomes

La survie des tissus *in vivo* est dépendante de l'apport de nutriments et de facteurs de signalisation dont le transport actif est réalisé par le biais d'un système vasculaire performant (227). La plupart des néo-tissus et échafaudages chargés en cellules et recréés *in vitro* par bioimpression sont néanmoins dépourvus de système vasculaire. L'apport de ces éléments se révèle alors être un défi au sein de ces structures. Leur diffusion passive est souvent limitée et insuffisante pour soutenir les besoins de toutes les cellules, notamment au-delà de 200 µm de profondeur (227,228). Ceci entraîne des conditions non optimales à la production de nouvelles matrices. Une prolifération cellulaire réduite et une formation non homogène de tissus peut alors être observée, avec un développement préférentiel en périphérie des structures, zone d'échange maximale avec le milieu environnant.

Néanmoins, il est possible d'envisager l'apport et la diffusion de nutriments et molécules d'intérêt au sein des hydrogels par le biais de nano- ou microtransporteurs. Nombreux sont les travaux louant leur capacités à apporter des molécules thérapeutiques (229) ou des protéines (230) en ingénierie tissulaire, ou comme nous l'avons rapporté précédemment, au sein des bioimpression (160) (cf. **Document Annexe 1**, pages 255-270). Parmi ces nano- et microformes, les liposomes présentent un intérêt particulier. Outre leurs capacités d'intégration d'une large variété de contenu, tant lipophile qu'hydrophile, les liposomes sont des nanotransporteurs très étudiés, facilement produits et capables de délivrer leur contenu de façon contrôlée (231). De plus, ils ont déjà été intégrés à des matrices d'hydrogels qui ont ensuite été extrudées (232–234). Les liposomes n'ont, à notre connaissance, jamais été incorporés dans la formulation de bioencres puis bioimprimés par des méthodes d'extrusion.

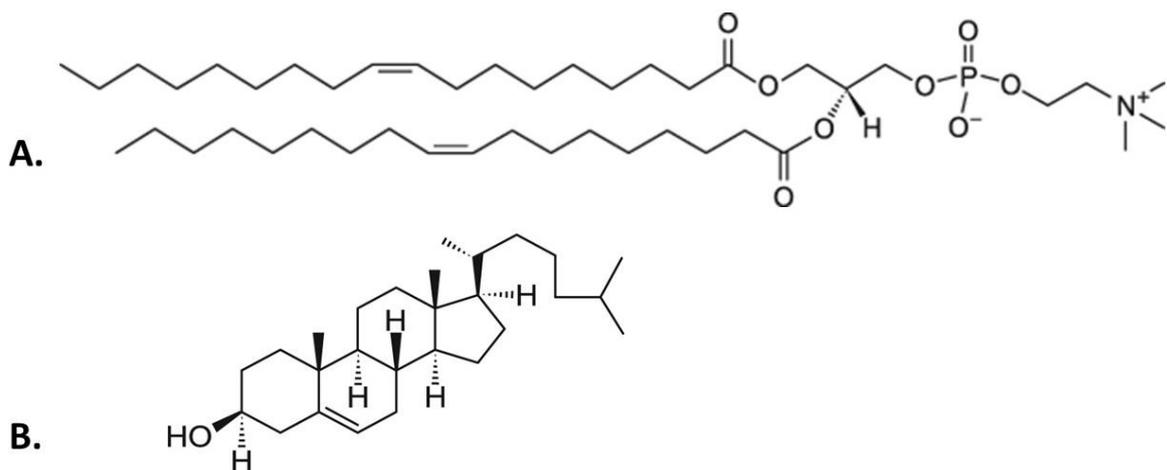
Dans notre projet, plusieurs stratégies peuvent être envisagées afin d'exploiter le potentiel des liposomes : libération de facteurs de croissance nécessaires aux CSH, délivrance de milieu de culture (ex : DMEM), encapsulation de SVF interférant dans la gélification des milieux de culture complexes. Les paragraphes présentés ci-dessous sont les résultats des travaux préliminaires débutés sur ce sujet.

### VI.1 Formation de liposomes par hydratation de film

La méthode qui a été choisie pour la préparation des liposomes est la méthode par hydratation de film, la plus simple et la plus largement répandue parmi les différentes techniques mises au point (235,236). Au cours de ce procédé, les liposomes étaient préparés en dissolvant les lipides (phospholipides, cholestérol) dans un solvant organique, qui était ensuite évaporé sous vide. Puis, le résidu lipidique restant était hydraté par une solution aqueuse. Cette dernière étape entraînait la formation de liposomes et de vésicules multilamellaires de taille hétérogène allant jusqu'au

micromètre de diamètre. Les vésicules étaient ensuite réduites en utilisant successivement une étape de sonication puis d'extrusion (235).

Les phospholipides (PL) sont des molécules amphiphiles entrant dans la formulation des liposomes. La DOPC (phosphatidylcholine dioléate) est un glycérophospholipide dérivé de la phosphatidylcholine (PC), possédant une chaîne insaturée de 18 carbones. La DOPC a notamment été utilisée dans plusieurs formulations de médicaments: DepoCyt® (cytotoxique), Depodur® (analgésique), Shingrix® (vaccin) Epaxal® (vaccin), Inflevax® (vaccin) (231,235). La formulation utilisée a été adaptée du protocole décrit par Zhang *et al.* (204) et était composée d'un mélange de DOPC et de cholestérol (**Figure 95**) en concentration équimolaire (1:1). Le film lipidique a été hydraté en utilisant deux milieux aqueux : PBS et DMEM. La taille et le potentiel zêta des liposomes obtenus après plusieurs extrusions successives à travers des filtres de porosité décroissante sont reportés dans le **Tableau XIX**. Les liposomes formés par l'utilisation de PBS après extrusion à travers un filtre de 100nm avaient une taille moyenne de 142,77 nm. Ces liposomes avaient une faible charge de surface avec un potentiel zêta de -5,28mV.



**Figure 95: Structure chimique de la DOPC et du Cholestérol**

**A.** 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)(18:1 ( $\Delta^9$ -Cis) PC). **B.** Cholestérol.

Extrait de Avanti®Polar Lipids (237).

Dans les mêmes conditions, lorsque le film lipidique était formé dans le DMEM, la taille moyenne obtenue était de 117,8 nm et le potentiel zêta était de -2,6mV. Dans le but de réaliser une cinétique de libération et de l'imagerie par fluorescence, une formulation a été réalisée en utilisant une solution de fluorescéine 1%. La taille moyenne obtenue était alors de 129,9 nm (Z-Average) et le potentiel zêta était de -8,99 mV.

La stabilité colloïdale des liposomes hydratés à partir de PBS a été évalués sur une durée de 21j (**Tableau XX**). Il n'a pas été trouvé de différences significatives entre les tailles et les potentiels zêtas mesurés de J0 à J21 pour chacun des deux groupes (test de Kruskal Wallis :  $H\ 3,00 < \alpha 7,81$ ), démontrant la stabilité colloïdale des formulations sur la durée de l'étude.

Tableau XIX: Taille et potentiel zêta de formulations de liposomes de DOPC

Formulation	Milieu d'hydratation	Taille		Potentiel
		Z-Average (nm)	pdi	zêta (mV)
DOPC:Chol (1:1)	PBS	142,8 ± 5,0	0,08 ± 0.01	-5,28 ± 2,87
	DMEM	117,8 ± 2,1	0,21 ± 0.01	-2,59 ± 0,09
	Fluorescéine 1%	125,9 ± 2,5	0,066 ± 0.02	-8,99 ± 1,68

Tableau XX: Etude de stabilité des formulations de liposomes de PBS

Formulation	Milieu d'hydratation	Jour	Taille		Potentiel
			Z-Average (nm)	pdi	zêta (mV)
DOPC:Chol (1:1)	PBS	J0	141,3 ± 1,2	0,069 ± 0.01	-2,29 ± 0,62
		J7	141,9 ± 1,0	0,055 ± 0.01	-2,60 ± 0,29
		J14	162,4 ± 12,8	0,041 ± 0.01	-2,43 ± 0,40
		J21	146,0 ± 2,0	0,041 ± 0.01	-17,7 ± 1,55

## VI.2 Incorporation des liposomes aux encres

De la même manière que pour la formulation des bioencres par ajout de cellules, l'incorporation d'une suspension de liposomes dans l'encre de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ a été effectuée par simple chauffage de quelques degrés au-dessus de la T<sup>sol-gel</sup> de l'encre, à 42°C. Le mélange a été homogénéisé et la cinétique de gélification a été observée. Un test préliminaire a montré que l'ajout progressif d'une solution de liposomes de PBS dans l'encre ne perturbait pas la gélification jusqu'à une dilution finale de 2% en diC<sub>16</sub>dT ; les encres réussissant systématiquement le test par retournement en moins d'une minute (**Figure 96**). Dans les expérimentations suivantes, afin de tenir compte du facteur de dilution, les encres ont été formulées à une concentration de 3,75% pour obtenir, après ajout de la suspension de liposomes, une encre à 3%.

Dans le but de déterminer la taille et le potentiel zêta des liposomes une fois incorporés à l'encre, une technique d'extraction par dilution puis centrifugation a été utilisée et testée sur des liposomes de PBS. L'impact de la centrifugation a été tout d'abord évalué sur une suspension de liposomes en déterminant le profil granulométrique du surnageant obtenu. Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les analyses avant et après centrifugation (p<0,05), démontrant l'absence d'impact de la centrifugation sur la taille des liposomes (**Tableau XXI**). A partir de cette observation, la centrifugation d'un gel de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ contenant une suspension de liposomes de PBS a permis de retrouver des objets d'une taille de 174,2nm dans le surnageant. L'absence de ces objets

dans une encre de diC<sub>16</sub>dT 3,75% DMEM@+ traitée dans les mêmes conditions (taille moyenne non interprétable avec un pdi > 0,2) permettait de supposer que ces objets correspondaient aux liposomes recherchés (Tableau XXI).

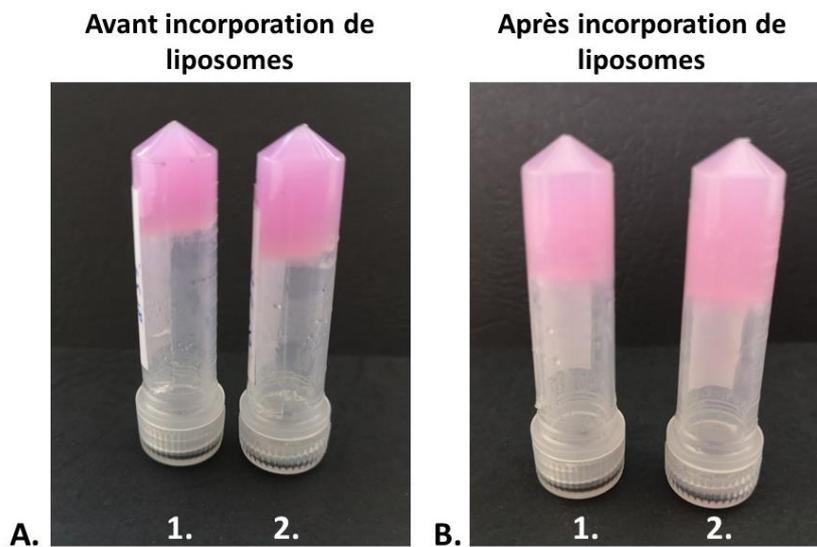


Figure 96: Observation de gels de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ avant et après ajout d'un solution de liposomes

Observation de gels de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ avant (A.) et après (B.) ajout progressif d'une solution de liposomes (2.) ou de son équivalent en volume de PBS (1.). Le volume des gels en A. est d'environ 500µL, en B. de 700µL.

Tableau XXI: Détermination de la taille des liposomes de PBS contenus dans une encre de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+

Formulation	Z-Average	pdi
Liposomes de DOPC:Chol (1:1) PBS non centrifugés	143,5 ± 1,3	0,05 ± 0,01
Liposomes DOPC:Chol (1:1) PBS centrifugé	145,4 ± 2,2	0,09 ± 0,03
diC <sub>16</sub> dT 3,75% DMEM@+	995,8 ± 212,4	0,62 ± 0,14
diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+ DOPC:Chol (1:1) PBS	174,2 ± 16,8	0,29 ± 0,04

Ainsi, les liposomes incorporés aux encres avaient une taille augmentée après centrifugation en comparaison avec la taille moyenne (Z-Average). Cette expérience montre la possibilité d'extraire les liposomes par centrifugation. Cependant, faisant partie de travaux préliminaires, les résultats sont pour le moment non significatifs. L'expérimentation se doit d'être renouvelée et optimisée en variant les paramètres de la méthode : facteur de dilution, temps et force de centrifugation.

L'impact que peut engendrer l'incorporation de liposomes sur le pH de l'encre a été évaluée (Tableau XXII). Que cela soit pour les liposomes de PBS (pH= 7,1) ou les liposomes de fluorescéine 1% (pH= 6,0), le pH de l'encre de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ est resté inchangé (pH= 8,1 avant et pH=8,1 et 8,2 respectivement après incorporation). A l'inverse, le pH du gel peut avoir un impact négatif sur la stabilité des liposomes comme l'ont souligné Dragicevic *et al.* (238), évoquant un pH de 4,5 comme étant une limite au démarrage de la dégradation des vésicules. La différence de taille des liposomes

observée précédemment avant et après incorporation pourrait être dû au changement de pH que subissent les liposomes une fois incorporés à l'encre. Des expériences complémentaires de stabilité des liposomes dans des milieux de pH différents devront être réalisées afin d'y répondre.

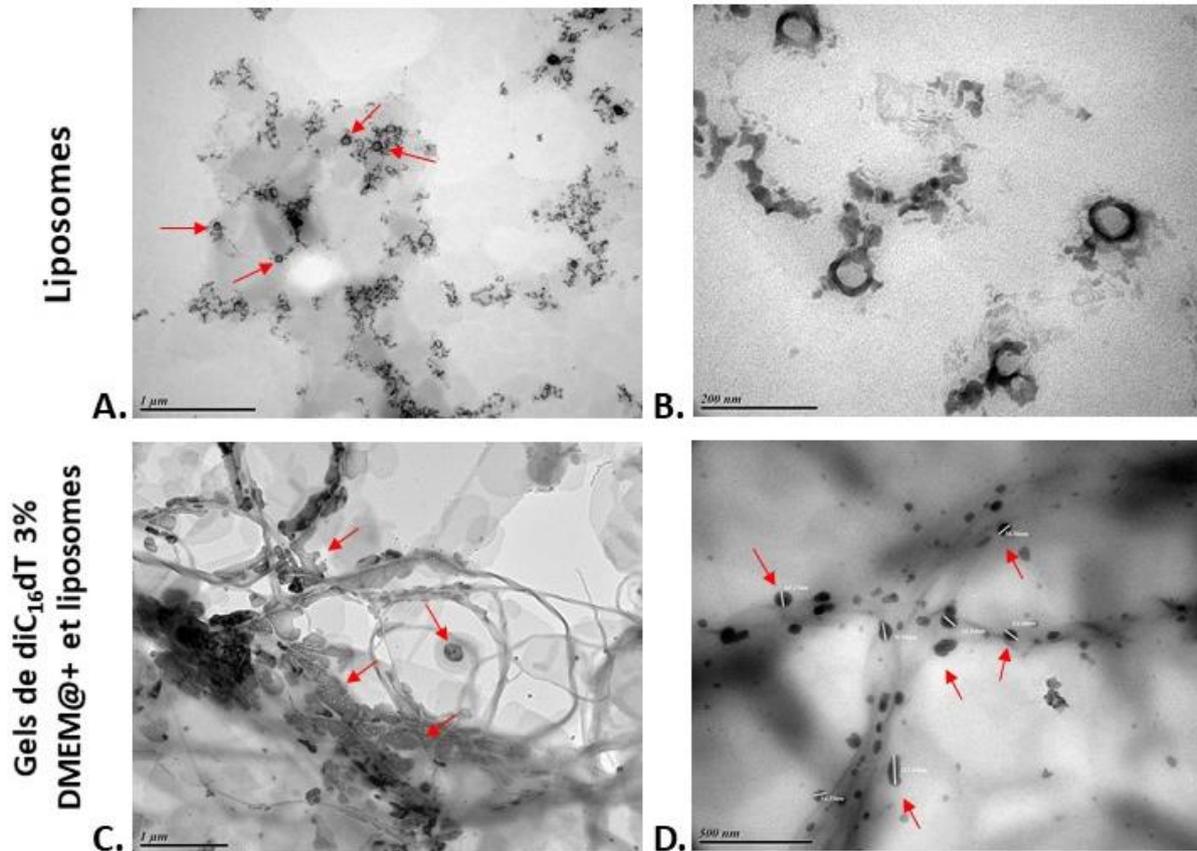
**Tableau XXII: Mesure de pH de solutions de liposomes et d'encres chargées en liposomes**

Echantillon	pH	Ecart type
diC <sub>16</sub> dT 3,75% DMEM@+	8,1	0,1
PBS	6,9	0,0
Liposomes de PBS	7,1	0,0
diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+/Liposomes de PBS	8,1	0,0
Fluorescéine 1%	4,7	0,2
Liposomes de fluorescéine 1%	6,0	0,6
diC <sub>16</sub> dT 3% DMEM@+/ fluorescéine 1%	8,2	0,1

Les suspensions de liposomes formés dans le PBS et le DMEM, ainsi que les encres les contenant ont pu être observées en imagerie TEM (**Figure 97**). Dans les échantillons contenant uniquement une suspension de liposomes de PBS (**Figure 97 A-B**), des formes de tailles allant de 60 à 130 nm ont été observées. Les mélanges d'encre et de liposomes ont permis d'observer des agrégats autour des fibres de forme hélicoïdales (**Figure 97 C-D**). Ceux-ci n'étaient pas observés dans les témoins d'encre ne contenant pas de liposomes (cf. **Figure 74**, page 142) et nous porte à croire que ces formes ne seraient pas des artefacts liés à la préparation des échantillons. Parmi les agrégats, des formes rondes d'une taille de 60 à 120 nm ont été observées. Des résultats identiques ont été observés pour les échantillons de liposomes formés dans le DMEM.

Si l'on compare l'ensemble de ces résultats par rapport aux mesures de taille moyenne des liposomes non incorporés à l'encre, ces tailles sont plus faibles (**Tableau XIX**, page 182). Les résultats obtenus par DLS peuvent néanmoins être exprimés d'une autre façon. En effet, la DLS est une technique permettant de mesurer le mouvement brownien des particules (vitesse de diffusion) qu'elle relie ensuite à leur taille. L'intensité des signaux incidents permet de calculer la taille moyenne des particules (cumulant fit size ou Z-Average). Les intensités transmises par les particules de plus gros diamètre sont majorées en DLS par rapport aux particules de petit diamètre qui, par conséquent, peuvent être sous estimées. Il est possible, à partir des résultats d'intensité, d'exprimer une taille de particules en « nombre », c'est-à-dire de mettre en avant la population de particules majoritaire au sein de l'échantillon. Ces résultats ne peuvent cependant être interprétés que lorsque le pdi de l'échantillon est <0,2 et le rapport de qualité de la mesure correcte (donné par le logiciel Zetasizer) (239–241). Dans nos expérimentations, la taille des liposomes de PBS non incorporés aux gels et exprimée en nombre était de 112,7 nm, celle des liposomes de DMEM était de était alors de 59,08 nm. Ces tailles pourraient correspondre aux tailles retrouvées par imagerie.

Cette différence de taille pourrait également être expliquée d'une autre manière, notamment par la préparation des échantillons dans la microscopie TEM. Celle entraîne en effet un séchage des échantillons qui pourrait avoir des conséquences sur les objets observés (97,185). Une technique de microscopie cryogénique (ex : cryo-TEM) pourrait améliorer la résolution et permettre une meilleure visualisation des liposomes comme ont pu l'observer Dragicevic *et al.* (238) (cependant aucune imagerie des liposomes incorporés dans le gel n'a été réalisée par ces auteurs).



**Figure 97: Observation en TEM de liposomes seuls et incorporés à des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+**  
*Observation de formes rondes sur les images des échantillons de liposomes de PBS (A. à B.). Ces mêmes formes, sont également observées en agrégats, près des fibres de gel de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ mélangés à des liposomes de PBS (C. à D.). Les échantillons des images A. à C. étaient traités avec un agent de contraste. L'échantillon D. n'était pas traité par un agent de contraste.*

La caractérisation rhéologique des encres de diC<sub>16</sub>dT chargées en liposomes est reportée dans le **Tableau XXIII** et les **Figure Annexe 28** à **Figure Annexe 32**, pages 250-253. Les modules élastiques mesurés dans le cas des encres incorporant des liposomes de PBS était de 2326 Pa. Dans le cas des liposomes de fluorescéine 1%, ils étaient de 1257 Pa. L'écart observé entre ces deux valeurs pourrait être la conséquence du milieu aqueux des solutions de liposomes. En effet, la concentration ionique du PBS par rapport à celle de l'eau milli-Q® utilisée pour former la solution de fluorescéine pourrait renforcer les liaisons non covalentes du gel. L'ajout de liposomes de PBS n'a pas modifié la température

sol-gel de l'encre qui a été évaluée à 39,6°C. Elle était de 39,3°C à l'encre formée à 3% (**Tableau V**, page 143). Cette T°sol-gel n'a cependant pas pu être déterminée lors de la caractérisation des encres de liposomes de fluorescéine, les modules G' et G'' ne se croisant pas au cours de l'expérience menée jusque 60°C (**Figure Annexe 31**, page 252). Les propriétés thixotropes de l'encre ont été conservées à 25°C, un retour aux modules initiaux étant observé entre 20 et 28min. Cependant, à 37°C, ces propriétés thixotropes n'ont pas pu être constatées par les mesures rhéologiques, probablement dû à la proximité de la température sol-gel. L'incorporation de liposomes a permis de conserver le caractère rhéofluidifiant des encres, comme il a pu être constaté avec le profil de viscosité des encres chargées en liposomes de PBS (**Figure Annexe 30**, page 251).

**Tableau XXIII: Caractérisation rhéologique des encres de diC<sub>16</sub>dT chargées en liposomes**

<b>diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ Liposomes PBS</b>				
<b>Mesures rhéologiques</b>	<b>T°</b>	<b>G' (Pa) ± σ</b>	<b>G'' (Pa) ± σ</b>	<b>Observations et mesures</b>
<b>LVER</b> <b>G' G' vs déformation de cisaillement (γ)</b>	25°C	1809	551	Contrainte de rupture : 2,5% Croisement G'/G'' : 12,6%
<b>Modules</b> <b>G' G'' vs fréquence angulaire (f)</b>	25°C	2326 ± 197	670 ± 42	-
	37°C	2247 ± 66	316 ± 24	-
<b>Propriétés thixotropes</b>	25°C	1055	343	Retour aux modules initiaux : 20min
	37°C	249	90	Pas de retour aux valeurs de module initiales
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	39,6°C
<b>diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ Liposomes fluorescéine 1%</b>				
<b>Mesures rhéologiques</b>	<b>T°</b>	<b>G' (Pa) ± σ</b>	<b>G'' (Pa) ± σ</b>	<b>Observations et mesures</b>
<b>LVER</b> <b>G' G' vs déformation de cisaillement (γ)</b>	25°C	1713	495	Contrainte de rupture : 0,5% Croisement G'/G'' : 1,6%
<b>Modules</b> <b>G' G'' vs fréquence angulaire (f)</b>	25°C	1257 ± 181	332 ± 46	-
	37°C	457 ± 131	150 ± 53	-
<b>Propriétés thixotropes</b>	25°C	592 ± 24	193 ± 51	Retours aux modules initiaux : 28 ± 5min
	37°C	Décroissance constante, pas de retours aux modules initiaux		
<b>T° sol-gel</b>	-	-	-	Non déterminable, pas de croisement de G' et G'' observé

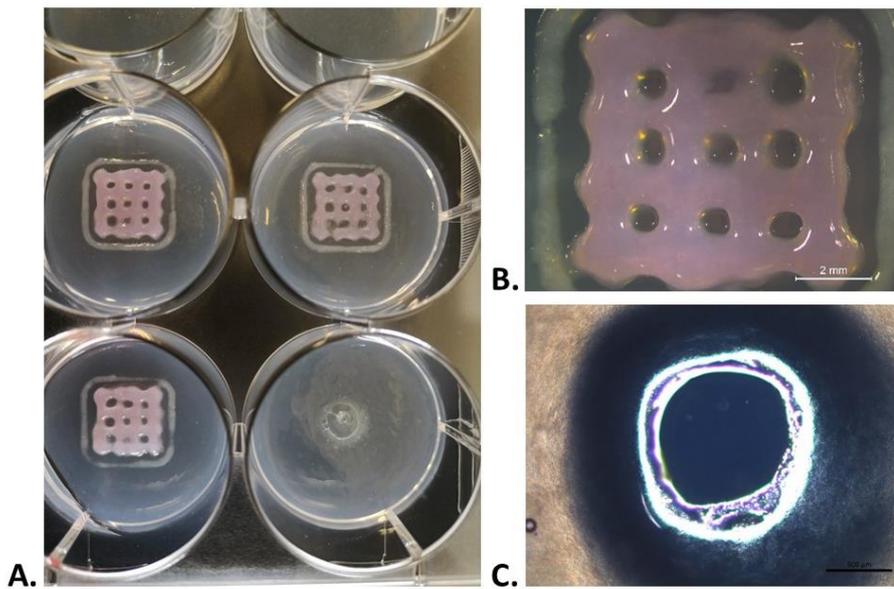
Plusieurs auteurs ont évalué l'impact de l'ajout de liposomes sur les propriétés rhéologiques des hydrogels. Dans les expérimentations de Hurler *et al.* (242), les liposomes (mélange de phosphatidylcholine et de phosphatidylglycerol) abaissaient la viscosité de gels de carbopol. Fanesi *et al.* (243) ont également observé une baisse des modules  $G'$  et  $G''$  lors de l'ajout de liposomes de DMPC, DPPC dans des hydrogels de PVP/alginate. Ces derniers attribuaient cette baisse à une perturbation du processus de photoréticulation nécessaire à la gélification de l'hydrogel. A l'inverse, l'évaluation réalisée par Dragicevic *et al.* (238) sur leur gel de carbopol ont montré que l'incorporation de liposomes (formés de Lécithine Phospholipon® 80) au sein d'un gel de carbopol augmentait la viscosité de l'hydrogel. De même, cette observation a également été faite par Liu *et al.* (244) dans leurs gels de PLGA (liposomes de phosphatidylcholine et de DINH). Ainsi, l'influence des liposomes est dépendante de la nature des composants lipidiques utilisés, ainsi que des propriétés des hydrogels. Dans notre cas, cet impact était limité pour les liposomes de fluorescéine, et avait tendance à renforcer les modules des encres incorporant des liposomes de PBS. Cependant, des expérimentations supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ou infirmer cette tendance.

L'impression de l'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% chargées de liposomes de fluorescéine 1% a pu être accomplie en conservant des paramètres identiques aux impressions précédentes (**Figure 98**). Les constructions réalisées présentaient des tailles de pores visuellement plus importantes comparés aux encres ne contenant pas de liposomes (cf. **Figure 79**, page 147). Cependant, cette constatation devra être suivie d'une évaluation de la taille des grilles et du volume des pores par technique microscopique pour être confirmée.

A ce jour, il n'a pas été retrouvé d'études incorporant des liposomes dans une encre ou une bioencre. Néanmoins, ces derniers ont déjà été utilisés au cours de processus d'impression 3D. En effet, Sarkar *et al.* (245) ont imprimé des échafaudages de phosphate de calcium pour la synthèse d'implants osseux. Des liposomes ont été formulés pour améliorer la demi-vie de la curcumine, molécule utilisée pour ses propriétés ostéogéniques. Dans cette étude, les liposomes ont été déposés sur les constructions et non imprimés. De la même manière, Li *et al.* (246) ont encapsulé de l'aspirine dans des liposomes de DPPC. L'aspirine était utilisée afin de promouvoir la survie et la différenciation d'ostéoblastes et leur différenciation dans des échafaudages de PCL pour la régénération osseuse. Selon les auteurs, l'encapsulation permettait de réduire la cytotoxicité à long terme de l'aspirine. Dans cette étude, les liposomes ont également été déposés sur les constructions imprimées.

Par conséquent, les expérimentations que nous avons menées sont une preuve de concept permettant d'envisager la faisabilité d'incorporation de liposomes au sein d'une encre de bioimpression. Cette incorporation permettrait en outre une meilleure répartition des liposomes au sein des constructions imprimées par rapport à l'approche par dépôt précédemment citée, et faciliterait également la

délivrance de leur contenu aux cellules les plus éloignées des zones d'échange entre le milieu extérieur et les bioimpressions.



**Figure 98: Impression de l'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% liposomes fluorescéine 1%**

**A.** Grilles imprimées à partir d'encre de diC<sub>16</sub>dT 3% chargée en liposomes de fluorescéine 1%. **B.** Observation microscopique d'une grille par stéréomicroscope modulaire (x0.8, échelle de 2mm). **C.** Observation microscopique d'un pore à l'aide d'un microscope inversé (x2.5, échelle de 500µm).

Ainsi, l'étude préliminaire qui a été menée a centré ses objectifs sur la formulation de liposomes et leur intégration au sein des encres de diC<sub>16</sub>dT. Les prochaines étapes devront s'axer sur l'encapsulation de molécules ou milieux d'intérêt (DMEM concentré (10X) ou SVF par exemple) et la libération de leur contenu.

La taille des liposomes préparés jusqu'à présent se situait en moyenne entre 120 et 150nm. Ces tailles correspondent à celles utilisées par d'autres auteurs dans l'encapsulation de petites molécules de taille inférieure ou avoisinant les 1kDa (233,242,247). Dans le cas de l'encapsulation de molécules de taille supérieure de près de 50kDa comme l'albumine, des liposomes de 150 à 300nm sont plus couramment formulés (248–250). La taille et le processus d'extrusion (filtres utilisés et nombre de passages) de nos liposomes devront donc être adaptés à leur contenu. A titre d'exemple, les liposomes de DOPC:Chol (1:1) formés dans le PBS 1% après extrusion avec un filtre à 200nm avaient une taille de 170 à 180nm (pdi<0,2).

Afin d'évaluer le taux d'encapsulation et la cinétique de libération, un protocole devra être utilisé pour suivre une molécule témoin et représentative des propriétés des deux milieux encapsulés. La nature et la composition du DMEM et du SVF incitent à choisir comme traceurs des molécules hydrophiles. Ces évaluations pourraient être menées avec deux types de témoins : un de faible poids moléculaire

permettant d'évaluer l'encapsulation et la cinétique de libération des petites molécules contenues dans ces milieux ; l'autre de haut poids moléculaire pour simuler le cas des molécules comme l'albumine. C'est pourquoi, l'encapsulation et le suivi de la fluorescéine et de l'albumine ont été envisagés dans nos futures expérimentations. Différentes formulations de liposomes encapsulant ces molécules ont été étudiées dans la littérature. Le suivi de la concentration en fluorescéine peut ainsi être évaluée par spectrophotométrie (251,252), celui de l'albumine peut être réalisé par couplage à un composé fluorescent (cyanine) (248) ou en utilisant des kits de dosage colorimétrique des protéines (247,250).

L'évaluation de la cinétique de libération devra également se réaliser dans l'encre. Nous avons montré qu'il était possible de mesurer la taille des liposomes incorporés dans l'encre par une technique de centrifugation. Cette technique avait déjà été utilisée par plusieurs auteurs comme les travaux menés par Cao *et al.* (253) ou Dragicevic *et al.* (238). Dans ces derniers travaux, aucune différence significative sur la taille des liposomes n'avait été constatée avant et après leur incorporation dans le gel, et ce tout au long de l'étude de stabilité menée sur 180 jours.

L'étape d'encapsulation des milieux devra également être suivie d'une étape de purification, permettant de séparer les liposomes chargés des éléments non encapsulés. Cette étape pourrait par exemple être réalisée par dialyse, ou en utilisant la technique de purification sur colonne ou enfin en utilisant des tubes à centrifuger munis de filtres (254,255).

Les tests réalisés dans notre étude ont utilisé la DOPC comme PL. Les PL sont caractérisés par leur température de transition de phase ( $T_m$ ) qui est la température au-delà de laquelle le PL transite d'un état « gel » à un état « liquide » (256). La différence d'état des PL va donc influencer sur la perméabilité des liposomes (257). La  $T_m$  de la DOPC étant de  $-22^\circ\text{C}$  (237). L'étape d'impression des encres se réalisant à  $25^\circ\text{C}$  et l'incubation des structures à  $37^\circ\text{C}$ , une cinétique de libération rapide peut être attendue. En fonction des résultats qui seront obtenus, la formulation des liposomes pourra donc être adaptée à la cinétique de libération désirée (ex : adaptation du rapport PL/ cholestérol, utilisation de PL avec une  $T_m$  plus élevée, ajout d'un second PL). Par exemple, en changeant uniquement la DOPC par de la DSPC, ( $T_m = 55^\circ\text{C}$  (237)), il a été possible d'obtenir des liposomes de 217 nm ( $pdi = 0,19$ ) avec un potentiel zêta de  $-1,14\text{mV}$  après une étape d'extrusion à 200nm. La  $T_m$  n'est cependant pas le seul critère influant sur la libération du contenu du liposomes, et devra tenir compte d'autres paramètres comme la proportion de cholestérol dans la formulation, la nature des molécules encapsulées, la pression osmotique exercée par le contenu ou bien pH du contenu et du milieu extérieur.

Notre étude a démontré que l'incorporation d'une suspension de liposomes n'entraînait pas de problèmes dans le processus de gélification de nos encres. Il a néanmoins été nécessaire de compenser la dilution en augmentant la concentration initiale en  $\text{diC}_{16}\text{dT}$  afin d'obtenir la concentration finale

désirée. Il serait possible d'envisager de lyophiliser nos liposomes et de les intégrer à la formulation de l'encre. Ce choix impliquerait cependant la nécessité de déterminer l'impact de la lyophilisation sur les liposomes et leur contenu, et nécessiterait l'ajout éventuel d'un cryoprotecteur. Comme il a été vu précédemment, tout ajout dans la formulation peut avoir un impact sur les propriétés des encres : cinétique de gélification, propriétés rhéologiques, imprimabilité, stabilité des impressions.

Aucune étude évaluant l'impact d'un processus d'injection ou d'impression sur la stabilité de liposomes n'a été retrouvée dans la littérature. Comme il a été précisé auparavant, les forces mécaniques d'extrusion peuvent impacter les encres d'impression, mais également leur contenu. Ainsi, une étude approfondie devra permettre d'évaluer la stabilité des liposomes lors de leur incorporation dans les encres, et après l'étape d'impression.

# Discussion générale

La réussite d'un processus de bioimpression est inhérente aux qualités intrinsèques de la bioencre utilisée. Les bioencres doivent répondre tant aux critères d'imprimabilité et de fidélité de reproduction des tissus d'origine, que des capacités à simuler un microenvironnement favorable à l'attachement et au développement cellulaire. Malgré le développement d'un éventail de bioencres à base d'hydrogels, peu d'entre elles répondent à l'ensemble de ces conditions (258).

En effet, les hydrogels naturels possèdent dans leurs structures des motifs favorables à l'attachement cellulaire et permettent de mimer la MEC. Leurs caractéristiques mécaniques sont cependant peu adaptées au processus d'extrusion et d'impression. De plus, les molécules gélifiantes naturelles peuvent être sujettes à des problèmes de ressource, de pureté ou de variabilité entre différents lots de production. À l'inverse, les propriétés biochimiques des hydrogels d'origine synthétique ne miment pas convenablement la MEC, nécessitant une fonctionnalisation (motifs RGD, ajout de composants de la MEC notamment). Toutefois, ils présentent des propriétés mécaniques favorables à l'impression de structures de formes complexes (45,53,94). La combinaison de plusieurs hydrogels au sein d'une même encre, dite « multi-matérielle », permettrait de compenser les défauts de chacun des hydrogels la composant (82). Néanmoins, la plupart des constructions imprimées jusqu'à présent avaient des capacités biomimétiques limitées, une faible stabilité dans le temps, étaient limitées en taille et étaient difficilement imprimables à grande échelle (82,83). La combinaison de ces propriétés au sein d'une bioencre unique reste un défi majeur. Ce constat justifie ainsi la recherche et le développement de nouveaux biomatériaux pour la biofabrication par des technologies de bioimpression.

Les hydrogels supramoléculaires, issus de l'auto-assemblage non covalent de LMWG, présentent des propriétés intéressantes pour la bioimpression. Les assemblages supramoléculaires forment des nanofibres similaires aux MEC natives et fournissent un microenvironnement hospitalier favorable au développement cellulaire (117). Ces mêmes assemblages peuvent répondre aux problèmes d'intégrité mécanique et de rhéofluidification que subissent les autres hydrogels durant le processus d'impression (118). De plus, les problèmes de pureté et de variabilité sont limités par l'usage de molécules gélifiantes synthétiques. Malgré tout, cette catégorie d'hydrogels est actuellement peu représentée dans le domaine de la bioimpression.

C'est pourquoi notre étude s'est focalisée sur le potentiel d'utilisation des NL et GNL pour la formation d'une bioencre. Les NL et GNL ont démontré leurs capacités à être utilisés en culture cellulaire (108,110,111) et pour certains à posséder des propriétés rhéologiques rendant possible leur extrusion (259). De plus, ces molécules hybrides présentent une biocompatibilité qui découle de leurs structures

bioinspirées et provenant de la combinaison d'unités biologiques (lipides, acides nucléiques, sucres) (100,101).

Les 3 GNL et 3NL sélectionnés ont été évalués sur quatre critères : le protocole de formulation de l'encre, l'étude des propriétés rhéologiques, les capacités d'extrusion et l'imprimabilité. Ce schéma est classiquement utilisé dans le développement et l'optimisation de bioencres. L'ensemble de ces tests sont complémentaires et indispensables comme l'ont souligné Paxton *et al.* (188) dans leur étude d'évaluation de bioencres d'extrusion, reliant notamment les critères d'imprimabilité à la viscosité de différentes encres de poloxamer et de collagène/alginate.

Parmi ces 6 candidats, l'évaluation des propriétés des encres de diC<sub>16</sub>dT a présenté les meilleurs résultats par rapport aux objectifs fixés. Son protocole de formation était simple, nécessitant cependant la supplémentation du DMEM en NaCl pour permettre une gélification. L'osmolalité du DMEM@+ restait compatible avec l'osmolalité nécessaire à une culture cellulaire. Ses capacités rhéofluidifiantes et thixotropes ont été confirmées par la possibilité d'imprimer de façon continue et reproductible des modèles de grilles de 3 à 5 niveaux.

L'approche utilisée dans notre étude pour déterminer la reproductibilité et la fidélité des impressions était basée sur la mesure des grilles ainsi que de la porosité macroscopique. Ce schéma a également été utilisé par Soltan *et al.* (260) pour évaluer la performance d'impression de plusieurs encres de gélatine/alginate-dialdéhyde de proportions variables. L'évaluation de la porosité microscopique s'évalue quant à elle à partir d'images de microscopie, comme celles obtenus par microscopie SEM, en utilisant des formules de calcul similaires (261,262). Dans notre cas cette détermination n'a pas été réalisée sur les images de TEM des encres de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ en raison de l'absence d'une homogénéité suffisante des réseaux filamenteux observés pour réaliser ces mesures.

Des travaux préliminaires ont été réalisés en modulant les milieux de culture utilisés pour la formulation de l'encre de diC<sub>16</sub>dT. Des encres ont été formées en utilisant les milieux de culture StemspanC@+ et diC<sub>16</sub>dT D<sub>50</sub>SC<sub>25</sub>I<sub>25</sub>@+, adaptés à la culture de CSH et à leur co-culture avec des CSM et CSE respectivement. Les différences de composition entre le DMEM@+ et ces milieux semblaient modifier les propriétés rhéologiques des encres et leur capacité à être extrudées. Le SVF de composition complexe (218,219) a notamment pu être incriminé dans la perturbation du processus de gélification. Cette observation montre toute la difficulté à formuler des bioencres et à conserver les propriétés initiales des encres lors d'un changement dans la formulation.

La température sol-gel de 39°C est un atout pour l'encre de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+, permettant ainsi l'addition de cellules après réchauffage de l'encre tout en limitant l'impact sur la viabilité cellulaire. Il est difficile de prédire l'impact de l'addition de cellules sur les caractéristiques rhéologiques des bioencres, ces changements dépendant étroitement de plusieurs facteurs : composition de la

bioencres, protocole d'incorporation des cellules ou concentration en cellules notamment. L'addition de cellules dans les encres de gélatine/alginat de Zhao *et al.* (211) a entraîné une diminution des modules  $G'$  et  $G''$ . A l'inverse, Cheng *et al.* (263) ont observé une augmentation de la viscosité des gels de gélatine/alginat lors de l'ajout de cellules de façon proportionnelle à leur concentration. Dans notre cas, l'augmentation des modules des encres de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ permet d'émettre l'hypothèse de l'absence de rupture des liaisons non covalentes, comme cela a pu l'être observé dans d'autres travaux (55).

Les paramètres d'impression (dureté du gel, diamètre et forme de l'aiguille, température d'impression notamment) influent de façon certaine sur la viabilité cellulaire (85,211). La viabilité cellulaire post-impression des FGh (>90%) que nous avons mesurée était similaire à celle évaluée par d'autres auteurs (220,264), une discrète diminution de la viabilité s'observant toujours après impression. Cette viabilité cellulaire a été maintenue tout au long de l'étude, et l'activité cellulaire a augmenté, démontrant la compatibilité des bioencres de diC<sub>16</sub>dT et de notre processus de bioimpression avec les FGh. Ces résultats étaient comparables aux travaux menés par Raveendran *et al.* (220) qui ont étudiés la viabilité de cellules ligamentaires parodontales (en majorité des fibroblastes) encapsulés dans des échafaudages de GelMa pour la régénération parodontale. Néanmoins, les impressions de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ ne se sont pas révélées très favorables à la viabilité et la croissance des cellules SCAPs. L'absence d'apport de protéines spécifiques de la dentine (222) ou le pH >8, seraient les causes les plus probables pour ces cellules souches, plus exigeantes et plus fragiles que les FGh. Ces résultats montrent ainsi l'importance d'adapter au mieux la formulation aux exigences spécifiques des cellules.

Avant d'envisager la greffe de structures bioimprimées, les encres de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ ont été injectées *in vivo* dans des modèles murins afin d'en évaluer la tolérance. Les expérimentations menées ont permis de démontrer le caractère biocompatible de cette encre, d'en évaluer sa biodégradabilité au cours du temps (50% minimum en 21 jours) mais aussi de constater l'absence de signes inflammatoires à l'imagerie. Ces observations étaient similaires à celles obtenues par Ramin *et al.* (101) avec l'encre de diC<sub>16</sub>dT NaCl 0,9% et démontrent ainsi l'absence d'impact des changements opérés dans la formulation vis-à-vis de sa tolérance *in vivo*. De futurs travaux devront évaluer la question de la stérilité de la formulation par l'intermédiaire d'un procédé de stérilisation qui devra permettre de s'assurer de la conservation des propriétés physicochimiques de l'encre.

La comparaison de nos travaux à des travaux d'approches similaires (bioimpression par extrusion, impression de modèles de grilles) et réalisés par d'autres équipes s'avère délicate, tant la diversité des encres développées, de leurs caractéristiques rhéologiques, des processus de bioimpression des cellules étudiées et des exigences mécaniques qui en découlent sont variés. La plupart de ces travaux étaient axés sur la recherche de la formulation idéale en fonction des objectifs qui ont été fixés, notamment en termes de viabilité cellulaire et de constructions reproduites. La majorité des bioencres utilisées

étaient des composés d'hydrogels naturels (alginate (265)) ou des mélanges de plusieurs matériaux (gélatine/alginate (260), GelMa/gomme guar (262), Gélatine/GelMa/HA (266), HA/Chitosan (264), Alginate/ motifs RGD (267). La viabilité cellulaire des cellules encapsulées (progéniteurs neuraux (265), HUVECs (260), myoblastes (262), cellules chondrogéniques (264), cellules souches adipocytaires (267)) était satisfaisante en post-impression (>80%) et maintenue tout au long des études. Cependant, aucun de ces travaux n'a évalué la viabilité cellulaire au-delà d'une semaine, et aucun n'a évalué le potentiel d'implantation *in-vivo* des formulations d'encres ou bioencres développées.

Ainsi, les résultats obtenus dans notre preuve de concept sur les FGh, allant de la formulation à l'étude *in vitro* puis *in vivo* de l'encre de diC<sub>16</sub>dT, ont permis de démontrer, pour la toute première fois, les possibilités d'utilisation des encres de NL dans le domaine de la bioimpression. Cette formulation offre des possibilités d'adaptations en modulant le milieu de culture cellulaire utilisé et la concentration en diC<sub>16</sub>dT (de 4 à 6% dans notre étude) pour répondre au mieux aux exigences mécaniques comme support de cellules. L'augmentation des concentrations semblait également améliorer la fidélité des impressions, mais une évaluation comparative des dimensions des grilles et de leur porosité reste à réaliser par rapport aux grilles formées de diC<sub>16</sub>dT 3%.

L'ensemble de ces observations répondaient ainsi aux premiers objectifs du projet Multiprint. Les modules mesurés lors de l'évaluation rhéologique (<3kPa (197)) permettaient alors d'envisager l'utilisation de cette encre pour la reconstitution d'une niche de CSH. La réussite de la bioimpression de CSH dépendra d'une part des propriétés mécaniques des bioencres qui influenceront directement sur la survie cellulaire et détermineront le statut (maintien de la pluripotence ou différenciation) des cellules souches (133). Elle dépendra également de la diffusion et l'apport de facteurs solubles (facteurs de croissance et autres biomolécules) au sein des constructions (82,133).

L'absence de diffusion des nutriments et de molécules d'intérêt au-delà d'une profondeur de 200µm (227,228) entraîne un mauvais développement des cellules et tissus profonds, notamment en cas d'absence d'un système vasculaire au sein des bioimpressions. Ce constat est également un frein pour envisager un processus de bioimpression à grande échelle. C'est pourquoi, l'apport de nutriments et molécules d'intérêt par le biais de nanoformulations est une approche que nous avons voulu explorer et mis en avant dans notre revue (160). Au cours de notre recherche bibliographique, nous avons mis en évidence que l'intégration des liposomes au sein même des bioencres n'avait jamais été entreprise, Quelques exemples d'utilisation en médecine régénérative ont été obtenus par dépôt de liposomes sur matrices pré-imprimées (245,246). Les liposomes sont notamment reconnus pour leur capacité à délivrer une large variété de contenu (231–234) et peuvent être facilement produits.

C'est pourquoi, nos travaux se sont focalisés sur la preuve de concept de l'inclusion de liposomes dans notre encre de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+. Les liposomes de DOPC:Chol (1 :1) formés dans le PBS, le DMEM ou

la fluorescéine ont permis d'apporter la preuve de la faisabilité d'incorporation aux encres en permettant le maintien des capacités d'extrusion et d'imprimabilité de l'encre diC<sub>16</sub>dT DMEM@+. Les travaux qui suivront devront permettre d'évaluer le potentiel de cette formulation à encapsuler et relarguer au long cours des molécules d'intérêt, des milieux de culture (DMEM) ou des compléments de culture cellulaire (SVF). Pour y parvenir, des molécules témoins hydrophiles devront être utilisées comme traceurs (albumine marquée (248), fluorescéine (251,252)).

Ainsi, la molécule de diC<sub>16</sub>dT a démontré son potentiel en tant que molécule gélifiante pour la formulation de bioencre pour bioimpression 3D par extrusion. Les modifications et améliorations qu'il est possible d'apporter à la formulation initiale permettront d'adapter la bioencre aux objectifs qui seront fixés.

# Conclusion

L'objectif principal de ce projet était de formuler une encre pour bioimpression 3D par extrusion à partir de molécules gélatrices bioinspirées. Parmi les 6 molécules candidates testées de type GNL et NL, la diC<sub>16</sub>dT a été choisie. La diC<sub>16</sub>dT a permis une gélification dans le milieu de culture DMEM en utilisant un protocole simple. L'encre formulée a montré des capacités rhéofluidifiantes et thixotropes nécessaires à son impression. Des constructions sous forme de grilles ont pu être imprimées et ont présenté une stabilité physique d'au moins trois semaines.

La température sol-gel proche de la température physiologique a permis l'addition de cellules sans perturber les capacités de gélification et d'impression de la bioencre de diC<sub>16</sub>dT. Les bioimpressions de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ ont été favorables à la culture de cellules tests, les FGh. En revanche, les bioimpressions n'ont pas permis la culture convenable des cellules souches SCAPs, plus exigeantes en termes d'apport nutritifs que les FGh. Ces travaux démontrent ainsi la nécessité d'adapter au mieux les formulations aux exigences des cellules intégrées.

Les résultats obtenus dans cette preuve de concept ont permis de démontrer, pour la toute première fois, les possibilités d'utilisation des encres de NL dans le domaine de la bioimpression. De plus, la tolérance et la biodégradation progressive de l'encre de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+, ainsi que l'absence de signes inflammatoires chez les organismes hôtes, sont des résultats encourageants pour envisager l'implantation de nos futures bioimpressions.

Afin de répondre aux attentes du projet Multiprint, il a été possible de formuler l'encre de diC<sub>16</sub>dT dans des milieux de culture plus complexes : StemspanC@+ et D<sub>50</sub>SC<sub>25</sub>I<sub>25</sub>@+. Une étude approfondie devra être menée afin de démontrer la viabilité et le développement des trois types cellulaires (CSH, CSM, CSE) nécessaires à la création de la niche voulue. La bioimpression 3D de structures complexes à l'aide de ces encres devra également être accomplie et pourra notamment être ajustée en adaptant la concentration en diC<sub>16</sub>dT.

Les travaux préliminaires réalisés sur l'ajout de liposomes au sein des encres de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ ont permis de démontrer la possibilité d'intégrer ces nanoformes dans la formulation d'encres et bioencres de bioimpression par extrusion, ce qui n'avait jamais été réalisé auparavant. Pour remplir leurs fonctions, ces liposomes devront incorporer des molécules d'intérêt ou des milieux de culture (DMEM, SVF notamment). La continuité de ces travaux permettra d'évaluer les capacités d'encapsulation des liposomes et leur cinétique de libération. Le maintien de ces propriétés devra également être investigué au sein des encres diC<sub>16</sub>dT. Enfin, l'amélioration de la croissance de cellules encapsulées dans la bioencre par l'addition de ces liposomes devra également être démontrée. Ainsi, les premiers

tests réalisés sur l'incorporation de liposomes, sont les prémices des multiples opportunités offertes par l'utilisation de ces nanovecteurs au sein des bioencres.

En conclusion, à travers l'ensemble des expérimentations réalisées, le présent travail a montré la capacité du nucléolipide diC<sub>16</sub>dT à entrer dans la formulation de bioencres de bioimpression 3D par extrusion. La diC<sub>16</sub>dT offre une alternative à l'utilisation des hydrogels naturels et synthétiques couramment utilisés en bioimpression 3D. Ce candidat prometteur ouvre également la voie à diverses possibilités d'adaptation des formulations en fonction des objectifs fixés, notamment vis-à-vis de l'adaptation à divers types cellulaires ou de l'apport de molécules d'intérêt par le biais d'une nanoformulation.

# Références bibliographiques

1. Dzobo K, Thomford NE, Senthebane DA, Shipanga H, Rowe A, Dandara C, et al. Advances in regenerative medicine and tissue engineering: Innovation and transformation of medicine. *Stem Cells Int.* 2018;2018.
2. Messner F, Guo Y, Etra JW, Brandacher G. Emerging technologies in organ preservation, tissue engineering and regenerative medicine: a blessing or curse for transplantation? *Transpl Int.* 2019;32(7):673–85.
3. Grounds MD. Obstacles and challenges for tissue engineering and regenerative medicine: Australian nuances. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45(4):390–400.
4. Liu Z, Hu W, He T, Dai Y, Hara H, Bottino R, et al. Pig-to-Primate Islet Xenotransplantation: Past, Present, and Future. *Cell Transplant* [Internet]. 2017 [cited 2019 Aug 4];26(6):925–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28155815>
5. Pati F, Guillemot F, Mironov VA, Groll J, Boland T, Blunk T, et al. Biofabrication : reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication.* 2016;8(013001).
6. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. Tissue Engineering and Regenerative Medicine | National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering [Internet]. [cited 2019 Jul 18]. Available from: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>
7. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature* [Internet]. 2001 Nov 1 [cited 2019 Aug 23];414(6859):118–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689957>
8. POLAK JM, Bishop AE. Stem Cells and Tissue Engineering: Past, Present, and Future. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2019 Aug 23];1068(1):352–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16831937>
9. Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol* [Internet]. 2000 Feb [cited 2019 Aug 22];18(1):2–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766037>
10. Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater Today* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2019 Aug 22];11(5):18–25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702108700865>
11. Manoukian OS, Sardashti N, Stedman T, Gailiunas K, Ojha A, Penalosa A, et al. Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Encycl Biomed Eng* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2019 Aug 22];462–82. Available from: <https://www-sciencedirect-com.docelec.u-bordeaux.fr/science/article/pii/B9780128012383640989>

12. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. 2003 Nov;24(24).
13. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2019 Aug 23];30(10):546–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22939815>
14. Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, Dixit S, Sahu R, Pillai S, et al. Advances in skin regeneration using tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4).
15. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapur SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges *Ami. Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363–408.
16. Pina S, Canadas RF, Jiménez G, Perán M, Marchal JA, Reis RL, et al. Biofunctional Ionic-Doped Calcium Phosphates: Silk Fibroin Composites for Bone Tissue Engineering Scaffolding. *Cells Tissues Organs* [Internet]. 2017 [cited 2019 Aug 3];204(3–4):150–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28803246>
17. Aghazadeh Y, Nostro MC. Cell Therapy for Type 1 Diabetes: Current and Future Strategies. *Curr Diab Rep* [Internet]. 2017 Jun [cited 2019 Aug 4];17(6):37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28432571>
18. Mihara Y, Matsuura K, Sakamoto Y, Okano T, Kokudo N, Shimizu T. Production of pancreatic progenitor cells from human induced pluripotent stem cells using a three-dimensional suspension bioreactor system. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2017 Nov [cited 2019 Aug 4];11(11):3193–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28317340>
19. Bhatia, Sangeeta N., Underhill GH, Zaret KS, Fox IJ. Cell and Tissue Engineering for Liver Disease Sangeeta. *Sci Transl Med*. 2014;6(245).
20. Mazza G, Al-Akkad W, Rombouts K, Pinzani M. Liver tissue engineering: From implantable tissue to whole organ engineering. *Hepatol Commun*. 2018;2(2):131–41.
21. Song HHG, Rumma RT, Ozaki CK, Edelman ER, Chen CS. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2018;22(3):340–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.009>
22. Chaturvedi V, Dye DE, Kinnear BF, van Kuppevelt TH, Grounds MD, Coombe DR. Interactions between Skeletal Muscle Myoblasts and their Extracellular Matrix Revealed by a Serum Free Culture System. Engler AJ, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jun [cited 2019 Aug 4];10(6):e0127675. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26030912>
23. Bissell MJ. Goodbye flat biology – time for the 3rd and the 4th dimensions. *J Cell Sci* [Internet]. 2017 Jan [cited 2019 Aug 4];130(1):3–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28043963>
24. Huang Y, Zhang XF, Gao G, Yonezawa T, Cui X. 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. *Biotechnol J*. 2017;12(8).

25. Atala A. Engineering tissues, organs and cells. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2007 Mar [cited 2019 Aug 3];1(2):83–96. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/term.18>
26. Xin T, Greco V, Myung P. Hardwiring Stem Cell Communication through Tissue Structure. *Cell* [Internet]. 2016 Mar [cited 2019 Aug 3];164(6):1212–25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286741630191X>
27. Yannas I V. Emerging rules for inducing organ regeneration. *Biomaterials* [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 Aug 3];34(2):321–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092865>
28. Sun W, Darling A, Starly B, Nam J. Computer-aided tissue engineering: overview, scope and challenges. *Biotechnol Appl Biochem* [Internet]. 2004 Feb [cited 2019 Aug 3];39(1):29. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1042/BA20030108>
29. Définition | Impression 3D - Impression tridimensionnelle | Futura Tech [Internet]. [cited 2019 Aug 25]. Available from: <https://www.futura-sciences.com/tech/definitions/imprimante-3d-impression-3d-15137/>
30. Bishop ES, Mostafa S, Pakvasa M, Luu HH, Lee MJ, Wolf JM, et al. 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes Dis* [Internet]. 2017;4(4):185–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.10.002>
31. Jamróz W, Szafraniec J, Kurek M, Jachowicz R. 3D Printing in Pharmaceutical and Medical Applications – Recent Achievements and Challenges. *Pharm Res*. 2018;35(176).
32. Muwaffak Z, Goyanes A, Clark V, Basit AW, Hilton ST, Gaisford S. Patient-specific 3D scanned and 3D printed antimicrobial polycaprolactone wound dressings. *Int J Pharm* [Internet]. 2017;527(1–2):161–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.077>
33. Zuniga J, Katsavelis D, Peck J, Stollberg J, Petrykowski M, Carson A, et al. Cyborg beast: A low-cost 3d-printed prosthetic hand for children with upper-limb differences. *BMC Res Notes*. 2015;8(1).
34. Luo W, Huang L, Liu H, Qu W, Zhao X, Wang C, et al. Customized knee prosthesis in treatment of giant cell tumors of the proximal tibia: Application of 3-dimensional printing technology in surgical design. *Med Sci Monit*. 2017;23:1691–700.
35. Bernhard JC, Isotani S, Matsugasumi T, Duddalwar V, Hung AJ, Suer E, et al. Personalized 3D printed model of kidney and tumor anatomy: a useful tool for patient education. *World J Urol*. 2016;34(3):337–45.
36. Klebe RJ. Cytoscribing: A method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues. *Exp Cell Res*. 1988;179(2):362–73.
37. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2003 Apr;21(4):157–61.
38. Murphy S V., Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* [Internet].

- 2014;32(8):773–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2958>
39. Pati F, Gantelius J, Svahn HA. 3D Bioprinting of Tissue/Organ Models. *Angew Chemie - Int Ed*. 2016;55(15):4650–65.
  40. Rider P, Kačarević ŽP, Alkildani S, Retnasingh S, Barbeck M. Bioprinting of tissue engineering scaffolds. *J Tissue Eng*. 2018;9:1–16.
  41. Aljohani W, Ullah MW, Zhang X, Yang G. Bioprinting and its applications in tissue engineering and regenerative medicine. *Int J Biol Macromol [Internet]*. 2018;107(PartA):261–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.171>
  42. Kačarević ŽP, Rider PM, Alkildani S, Retnasingh S, Smeets R, Jung O, et al. An introduction to 3D bioprinting: Possibilities, challenges and future aspects. *Materials (Basel)*. 2018;11(11).
  43. Groll J, Burdick JA, Cho D, Derby B, Gelinsky M, Heilshorn SC, et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*. 2019;11(013001).
  44. Moroni L, Boland T, Burdick JA, De Maria C, Derby B, Forgacs G, et al. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends Biotechnol*. 2018;36(4):384–402.
  45. Hospodiuk M, Dey M, Sosnoski D, Ozbolat IT. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnol Adv [Internet]*. 2017;35:217–39. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975016301719>
  46. Lee JM, Sing SL, Zhou M, Yeong WY. 3D bioprinting processes : A perspective on classification and terminology. *Int J Bioprint*. 2018;4(2):151.
  47. Pedde RD, Mirani B, Navaei A, Styan T, Wong S, Mehrali M, et al. Emerging Biofabrication Strategies for Engineering Complex Tissue Constructs. *Adv Mater*. 2017;29(19):1–27.
  48. Cui H, Nowicki M, Fisher JP, Zhang LG. 3D Bioprinting for Organ Regeneration. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(1601118).
  49. Rengier F, Mehndiratta A, von Tengg-Kobligk H, Zechmann CM, Unterhinninghofen R, Kauczor H-U, et al. 3D printing based on imaging data: review of medical applications. *Int J Comput Assist Radiol Surg [Internet]*. 2010 Jul 15 [cited 2019 Aug 27];5(4):335–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20467825>
  50. Rezende RA, Kasyanov V, Mironov V, Silva JVL da. Organ Printing as an Information Technology. *Procedia Eng [Internet]*. 2015 Jan 1 [cited 2019 Aug 10];110:151–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705815012643>
  51. Jiang T, Munguia-Lopez JG, Flores-Torres S, Kort-Mascort J, Kinsella JM. Extrusion bioprinting of soft materials: An emerging technique for biological model fabrication. *Appl Phys Rev [Internet]*. 2019;6(011310). Available from: <http://dx.doi.org/10.1063/1.5059393>
  52. Dababneh AB, Ozbolat IT. Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review. *J Manuf Sci Eng [Internet]*. 2014 Oct [cited 2019 Aug 21];136(6):061016. Available from: <http://manufacturingscience.asmedigitalcollection.asme.org/article.aspx?doi=10.1115/1.402>

53. Gungor-ozkerim PS, Inci I, Zhang YS, Khademhosseini A, Dokmeci MR. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater Sci*. 2018;(6):915–46.
54. Li J, Chen M, Fan X, Zhou H. Recent advances in bioprinting techniques: Approaches, applications and future prospects. *J Transl Med*. 2016;14(1):1–15.
55. Hölzl K, Lin S, Tytgat L, Van Vlierberghe S, Gu L, Ovsianikov A, et al. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication* [Internet]. 2016;8(3):032002. Available from: <http://stacks.iop.org/1758-5090/8/i=3/a=032002?key=crossref.b468c7ea396ad5e55feeadeebd89b6a5>
56. Derakhshanfar S, Mbeleck R, Xu K, Zhang X, Zhong W, Xing M. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. *Bioact Mater* [Internet]. 2018;3(2):144–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.008>
57. Peng W, Datta P, Ayan B, Ozbolat V, Sosnoski D, Ozbolat IT. 3D bioprinting for drug discovery and development in pharmaceuticals. *Acta Biomater* [Internet]. 2017;57:26–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.05.025>
58. Heinrich MA, Liu W, Jimenez A, Yang J, Akpek A, Liu X, et al. 3D Bioprinting: from Bench to Translational Applications. *Small*. 2019;15(23):1–47.
59. Gudapati H, Dey M, Ozbolat I. A comprehensive review on droplet-based bioprinting: Past, present and future. *Biomaterials*. 2016 Sep;102:20–42.
60. Ihalainen P, Määttä A, Sandler N. Printing technologies for biomolecule and cell-based applications. *Int J Pharm* [Internet]. 2015 Oct [cited 2019 Aug 10];494(2):585–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517315001337>
61. Gao G, Schilling AF, Yonezawa T, Wang J, Dai G, Cui X. Bioactive nanoparticles stimulate bone tissue formation in bioprinted three-dimensional scaffold and human mesenchymal stem cells. *Biotechnol J*. 2014;9(10):1304–11.
62. Gao G, Schilling AF, Hubbell K, Yonezawa T, Truong D, Hong Y, et al. 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* [Internet]. 2015 Nov 22 [cited 2019 Aug 10];37(11):2349–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26198849>
63. Catros S, Guillemot F, Nandakumar A, Ziane S, Moroni L, Habibovic P, et al. Layer-by-layer tissue microfabrication supports cell proliferation in vitro and in vivo. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2012;18(1):62–70.
64. Jia W, Gungor-Ozkerim PS, Zhang YS, Yue K, Zhu K, Liu W, et al. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials* [Internet]. 2016;106:58–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.038>

65. Lim KS, Levato R, Costa PF, Castilho MD, Alcalá-Orozco CR, Van Dorenmalen KMA, et al. Bio-resin for high resolution lithography-based biofabrication of complex cell-laden constructs. *Biofabrication*. 2018;10(3).
66. Wang Z, Lee SJ, Cheng HJ, Yoo JJ, Atala A. 3D bioprinted functional and contractile cardiac tissue constructs. *Acta Biomater* [Internet]. 2018;70:48–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.007>
67. Noor N, Shapira A, Edri R, Gal I, Wertheim L, Dvir T. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. *Adv Sci*. 2019;6(11).
68. BIOLIFE4D Reaches Groundbreaking Milestone and Successfully 3D Bioprints a Mini-Heart - BIOLIFE4D [Internet]. [cited 2019 Oct 2]. Available from: <https://biolife4d.com/biolife4d-reaches-groundbreaking-milestone-and-successfully-3d-bioprints-a-mini-heart/>
69. Grigoryan B, Paulsen SJ, Corbett DC, Sazer DW, Fortin CL, Zaita AJ, et al. Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels. *Science* (80- ). 2019;364(6439):458–64.
70. Byambaa B, Annabi N, Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Jia W, et al. Bioprinted Osteogenic and Vasculogenic Patterns for Engineering 3D Bone Tissue. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(16):1–15.
71. Cubo N, Garcia M, Del Cañizo JF, Velasco D, Jorcano JL. 3D bioprinting of functional human skin: Production and in vivo analysis. *Biofabrication*. 2017;9(1).
72. Albanna M, Binder KW, Murphy S V., Kim J, Qasem SA, Zhao W, et al. In Situ Bioprinting of Autologous Skin Cells Accelerates Wound Healing of Extensive Excisional Full-Thickness Wounds. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-38366-w>
73. Keriquel V, Oliveira H, Rémy M, Ziane S, Delmond S, Rousseau B, et al. In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–10.
74. Whitford WG, Hoying JB. A bioink by any other name: terms, concepts and constructions related to 3D bioprinting. *Futur Sci OA*. 2016;2(3):FSO133.
75. Wang X, Ao Q, Tian X, Fan J, Tong H, Hou W, et al. Gelatin-based hydrogels for organ 3D bioprinting. *Polymers (Basel)*. 2017;9(9).
76. Homan KA, Kolesky DB, Skylar-Scott MA, Herrmann J, Obuobi H, Moisan A, et al. Bioprinting of 3D Convulated Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep34845>
77. Ozbolat IT, Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials* [Internet]. 2016;76:321–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.076>

78. Malda J, Visser J, Melchels FP, Jüngst T, Hennink WE, Dhert WJA, et al. 25th Anniversary Article : Engineering Hydrogels for Biofabrication. *Adv Mater.* 2013;5011–28.
79. Peters GM, Davis JT. Supramolecular gels made from nucleobase, nucleoside and nucleotide analogs. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2016;45:3188–206. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6CS00183A>
80. Jungst T, Smolan W, Schacht K, Scheibel T, Groll J. Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. *Chem Rev* [Internet]. 2016 Feb [cited 2019 Aug 21];116(3):1496–539. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26492834>
81. Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2002 Jan 17 [cited 2019 Aug 21];54(1):13–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11755704>
82. Ashammakhi N, Ahadian S, Xu C, Montazerian H, Ko H, Nasiri R, et al. Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs. *Mater Today Bio.* 2019;1(May):100008.
83. Donderwinkel I, Van Hest JCM, Cameron NR. Bio-inks for 3D bioprinting: Recent advances and future prospects. *Polym Chem.* 2017;8(31):4451–71.
84. Skardal A, Atala A. Biomaterials for Integration with 3-D Bioprinting. *Ann Biomed Eng.* 2015;43(3):730–46.
85. Cidonio G, Glinka M, Dawson JI, Oreffo ROC. The cell in the ink: Improving biofabrication by printing stem cells for skeletal regenerative medicine. *Biomaterials* [Internet]. 2019;209(April):10–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.04.009>
86. Lee SV, Bahaman AR. Discriminatory Power of Agarose Gel Electrophoresis in DNA Fragments Analysis. *intechopen.* 2012;
87. Homayouni A, Ehsani MR, Azizi A, Researchinstitute AE. Effect of lecithin and calcium chloride solution on the Microencapsulation process yield of calcium alginate beads. *Iran Polym J.* 2007;16(9):597–606.
88. Li X, Min M, Du N, Gu Y, Hode T, Naylor M, et al. Chitin , Chitosan , and Glycated Chitosan Regulate Immune Responses : The Chitin , Chitosan , and Glycated Chitosan Regulate Immune Responses : The Novel Adjuvants for Cancer Vaccine. *Clin Dev Immunol.* 2013;387023.
89. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability. 2009;
90. Souza JD. Section XIII Marine Foodomics. 2017.
91. Köhler S, Schmid F, Settanni G. The Internal Dynamics of Fibrinogen and Its Implications for Coagulation and Adsorption. 2015;1–19.
92. Kommareddy S, Vaccines T, Shenoy D, Amiji M. Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization. *Biofunctionalization Nanomater.* 2005;01(01):330–52.
93. Wang Y, Cai L, Nugraha B, Gao Y, Leo HL. Current Hydrogel Solutions for Repairing and

- Regeneration of Complex Tissues Current Hydrogel Solutions for Repairing and Regeneration of Complex Tissues. *Curr Med Chem*. 2014;21(22):2480–96.
94. Jose RR, Rodriguez MJ, Dixon TA, Omenetto F, Kaplan DL. Evolution of Biopinks and Additive Manufacturing Technologies for 3D Bioprinting. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016;2(10):1662–78.
  95. Lai TC, Yu J, Tsai WB. Gelatin Methacrylate/Carboxybetaine Methacrylate Hydrogels with Tunable Crosslinking for Controlled Drug Release. *J Mater Chem B*. 4(13):2304–13.
  96. Kojarunchitt T, Baldursdottir S, Dong Y, Boyd BJ, Rades T, Hook S. Modified thermoresponsive Poloxamer 407 and chitosan sol – gels as potential sustained-release vaccine delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2015;89:74–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.11.026>
  97. Du X, Zhou J, Shi J, Xu B. Supramolecular Hydrogelators and Hydrogels: From Soft Matter to Molecular Biomaterials. *Chem Rev*. 2015;115(24):13165–307.
  98. Webber MJ, Appel EA, Meijer EW, Langer R. Supramolecular biomaterials. *Nat Mater* [Internet]. 2015;15(1):13–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmat4474>
  99. Amabilino DB, Smith DK, Steed JW. Supramolecular materials. *Chem Soc Rev*. 2017;46(9):2404–20.
  100. Baillet J, Desvergnès V, Hamoud A, Latxague L, Barthélémy P. Lipid and Nucleic Acid Chemistries: Combining the Best of Both Worlds to Construct Advanced Biomaterials. *Adv Mater*. 2018;30(11):1–24.
  101. Ramin MA, Sindhu KR, Appavoo A, Oumzil K, Grinstaff MW, Chassande O, et al. Cation Tuning of Supramolecular Gel Properties: A New Paradigm for Sustained Drug Delivery. *Adv Mater*. 2017;29(13):2–7.
  102. Oumzil K, Ramin MA, Lorenzato C, Hémadou A, Laroche J, Jacobin-Valat MJ, et al. Solid Lipid Nanoparticles for Image-Guided Therapy of Atherosclerosis. *Bioconj Chem*. 2016;27(3):569–75.
  103. Benizri S, Ferey L, Alies B, Mebarek N, Vacher G, Appavoo A, et al. Nucleoside-Lipid-Based Nanocarriers for Sorafenib Delivery. *Nanoscale Res Lett*. 2018;13(17).
  104. Kowouvi K, Alies B, Gendrot M, Gaubert A, Vacher G, Gaudin K, et al. Nucleoside-lipid-based nanocarriers for methylene blue delivery: Potential application as anti-malarial drug. *RSC Adv*. 2019;9(33):18844–52.
  105. Alies B, Ouelhazi MA, Patwa A, Verget J, Navailles L, Desvergnès V, et al. Cytidine- and guanosine-based nucleotide–lipids. *Org Biomol Chem* [Internet]. 2018;16(26):4888–94. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8OB01023D>
  106. Godeau G, Barthélémy P. Glycosyl-nucleoside lipids as low-molecular-weight gelators. *Langmuir*. 2009;25(15):8447–50.
  107. Latxague L, Dalila MJ, Patwa A, Ziane S, Chassande O, Godeau G, et al. Glycoside nucleoside

- lipids (GNLs): An intrusion into the glycolipids' world? *Comptes Rendus Chim.* 2012;15(1):29–36.
108. Latxague L, Ramin MA, Appavoo A, Berto P, Maisani M, Ehret C, et al. Control of Stem-Cell Behavior by Fine Tuning the Supramolecular Assemblies of Low-Molecular-Weight Gelators. *Angew Chemie - Int Ed.* 2015;54(15):4517–21.
109. Godeau G, Brun C, Arnion H, Staedel C, Barthélémy P. Glycosyl-nucleoside fluorinated amphiphiles as components of nanostructured hydrogels. *Tetrahedron Lett* [Internet]. 2010;51(7):1012–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.12.042>
110. Ziane S, Schlaubitz S, Miraux S, Patwa A, Lalande C, Bilem I, et al. A thermosensitive low molecular weight hydrogel as scaffold for tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2012;23:147–60.
111. Maisani M, Ziane S, Ehret C, Levesque L, Siadous R, Le Meins JF, et al. A new composite hydrogel combining the biological properties of collagen with the mechanical properties of a supramolecular scaffold for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;(3):1489–500.
112. Godeau G, Arnion H, Brun C, Staedel C, Barthélémy P. Fluorocarbon oligonucleotide conjugates for nucleic acids delivery. *Medchemcomm.* 2010;1(1):76–8.
113. Patwa A, Labille J, Bottero J-Y, Thiéry A, Barthélémy P. Decontamination of nanoparticles from aqueous samples using supramolecular gels. *Chem Commun.* 2015;51(13):2547–50.
114. Jain D, Karajic A, Murawska M, Goudeau B, Bichon S, Gounel S, et al. Low-Molecular-Weight Hydrogels as New Supramolecular Materials for Bioelectrochemical Interfaces. *ACS Appl Mater Interfaces* [Internet]. 2017;9(1):1093–8. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsami.6b12890>
115. Latxague L, Gaubert A, Maleville D, Baillet J, Ramin M, Barthélémy P. Carbamate-Based Bolaamphiphile as Low-Molecular-Weight Hydrogelators. *Gels* [Internet]. 2016;2(4):25. Available from: <http://www.mdpi.com/2310-2861/2/4/25>
116. Ramin MA, Latxague L, Sindhu KR, Chassande O, Barthélémy P, Barthelemy P. Low molecular weight hydrogels derived from urea based-bolaamphiphiles as new injectable biomaterials. *Biomaterials.* 2017 Nov;145:72–80.
117. Loo Y, Hauser CAE. Bioprinting synthetic self-assembling peptide hydrogels for biomedical applications. *Biomed Mater.* 2015;11(1).
118. Chimene D, Lennox KK, Kaunas RR, Gaharwar AK. Advanced Bioinks for 3D Printing: A Materials Science Perspective. *Ann Biomed Eng.* 2016;44(6):2090–102.
119. Mann JL, Yu AC, Agmon G, Appel EA. Supramolecular polymeric biomaterials. *Biomater Sci.* 2018;6(1):10–37.
120. Moroni L, Burdick JA, Highley C, Lee SJ, Morimoto Y, Takeuchi S, et al. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nat Rev Mater* [Internet]. 2018;3(5):21–37.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41578-018-0006-y>

121. Li C, Faulkner-Jones A, Dun AR, Jin J, Chen P, Xing Y, et al. Rapid Formation of a Supramolecular Polypeptide-DNA Hydrogel for In Situ Three-Dimensional Multilayer Bioprinting. *Angew Chemie Int Ed [Internet]*. 2015 Mar 23 [cited 2019 Nov 16];54(13):3957–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201411383>
122. Schacht K, Jüngst T, Schweinlin M, Ewald A, Groll J, Scheibel T. Biofabrication of cell-loaded 3D spider silk constructs. *Angew Chemie - Int Ed*. 2015;54(9):2816–20.
123. Nolan MC, Caparro MF, Dietrich B, Barrow M, Cross ER, Bleuel M, et al. Optimising low molecular weight hydrogels for automated 3D printing. *Soft Matter*. 2017;13:8426–32.
124. Liu K, Zang S, Xue R, Yang J, Wang L, Huang J, et al. Coordination-triggered hierarchical folate/zinc supramolecular hydrogels leading to printable biomaterials. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(5):4530–9.
125. Lim GJ, Lee SJ, Atala A. Cell-Based Drug Delivery. In: *Principles of Regenerative Medicine [Internet]*. Academic Press; 2008 [cited 2019 Sep 30]. p. 954–66. Available from: <https://www-sciencedirect-com.docelec.u-bordeaux.fr/science/article/pii/B9780123694102500577>
126. Alonzo M, AnilKumar S, Roman B, Tasnim N, Joddar B. 3D Bioprinting of cardiac tissue and cardiac stem cell therapy. *Transl Res*. 2019;64–83.
127. Lewicki J, Bergman J, Kerins C, Hermanson O. Optimization of 3D bioprinting of human neuroblastoma cells using sodium alginate hydrogel. *Bioprinting [Internet]*. 2019;16(June):00053. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2019.e00053>
128. Zhai X, Ruan C, Ma Y, Cheng D, Wu M, Liu W, et al. 3D-Bioprinted Osteoblast-Laden Nanocomposite Hydrogel Constructs with Induced Microenvironments Promote Cell Viability, Differentiation, and Osteogenesis both In Vitro and In Vivo. *Adv Sci*. 2018;5(3).
129. Chen H, Zhong J, Wang J, Huang R, Qiao X, Wang H, et al. Enhanced growth and differentiation of myoblast cells grown on E-jet 3D printed platforms. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:937–50.
130. Campos DFD, Marquez AB, O'seanain C, Fischer H, Blaeser A, Vogt M, et al. Exploring cancer cell behavior in vitro in three-dimensional multicellular bioprintable collagen-based hydrogels. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2).
131. Daly AC, Critchley SE, Rencsok EM, Kelly DJ. A comparison of different bioinks for 3D bioprinting of fibrocartilage and hyaline cartilage. *Biofabrication*. 2016;8(4).
132. Smith LR, Cho S, Discher DE. Stem cell differentiation is regulated by extracellular matrix mechanics. *Physiology*. 2018;33(1):16–25.
133. Irvine S, Venkatraman S. Bioprinting and Differentiation of Stem Cells. *Molecules [Internet]*. 2016;21(9):1188. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/9/1188>
134. A. Al-Sabah, Jessop ZM, Whitaker IS, Thornton C. Cell preparation for 3D bioprinting. In: Publishing W, editor. *3D Bioprinting for reconstructive surgery techniques and Applications*.

2018. p. 75–88.
135. Yu Y, Zhang Y, Martin JA, Ozbolat IT. Evaluation of cell viability and functionality in vessel-like bioprintable cell-laden tubular channels. *J Biomech Eng*. 2013;135(9):1–9.
  136. Hasan A, Morshed M, Memic A, Hassan S, Webster TJ, Marei H el-S. Nanoparticles in tissue engineering: applications, challenges and prospects. *Int J Nanomedicine*. 2018;Volume 13:5637–55.
  137. Fathi-Achachelouei M, Knopf-Marques H, Ribeiro da Silva CE, Barthès J, Bat E, Tezcaner A, et al. Use of Nanoparticles in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7(May):1–22.
  138. Jain V, Jain S, Mahajan SC. Nanomedicines based drug delivery systems for anti-cancer targeting and treatment. *Curr Drug Deliv [Internet]*. 2015 [cited 2019 Sep 3];12(2):177–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25146439>
  139. Yan C, Quan X-J, Feng Y-M. Nanomedicine for Gene Delivery for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Curr Gene Ther [Internet]*. 2019 May 28 [cited 2019 Sep 3];19(1):20–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30280665>
  140. Man F, Lammers T, T. M. de Rosales R, Rosales RTM de. Imaging Nanomedicine-Based Drug Delivery: a Review of Clinical Studies. *Mol Imaging Biol*. 2018 Oct 6;20(5).
  141. Sarkar B, Paira P. Theranostic Aspects: Treatment of Cancer by Nanotechnology. *Mini-Reviews Med Chem [Internet]*. 2018 Jun 11 [cited 2019 Sep 3];18(11):969–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29189149>
  142. Mehrotra P. Biosensors and their applications - A review. *J oral Biol craniofacial Res [Internet]*. 2016 [cited 2019 Sep 3];6(2):153–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27195214>
  143. Kaur P, Aliru ML, Chadha AS, Asea A, Krishnan S. Hyperthermia using nanoparticles--Promises and pitfalls. *Int J Hyperthermia [Internet]*. 2016 [cited 2019 Sep 3];32(1):76–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26757879>
  144. Vines JB, Yoon J-H, Ryu N-E, Lim D-J, Park H. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front Chem [Internet]*. 2019 [cited 2019 Sep 3];7:167. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31024882>
  145. Parnia F, Yazdani J, Javaherzadeh V, Maleki Dizaj S. Overview of Nanoparticle Coating of Dental Implants for Enhanced Osseointegration and Antimicrobial Purposes. *J Pharm Pharm Sci [Internet]*. 2017 May 29 [cited 2019 Sep 3];20(0):148. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28554344>
  146. Engel E, Michiardi A, Navarro M, Lacroix D, Planell JA. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. *Trends Biotechnol*. 2008;26(1):39–47.
  147. Zhang L, Webster TJ. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue

- regeneration. *Nano Today*. 2009;4(1):66–80.
148. Khang D, Carpenter J. Nanotechnology for regenerative medicine *Nanotechnology for regenerative medicine*. *Biomed Microdevices*. 2010;12:575–87.
  149. Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface* [Internet]. 2014;11(101):20140459. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4223894&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  150. Yao Y, Shi X, Chen F. The Effect of Gold Nanoparticles on the Proliferation and Differentiation of Murine Osteoblast: A Study of MC3T3-E1 Cells In Vitro. *J Nanosci Nanotechnol* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2019 Sep 4];14(7):4851–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24757953>
  151. Liu H, Slamovich EB, Webster TJ. Less harmful acidic degradation of poly(lactico-glycolic acid) bone tissue engineering scaffolds through titania nanoparticle addition. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2006 [cited 2019 Sep 4];1(4):541–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17722285>
  152. Covarrubias C, Cádiz M, Maureira M, Celhay I, Cuadra F, von Martens A. Bionanocomposite scaffolds based on chitosan–gelatin and nanodimensional bioactive glass particles: In vitro properties and in vivo bone regeneration. *J Biomater Appl*. 2018 Apr 16;32(9):1155–63.
  153. Jun Han Z, Rider AE, Ishaq M, Kumar S, Kondyurin A, Bilek MMM, et al. Carbon nanostructures for hard tissue engineering. *RSC Adv*. 2013;3(28):11058–72.
  154. Shevach M, Fleischer S, Shapira A, Dvir T. Gold Nanoparticle-Decellularized Matrix Hybrids for Cardiac Tissue Engineering. *Nano Lett* [Internet]. 2014 Oct 8 [cited 2019 Sep 5];14(10):5792–6. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nl502673m>
  155. Patrascu JM, Nedelcu IA, Sonmez M, Ficai D, Ficai A, Vasile BS, et al. Composite Scaffolds Based on Silver Nanoparticles for Biomedical Applications. *J Nanomater*. 2015;
  156. Santo VE, Ratanavaraporn J, Sato K, Gomes ME, Mano JF, Reis RL, et al. Cell engineering by the internalization of bioinstructive micelles for enhanced bone regeneration. *Nanomedicine*. 2015;10(11):1707–21.
  157. Wang Z, Dong L, Han L, Wang K, Lu X, Fang L, et al. Self-assembled Biodegradable Nanoparticles and Polysaccharides as Biomimetic ECM Nanostructures for the Synergistic effect of RGD and BMP-2 on Bone Formation. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Apr 28 [cited 2019 Sep 5];6(1):25090. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27121121>
  158. Ino K, Ito A, Honda H. Cell patterning using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2019 Sep 5];97(5):1309–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17216656>
  159. Shimizu K, Ito A, Arinobe M, Murase Y, Iwata Y, Narita Y, et al. Effective cell-seeding technique

- using magnetite nanoparticles and magnetic force onto decellularized blood vessels for vascular tissue engineering. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2007 May [cited 2019 Sep 5];103(5):472–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17609164>
160. Bouguéon G, Kauss T, Dessane B, Barthélémy P, Crauste-Manciet S. Micro- and nano-formulations for bioprinting and additive manufacturing. *Drug Discov Today*. 2019;24(1):163–78.
161. Castilho M, Moseke C, Ewald A, Gbureck U, Groll J, Pires I, et al. Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate scaffolds for substitution of complex bone defects. *Biofabrication* [Internet]. 2014 Jan 15 [cited 2017 Sep 28];6(1):015006. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24429776>
162. Fedorovich NE, Leeuwenburgh SC, Van Der Helm YJM, Alblas J, Dhert WJA. The osteoinductive potential of printable, cell-laden hydrogel-ceramic composites. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2012;100 A(9):2412–20.
163. Zhai X, Ma Y, Hou C, Gao F, Zhang Y, Ruan C, et al. 3D-Printed High Strength Bioactive Supramolecular Polymer / Clay Nanocomposite Hydrogel Scaffold for Bone Regeneration. 2017;
164. Xavier JR, Thakur T, Desai P, Jaiswal MK, Sears N, Cosgriff-Hernandez E, et al. Bioactive Nanoengineered Hydrogels for Bone Tissue Engineering: A Growth-Factor-Free Approach. 2015 [cited 2017 Sep 8];(3):3109–18. Available from: [www.acsnano.org](http://www.acsnano.org)
165. Xu T, Binder KW, Albanna MZ, Dice D, Zhao W, Yoo JJ, et al. Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. *Biofabrication* [Internet]. 2012 Nov 21 [cited 2017 Sep 28];5(1):015001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23172542>
166. Kim M-O, Jung H, Kim S-C, Park J-K, Seo Y-K. Electromagnetic fields and nanomagnetic particles increase the osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med*. 2015;35(1):153–60.
167. Assuncao-Silva RC, Oliveira CC, Ziv-Polat O, Gomes ED, Sahar A, Sousa N, et al. Induction of neurite outgrowth in 3D hydrogel-based environments. *Biomed Mater*. 2015 Oct 20;10(5).
168. Wu M, Gu L, Gong Q, Sun J, Ma Y, Wu H, et al. Strategies to reduce the intracellular effects of iron oxide nanoparticle degradation. *Nanomedicine* [Internet]. 2017;12(5):555–70. Available from: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm-2016-0328>
169. Levato R, Visser J, Planell JA, Engel E, Malda J, Mateos-Timoneda MA. Biofabrication of tissue constructs by 3D bioprinting of cell-laden microcarriers. *Biofabrication* [Internet]. 2014;6(3):035020. Available from: <http://stacks.iop.org/1758-5090/6/i=3/a=035020?key=crossref.e92c5bf2933af078c5803137b5945294>
170. Kingsley DM, Dias AD, Corr DT. Microcapsules and 3D customizable shelled microenvironments

- from laser direct-written microbeads. *Biotechnol Bioeng*. 2016;113(10):2264–74.
171. Poldervaart MT, Wang H, Van Der Stok J, Weinans H, Leeuwenburgh SCG, Oner FC, et al. Sustained release of BMP-2 in bioprinted alginate for osteogenicity in mice and rats. *PLoS One*. 2013;8(8).
  172. Poldervaart MT, Gremmels H, Van Deventer K, Fledderus JO, Öner FC, Verhaar MC, et al. Prolonged presence of VEGF promotes vascularization in 3D bioprinted scaffolds with defined architecture. *J Control Release* [Internet]. 2014;184(1):58–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.007>
  173. Li K, Zhu M, Xu P, Xi Y, Cheng Z, Zhu Y, et al. Three-dimensionally plotted MBG/PHBHHx composite scaffold for antitubercular drug delivery and tissue regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(2).
  174. Zhu M, Li Kun, Yufang Z, Jianhua Z, Ye Xiaojian. 3D-printed hierarchical scaffold for localized isoniazid/rifampin drug delivery and osteoarticular tuberculosis therapy. *Acta Biomater* [Internet]. 2015;16(1):145–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.01.034>
  175. Gupta MK, Meng F, Johnson BN, Kong YL, Tian L, Yeh YW, et al. 3D Printed Programmable Release Capsules. *Nano Lett*. 2015;15(8):5321–9.
  176. Ramos AP, Cruz MAE, Tovani CB, Ciancaglini P. Biomedical applications of nanotechnology. *Biophys Rev* [Internet]. 2017;9(2):79–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12551-016-0246-2>
  177. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab J Chem* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
  178. COUARAZE G, GROSSIORD J-L, HUANG N. Initiation à la rhéologie. In: Lavoisier, editor. *Initiation à la rhéologie, bases théoriques et applications expérimentales*. 2014. p. 3–13.
  179. Marriott C. Rheology. In: Aulton; ME, Taylor; KM, editors. *Aulton's Pharmaceutics The design and manufacture of medicines*. fourth edi. Elsevier; 2013.
  180. Dawn A, Kumari H. Low Molecular Weight Supramolecular Gels Under Shear: Rheology as the Tool for Elucidating Structure–Function Correlation. *Chem - A Eur J*. 2018;24(4):762–76.
  181. Viscosity of Newtonian and Non-Newtonian Fluids [Internet]. [cited 2019 Sep 22]. Available from: <https://www.rheosense.com/applications/viscosity/newtonian-non-newtonian>
  182. MalvernPanalytical. Série Kinexus Manuel de l'utilisateur [Internet]. 2019. Available from: <https://www.malvernpanalytical.com/fr/support/product-support/kinexus-range/kinexus-pro-plus>
  183. Hill A. Introducing rotational rheology and Kinexus. Malvern Panalytical. 2017.
  184. Latxague L, Gaubert A, Barthélémy P. Recent advances in the chemistry of glycoconjugate amphiphiles. *Molecules*. 2018;23(1):1–25.
  185. Raghuwanshi VS, Garnier G. Characterisation of hydrogels: Linking the nano to the microscale.

- Adv Colloid Interface Sci [Internet]. 2019;274:102044. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102044>
186. Kociak M. Introduction à la microscopie électronique. *Collect SFN*. 2007;8:61–74.
  187. Zhang Z, Jin Y, Yin J, Xu C, Xiong R, Christensen K, et al. Evaluation of bioink printability for bioprinting applications. *Appl Phys Rev*. 2018;041304(5).
  188. Paxton N, Smolan W, Böck T, Melchels F, Groll J, Jungst T. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication*. 2017;9(4).
  189. Yuk H, Zhao X. A New 3D Printing Strategy by Harnessing Deformation, Instability, and Fracture of Viscoelastic Inks. *Adv Mater*. 2018;30(6):1–8.
  190. Ouyang L, Highley CB, Sun W, Burdick JA. A Generalizable Strategy for the 3D Bioprinting of Hydrogels from Nonviscous Photo-crosslinkable Inks. *Adv Mater*. 2017;29(8).
  191. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: Applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3(FEB):1–18.
  192. Martin U. Therapeutic application of pluripotent stem cells: Challenges and risks. *Front Med*. 2017;4(DEC).
  193. Haake K, Ackermann M, Lachmann N. Concise Review: Towards the Clinical Translation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Blood Cells—Ready for Take-Off. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(4):332–9.
  194. Kalisky J, Raso J, Rigother C, Rémy M, Siadous R, Bareille R, et al. An easy-to-use and versatile method for building cell-laden microfibres. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2016 [cited 2017 Aug 29]; Available from: <https://www.nature.com/articles/srep33328.pdf>
  195. Gori JL, Butler JM, Chan YY, Chandrasekaran D, Poulos MG, Ginsberg M, et al. Vascular niche promotes hematopoietic multipotent progenitor formation from pluripotent stem cells. *J Clin Invest*. 2015;125(3):1243–54.
  196. Applegate MB, Coburn J, Partlow BP, Moreau JE, Mondia JP, Marelli B, et al. Laser-based three-dimensional multiscale micropatterning of biocompatible hydrogels for customized tissue engineering scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(39):12052–7.
  197. Choi JS, Harley BAC. The combined influence of substrate elasticity and ligand density on the viability and biophysical properties of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials*. 2012;33:4460–8.
  198. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000* [Internet]. 1997 Feb [cited 2019 Oct 27];13:91–120. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9567925>
  199. Kang J, Fan W, Deng Q, He H, Huang F. Stem Cells from the Apical Papilla: A Promising Source

- for Stem Cell-Based Therapy. *Biomed Res Int* [Internet]. 2019 [cited 2019 Oct 27];2019:6104738. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30834270>
200. Panalytical M. Rhéomètre rotationnel Kinexus pro+ de Malvern Panalytical - Support produit [Internet]. 2019 [cited 2019 Oct 17]. Available from: <https://www.malvernpanalytical.com/fr/support/product-support/kinexus-range/kinexus-pro-plus/>
  201. Advanced Instrument I. Advanced Instrument, Osmometer model 3250 user' s guide [Internet]. 2003. Available from: [https://ca.vwr.com/assetsvc/asset/en\\_CA/id/15963129/contents](https://ca.vwr.com/assetsvc/asset/en_CA/id/15963129/contents)
  202. Tecan. LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viability, Cytotoxicity Assay [Internet]. 2019. p. 1–6. Available from: [https://www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle\\_file\\_imports/28614.PDF](https://www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle_file_imports/28614.PDF)
  203. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* [Internet]. 2000 Sep [cited 2019 Oct 27];267(17):5421–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
  204. Zhang H. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposomes Preparation. In: D'Souza GGM, editor. *Methods and Protocols , Methods in Molecular Biology, Liposomes Methods and Protocol*. Second. Springer Protocols; 2017. p. 17–22.
  205. Alves NJ, Cusick W, Stefanick JF, Ashley JD, Handlogten MW, Bilgicer B. Functionalized liposome purification via Liposome Extruder Purification (LEP). *Analyst*. 2013;138(17):4746–51.
  206. Shen J, Ly K, Hoang Y. Cell Culture Medium. *Hum Stem Cell Man* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2019 Oct 26];53–69. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123854735000059>
  207. Yu VWC, Scadden DT. Chapter Two – Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche. In: *Current Topics in Developmental Biology*. 2016. p. 21–44.
  208. Choi JS, Mahadik BP, Harley BAC. Engineering the hematopoietic stem cell niche: *Frontiers in biomaterial science*. *Biotechnol J*. 2015;10(10):1529–45.
  209. Kwak M, Ahn H, Song K. Rheological investigation of body cream and body lotion in actual application conditions. 2015;27(August):241–51.
  210. Ribeiro A, Blokzijl MM, Levato R, Visser CW, Castilho M, Hennink WE, et al. Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting. *Biofabrication*. 2018;10(1).
  211. Zhao Y, Li Y, Mao S, Sun W, Yao R. The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3D cell printing technology. *Biofabrication*. 2015 Nov 2;7(4):1–11.
  212. Kesti M, Müller M, Becher J, Schnabelrauch M, D'Este M, Eglin D, et al. A versatile bioink for three-dimensional printing of cellular scaffolds based on thermally and photo-triggered tandem gelation. *Acta Biomater* [Internet]. 2015;11(1):162–72. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.033>

213. Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumura D. Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2019 Nov 1];23(7):821–3. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt0705-821>
214. He Y, Yang F, Zhao H, Gao Q, Xia B, Fu J. Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. *Sci Rep*. 2016;6:29977.
215. 21885 - DMEM, low glucose, GlutaMAX(TM), pyruvate - FR. [cited 2019 Oct 24]; Available from: <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/technical-resources/media-formulation.313.html>
216. Thermofisher. 12440 - IMDM - FR. [cited 2018 Oct 17]; Available from: <http://www.thermofisher.com/fr/fr/home/technical-resources/media-formulation.76.html>
217. Technologies S. StemSpan™ SFEM | STEMCELL Technologies [Internet]. [cited 2018 Oct 17]. Available from: <https://www.stemcell.com/products/stemspan-sfem.html>
218. Zheng X, Baker H, Hancock WS, Fawaz F, McCaman M, Pungor E. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnol Prog*. 2006;22(5):1294–300.
219. van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J, et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*. 2018;35(1):99–118.
220. Thattaruparambil Raveendran N, Vaquette C, Meinert C, Samuel Ipe D, Ivanovski S. Optimization of 3D bioprinting of periodontal ligament cells. *Dent Mater*. 2019;1–12.
221. Leo L. Wang<sup>1</sup>, Christopher B. Highley<sup>1</sup>, Yi-Cheun Yeh<sup>1</sup>, Jonathan H. Galarraga<sup>1</sup>, Selen Uman<sup>1</sup> and JAB. 3D extrusion bioprinting of single- and double-network hydrogels containing dynamic covalent crosslinks *Leo*. 2015;344(6188):1173–8.
222. Athirasala A, Tahayeri A, Thirivikraman G, França CM. A dentin-derived hydrogel bioink for 3D bioprinting of cell laden scaffolds for regenerative dentistry A dentin-derived hydrogel bioink for 3D bioprinting of cell laden scaffolds for regenerative dentistry. *Biofabrication*. 2018;10(024101).
223. Lee V, Singh G, Trasatti JP, Bjornsson C, Xu X, Tran TN, et al. Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. *Tissue Eng Part C Methods* [Internet]. 2014;20(6):473–84. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tec.2013.0335>
224. Mauck RL, Wang CCB, Oswald ES, Ateshian GA, Hung CT. The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading. *Osteoarthr Cartil*. 2003;11(12):879–90.
225. Chang SC, Rowley JA, Tobias G, Genes NG, Roy AK, Mooney DJ, et al. Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants. *J Biomed Mater Res* [Internet]. 2001 Jun 15 [cited 2019 Nov 2];55(4):503–11. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11288078>

226. Solon J, Levental I, Sengupta K, Georges PC, Janmey PA. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys J*. 2007;93(12):4453–61.
227. Rouwkema J, Koopman BFJM, Blitterswijk CAV, Dhert WJA, Malda J. Supply of nutrients to cells in engineered tissues. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2009;26(1):163–78.
228. Bergemann C, Elter P, Lange R, Weißmann V, Hansmann H, Klinkenberg ED, et al. Cellular Nutrition in Complex Three-Dimensional Scaffolds: A Comparison between Experiments and Computer Simulations. *Int J Biomater*. 2015;
229. Pitorre M, Gondé H, Haury C, Messous M, Poilane J, Boudaud D, et al. Recent advances in nanocarrier-loaded gels: Which drug delivery technologies against which diseases? *J Control Release* [Internet]. 2017;266(September):140–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.031>
230. Mc Clements DJ. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2018;253:1–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.02.002>
231. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics*. 2017;9(2):1–33.
232. Ma Y-H, Yang J, Li B, Jiang Y-W, Lu X, Chen Z. Biodegradable and injectable polymer–liposome hydrogel: a promising cell carrier. *Polym Chem*. 2016;7:2037–44.
233. GuhaSarkar S, More P, Banerjee R. Urothelium-adherent, ion-triggered liposome-in-gel system as a platform for intravesical drug delivery. *J Control Release* [Internet]. 2017;245:147–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.031>
234. Hussain A, Samad A, Ramzan M, Ahsan MN, Ur Rehman Z, Ahmad FJ. Elastic liposome-based gel for topical delivery of 5-fluorouracil: in vitro and in vivo investigation. *Drug Deliv*. 2016;23(4):1115–29.
235. Ahmed KS, Hussein SA, Ali AH, Korma SA, Lipeng Q, Jinghua C, et al. Liposome : composition , characterisation , preparation , and recent innovation in clinical applications. *J Drug Target* [Internet]. 2018;0(0):1–20. Available from: <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337>
236. Huang Z, Li X, Zhang T, Song Y, She Z, Li J, et al. Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2014;9(4):176–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.06.001>
237. Avanti Polar Lipids I. Avanti Polar Lipids [Internet]. [cited 2019 Nov 30]. Available from: <https://avantilipids.com/>
238. Dragicevic N, Krajisnik D, Milic J, Fahr A, Maibach H, Dragicevic N, et al. Development of hydrophilic gels containing coenzyme Q 10 -loaded liposomes : characterization , stability and rheology measurements. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2019;45(1):43–54. Available from:

<https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1515220>

239. MalvernInstrument. Manual: Zetasizer Nano user manual (English) MAN0485. 2013.
240. Malvern Panalytical Ltd. Dynamic light scattering: An introduction in 30 minutes. Technical note (MRK656-01). 2018;1–8. Available from: <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction>
241. MalvernPanalytical. Which size is right? Intensity-volume-number distribution [Internet]. [cited 2019 Dec 1]. Available from: <https://www.materials-talks.com/blog/2017/01/23/intensity-volume-number-which-size-is-correct/>
242. Hurler J, Zakelj S, Mravljak J, Pajk S, Kristlb A, Schubert R, et al. The effect of lipid composition and liposome size on the release properties of liposomes-in-hydrogel. *Int J Pharm*. 2013;456:49–57.
243. Fanesi G, Abrami M, Zecchin F, Giassi I, Ferro ED, Boisen A, et al. Combined Used of Rheology and LF-NMR for the Characterization of PVP-Alginates Gels Containing Liposomes. 2018;35(171).
244. Liu P, Guo B, Wang S, Ding J, Zhou W. A thermo-responsive and self-healing liposome-in-hydrogel system as an antitubercular drug carrier for localized bone tuberculosis therapy. *Int J Pharm* [Internet]. 2019;558(September 2018):101–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.083>
245. Sarkar N, Bose S. Liposome-Encapsulated Curcumin-Loaded 3D Printed Scaffold for Bone Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(19):17184–92.
246. Li Y, Bai Y, Pan J, Wang H, Li H, Xu X, et al. A hybrid 3D-printed aspirin-laden liposome composite scaffold for bone tissue engineering. *J Mater Chem B*. 2019;7(4):619–29.
247. Cheng R, Yan Y, Liu H, Chen H, Pan G, Deng L, et al. Mechanically enhanced lipo-hydrogel with controlled release of multi-type drugs for bone regeneration. *Appl Mater Today* [Internet]. 2018;12:294–308. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2018.06.008>
248. Pawar GN, Parayath NN, Nocera AL, Bleier BS, Amiji MM. Direct CNS delivery of proteins using thermosensitive liposome-in-gel carrier by heterotopic mucosal engrafting. Montazeri Aliabadi H, editor. *PLoS One* [Internet]. 2018 Dec 5 [cited 2019 Apr 3];13(12):0208122. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0208122>
249. Okamoto Y, Taguchi K, Yamasaki K, Sakuragi M, Kuroda S, Otagiri M. Albumin-Encapsulated Liposomes : A Novel Drug Delivery Carrier With Hydrophobic Drugs Encapsulated in the Inner Aqueous Core. *J Pharm Sci* [Internet]. 2018;107(1):436–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.08.003>
250. Kaplan M, Tuğcu-Demiröz F, Vural İ, Çelebi N. Development and characterization of gels and liposomes containing ovalbumin for nasal delivery. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2018;44(December

- 2017):108–17.
251. Campardelli R, Trucillo P, Reverchon E. A Supercritical Fluid-Based Process for the Production of Fluorescein-Loaded Liposomes. *Ind Eng Chem Res.* 2016;55(18):5359–65.
  252. Muraki Y, Yamasaki M, Takeuchi H, Tohyama K, Sano N, Matsuo T. Fluorescent Imaging Analysis for Distribution of Fluorescent Dye Labeled- or Encapsulated-Liposome in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension Model Rat. *Chem Pharm Bull.* 2018;66(3):270–6.
  253. Cao D, Zhang X, Akabar MD, Luo Y, Wu H, Ke X, et al. Liposomal doxorubicin loaded PLGA-PEG-PLGA based thermogel for sustained local drug delivery for the treatment of breast cancer. *Artif cells, nanomedicine, Biotechnol* [Internet]. 2019;47(1):181–91. Available from: <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1548470>
  254. Guven A, Ortiz M, Constanti M, O’Sullivan CK. Rapid and efficient method for the size separation of homogeneous fluorescein-encapsulating liposomes. *J Liposome Res.* 2009;19(2):148–54.
  255. Maherani B, Arab-Tehrany E, Kheirrolomoom A, Geny D, Linder M. Calcein release behavior from liposomal bilayer; Influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie* [Internet]. 2013;95(11):2018–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.006>
  256. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2015;10(2):81–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>
  257. Chen W, Duša F, Witos J, Ruokonen SK, Wiedmer SK. Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–11.
  258. Williams D, Thayer P, Martinez H, Gatenholm E, Khademhosseini A. A perspective on the physical, mechanical and biological specifications of bioinks and the development of functional tissues in 3D bioprinting. *Bioprinting.* 2018;9(December 2017):19–36.
  259. Latxague L, Ramin MA, Appavoo A, Berto P, Maisani M, Ehret C, et al. Control of Stem-Cell Behavior by Fine Tuning the Supramolecular Assemblies of Low-Molecular-Weight Gelators. *Angew Chemie - Int Ed.* 2015;54(15):4517–21.
  260. Soltan N, Ning L, Mohabatpour F, Papagerakis P, Chen X. Printability and Cell Viability in Bioprinting Alginate Dialdehyde-Gelatin Scaffolds. *ACS Biomater Sci Eng.* 2019;5(6):2976–87.
  261. Kumar SA, Tasnim N, Dominguez E, Allen S, Suggs LJ, Ito Y, et al. A comparative study of a 3D bioprinted gekatin-based lattice and Rectangular-Sheet Structures. :1–12.
  262. Zhuang P, Ng WL, An J, Chua CK, Tan LP. Layer-by-layer ultraviolet assisted extrusion- based ( UAE ) bioprinting of hydrogel constructs with high aspect ratio for soft tissue engineering applications. *PLoS One.* 2019;1–21.
  263. Cheng J, Lin F, Liu H, Yan Y, Wang X, Zhang R, et al. Rheological Properties of Cell-Hydrogel Composites Extruding Through Small-Diameter Tips. *J Manuf Sci Eng* [Internet].

- 2008;130(2):021014. Available from: <http://link.aip.org/link/?JMSEFK/130/021014/1>
264. Kim SW, Kim DY, Roh HH, Kim HS, Lee JW, Lee KY. Three-Dimensional Bioprinting of Cell-Laden Constructs Using Polysaccharide-Based Self-Healing Hydrogels. *Biomacromolecules*. 2019;20(5):1860–6.
265. Lindsay CD, Roth JG, LeSavage BL, Heilshorn SC. Bioprinting of stem cell expansion lattices. *Acta Biomater* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.014>
266. Noh I, Kim N, Tran HN, Lee J, Lee C. hydrogel for its potential application as a bioink in tissue engineering. 2019;1–9.
267. Jia J, Richards DJ, Pollard S, Tan Y, Rodriguez J, Visconti RP, et al. Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomater*. 2014;10(10):4323–31.

# Annexes

# I. Figures et tableaux Annexes

## I.1 Partie 1 : GNL et NL pour la conception d'une encre de bioimpression 3D

### GNF 1 et 3% DMEM

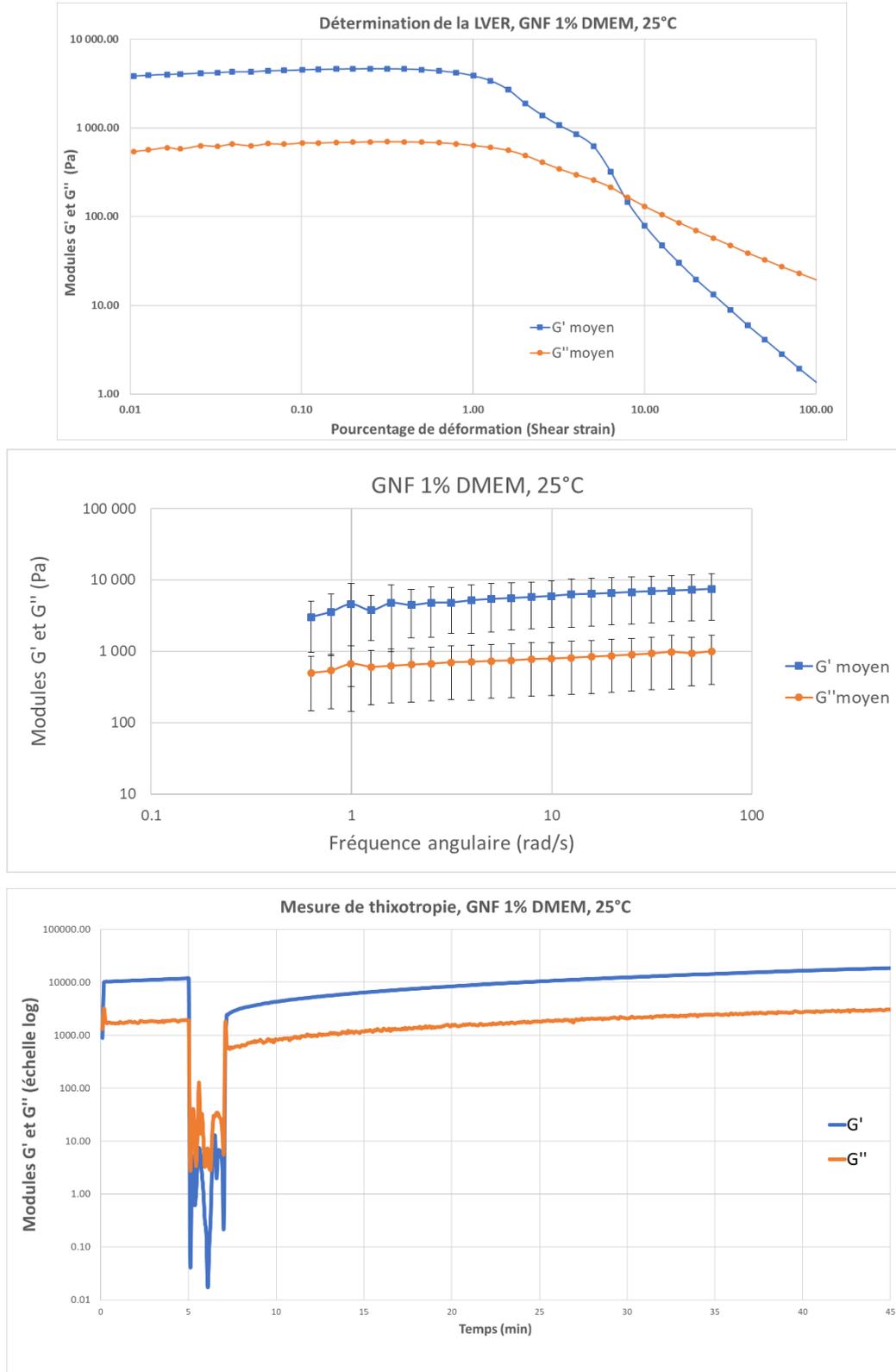


Figure Annexe 1: Caractérisation rhéologique (CR) des gels de GNF 1% DMEM à 25°C

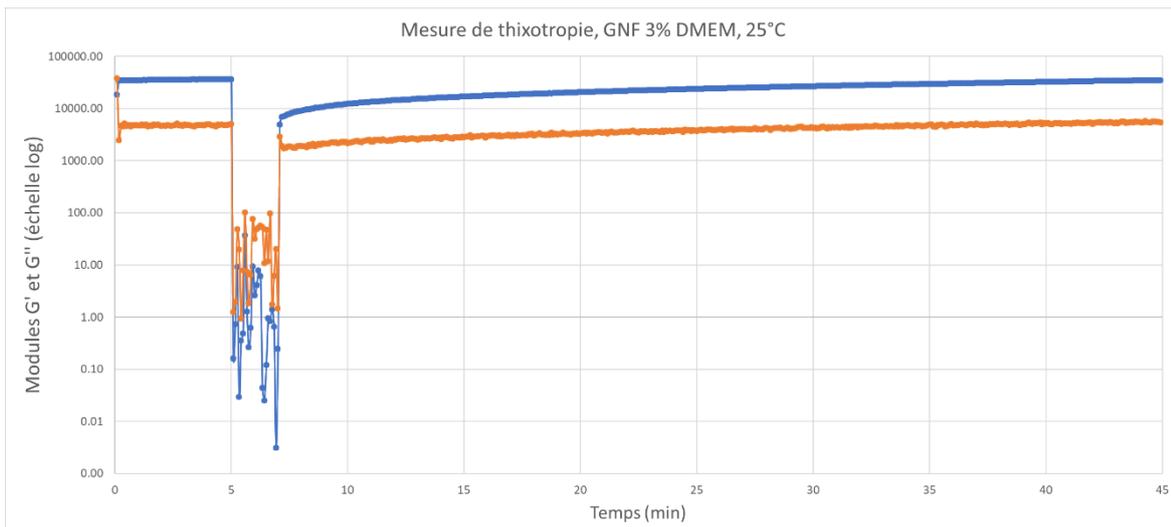
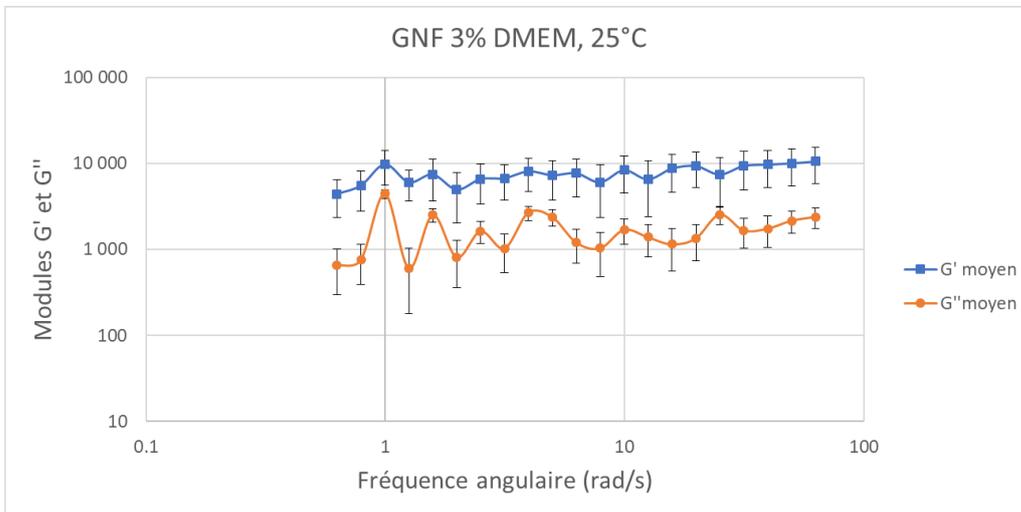
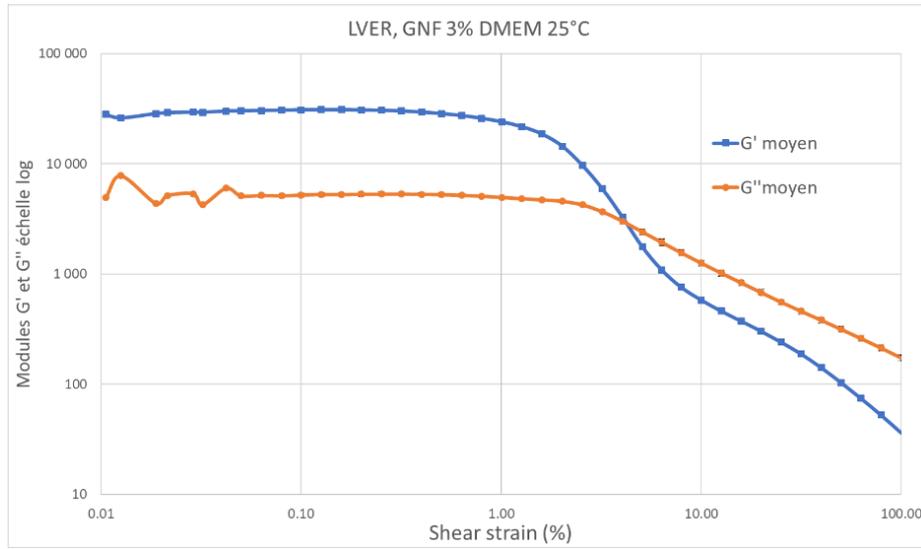


Figure Annexe 2: CR des gels de GNF 3% DMEM à 25°C

**GNBA-BU 1,5% eau Milli-Q®**

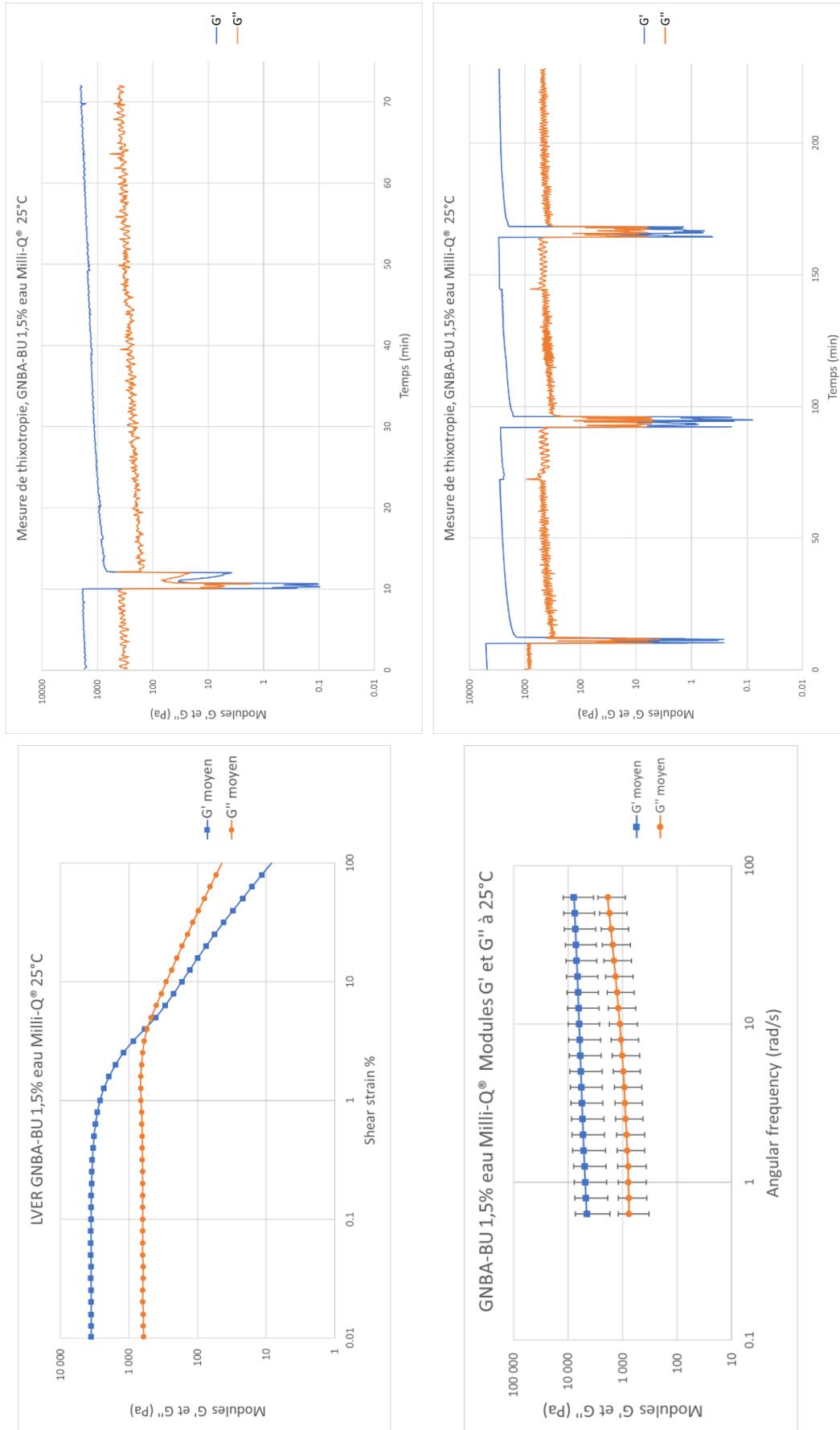


Figure Annexe 3: CR des gels GNBA-BU 1,5% eau Milli-Q® à 25°C

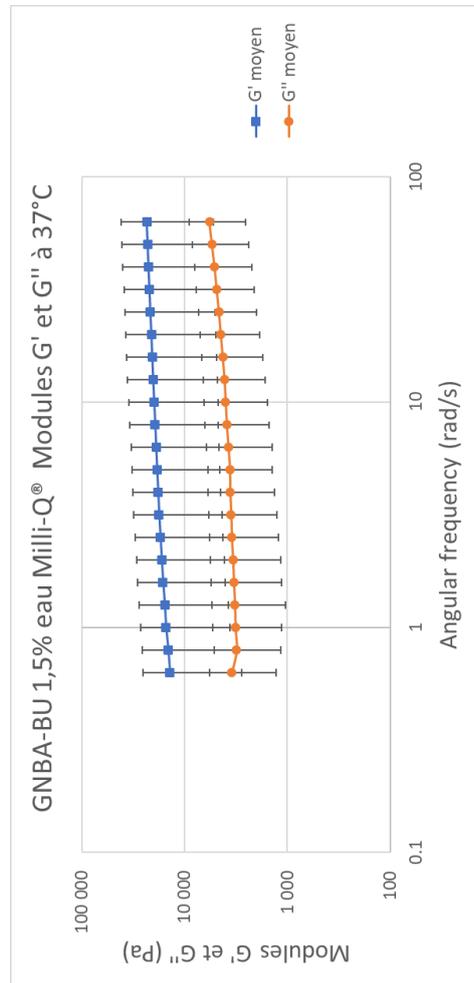
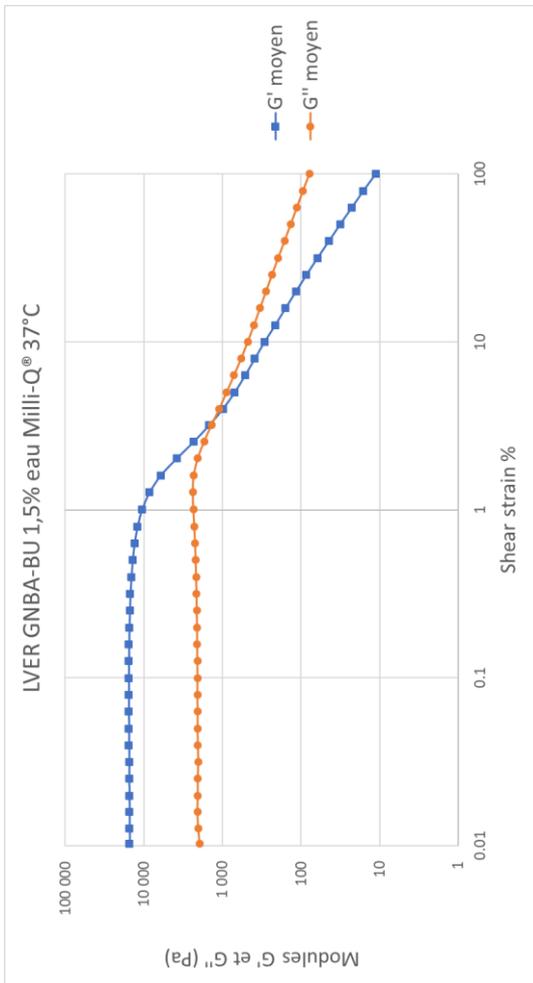
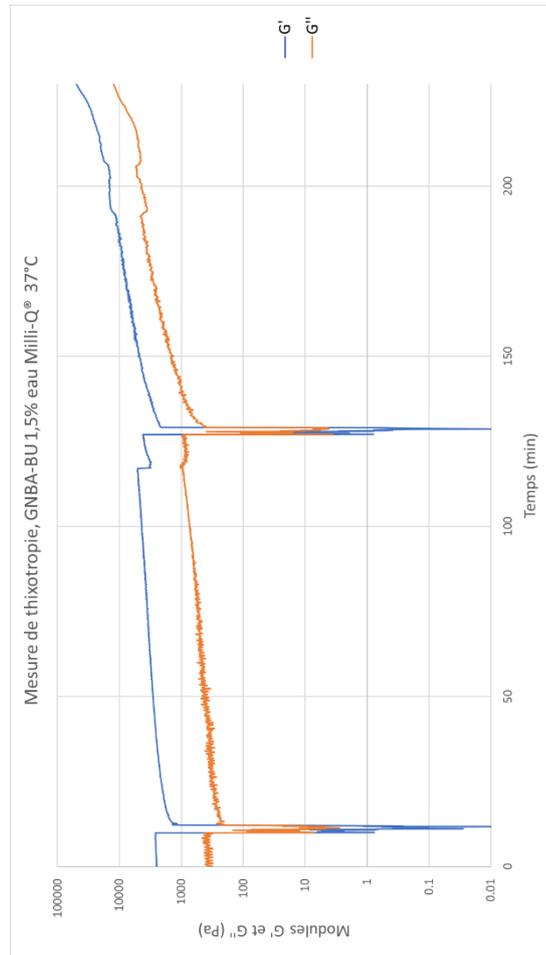
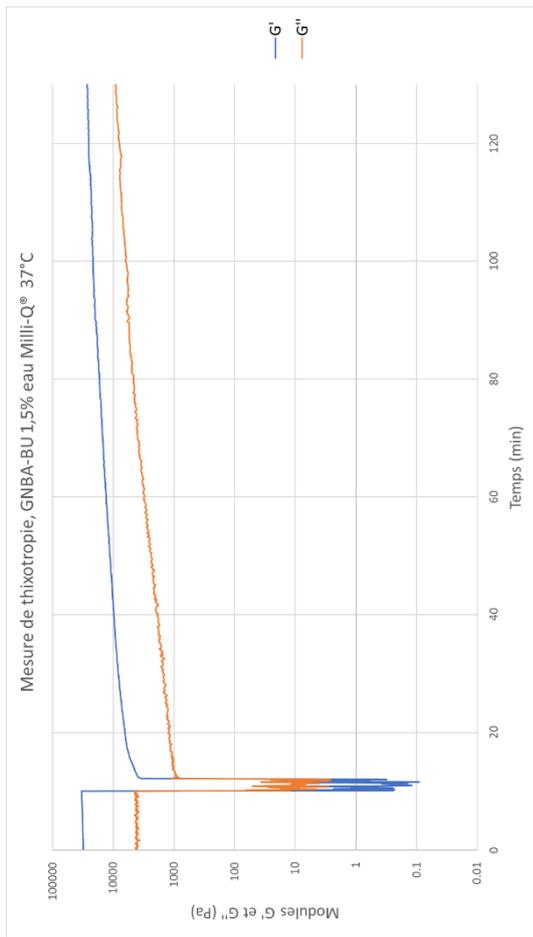
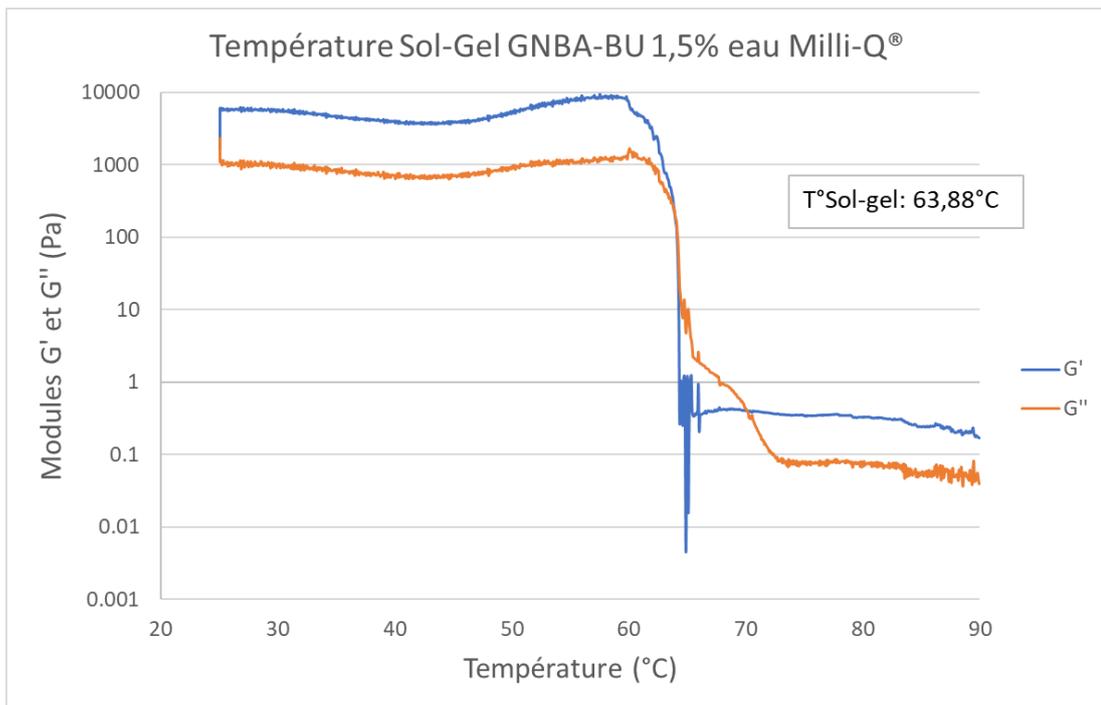


Figure Annexe 4: CR des gels GNBA-BU 1,5% eau Milli-Q® à 37°C



**Figure Annexe 5: Température sol-gel GNBA-BU 1,5% eau Milli-Q®**

**GNBA-BU 1,5% DMEM**

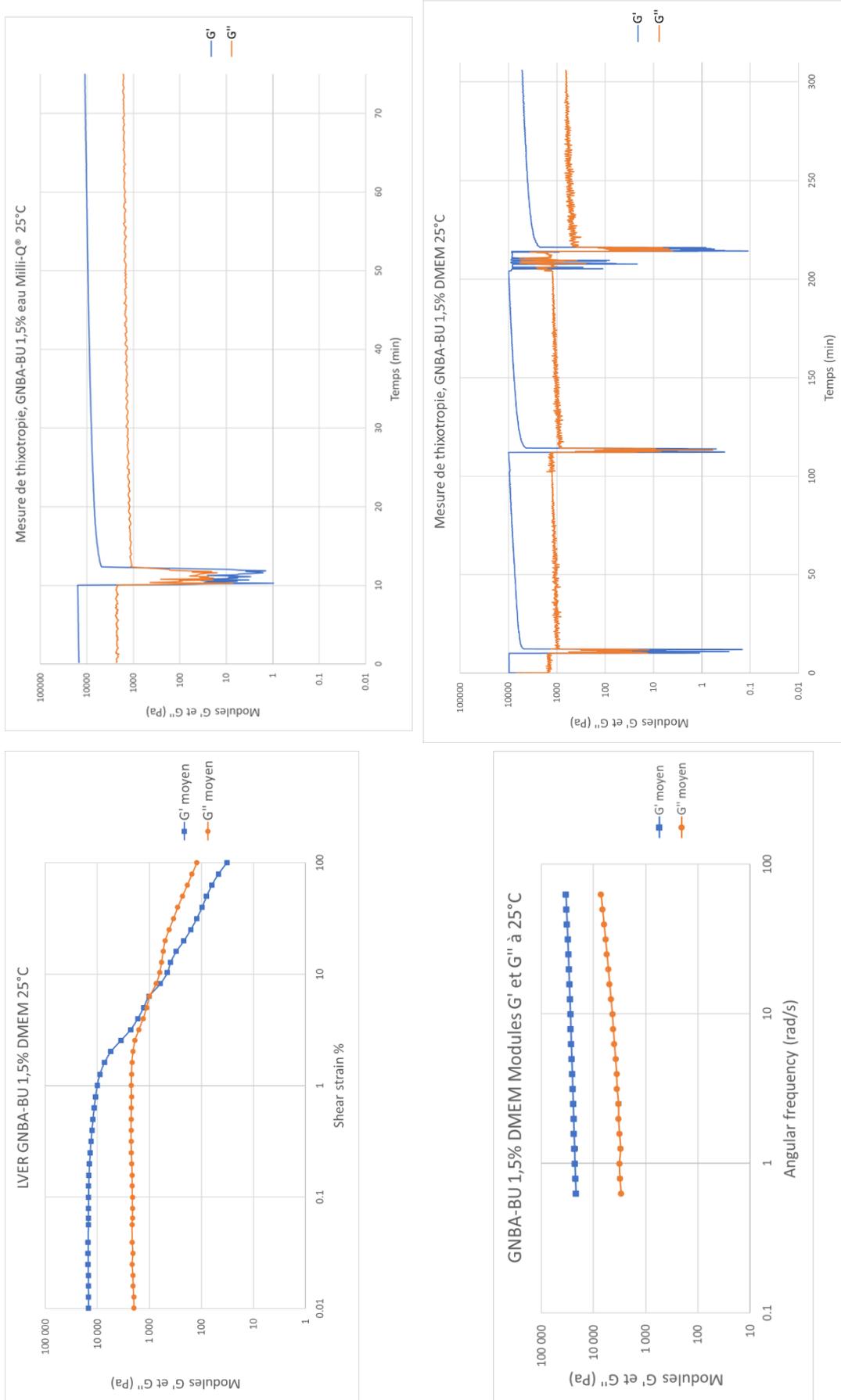


Figure Annexe 6: CR des gels GNBA-BU 1,5% DMEM à 25°C

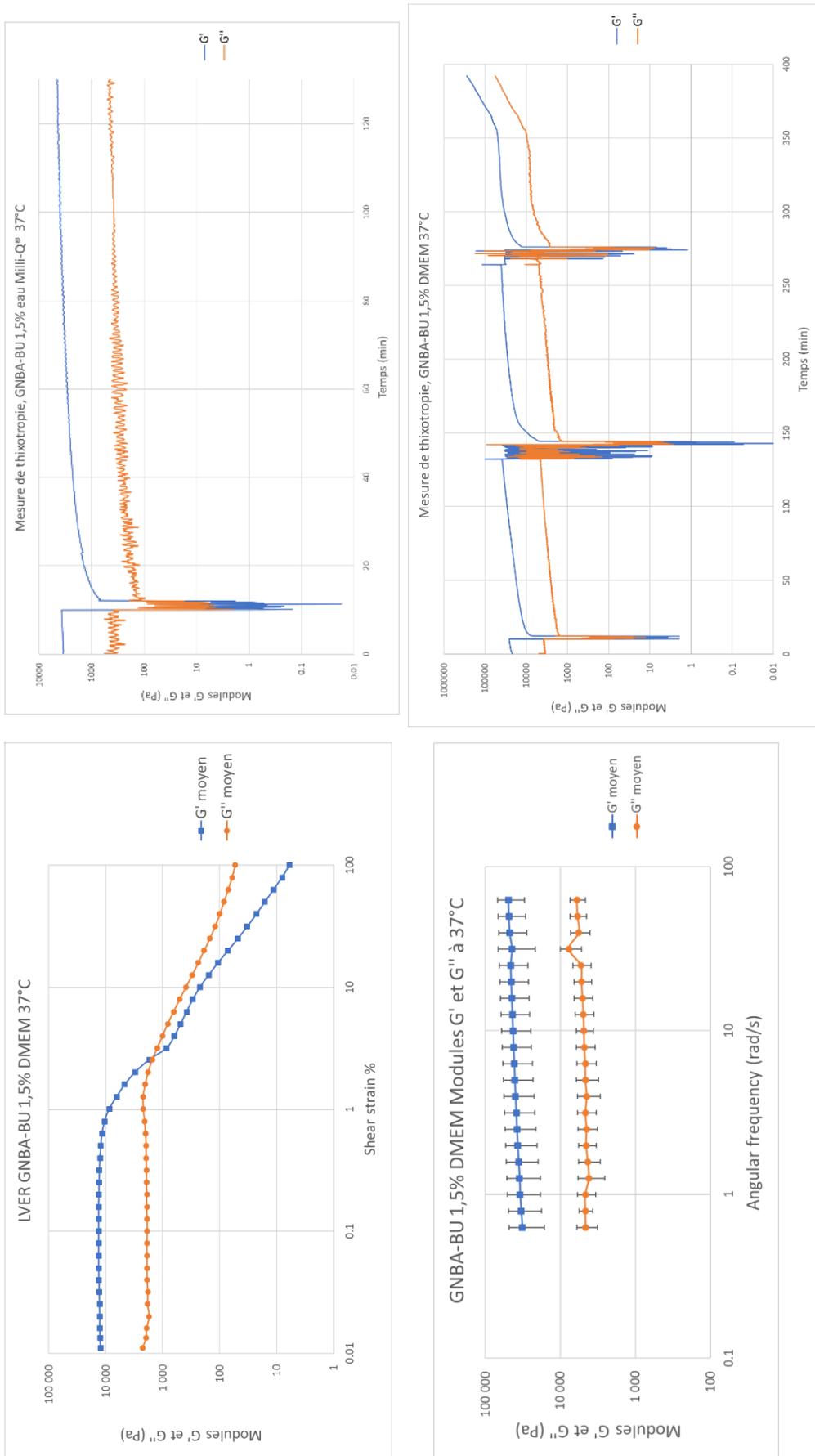


Figure Annexe 7: CR des gels GNBA-BU 1,5% DMEM à 37°C

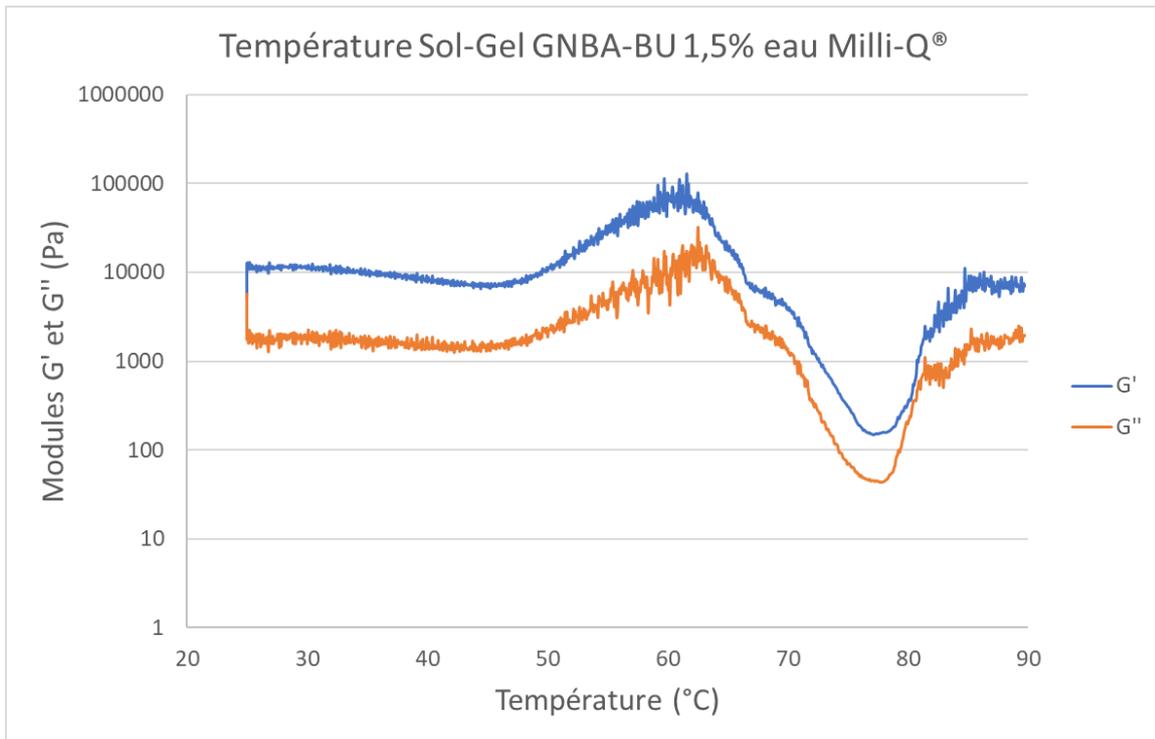


Figure Annexe 8: Température sol-gel GNBA-BU 1,5% DMEM

**diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+**

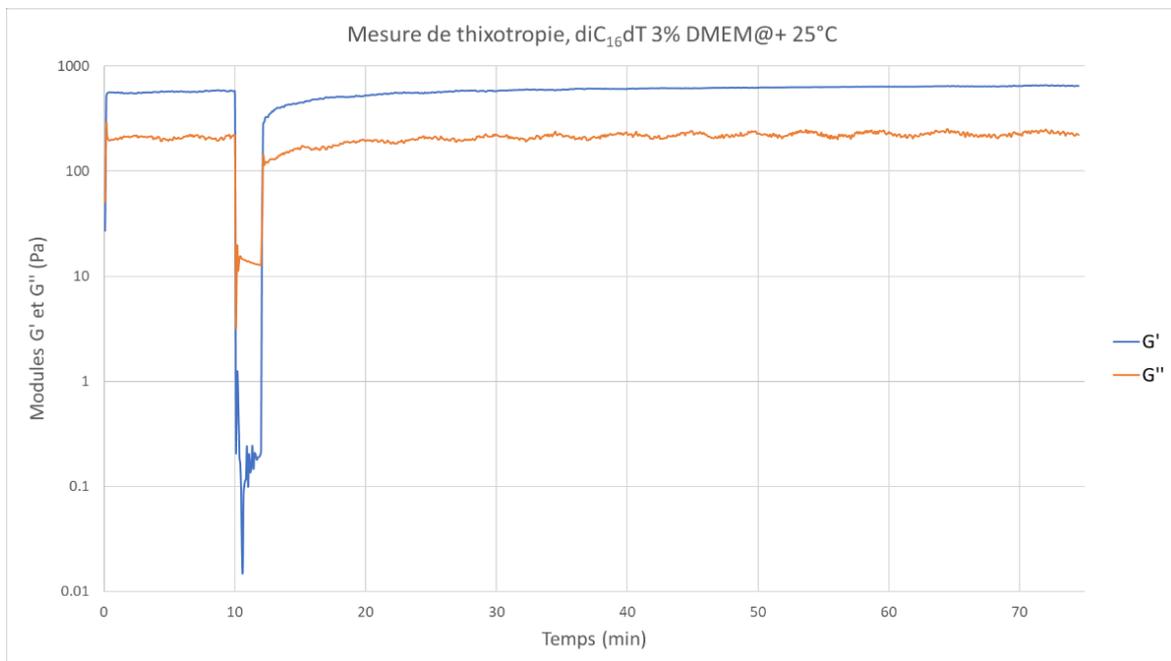


Figure Annexe 9: Mesure de thixotropie d'un gel de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ à 25°C

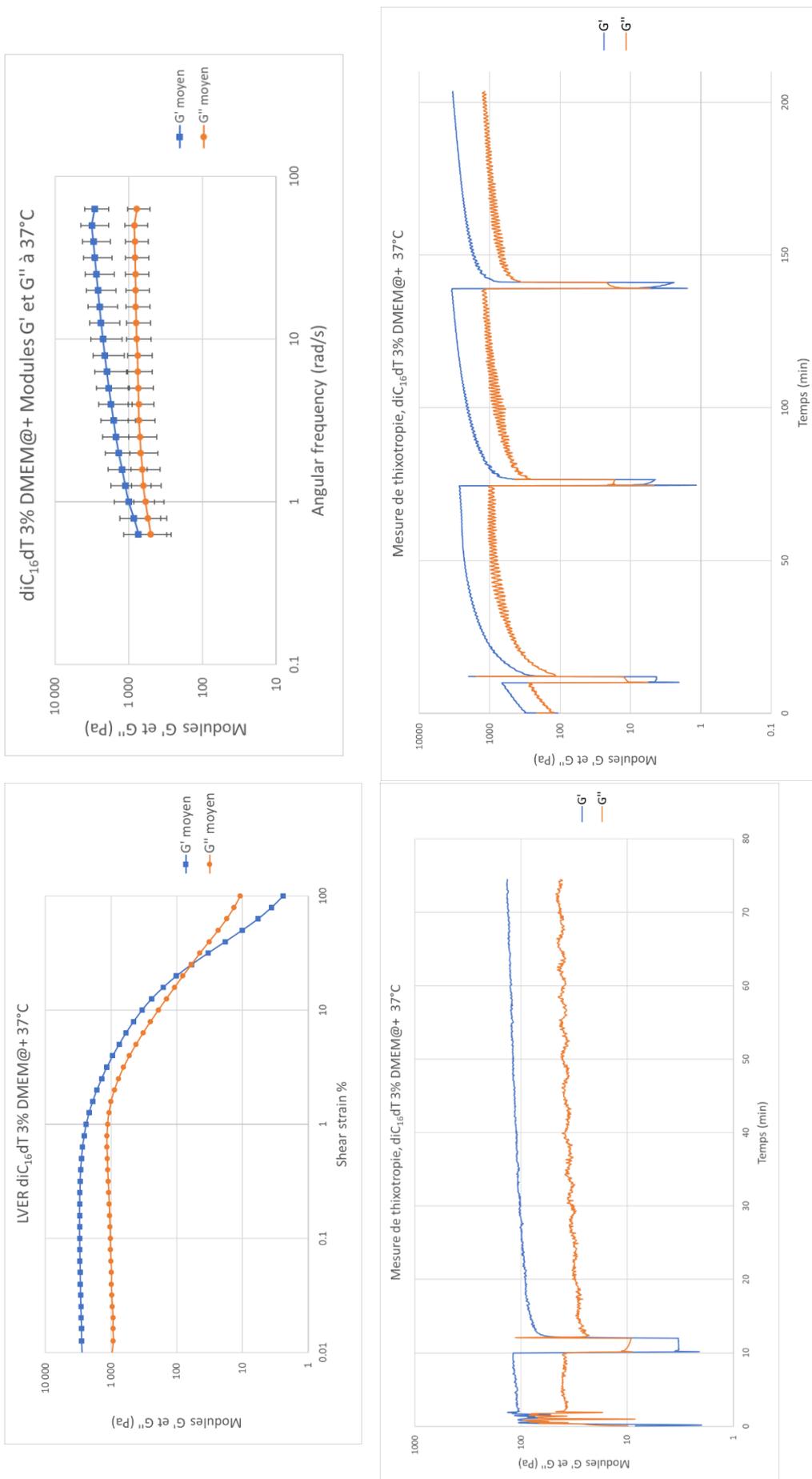


Figure Annexe 10: CR des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ à 37°C

**diC<sub>16</sub>dC 1,5% NaCl 0,9%**

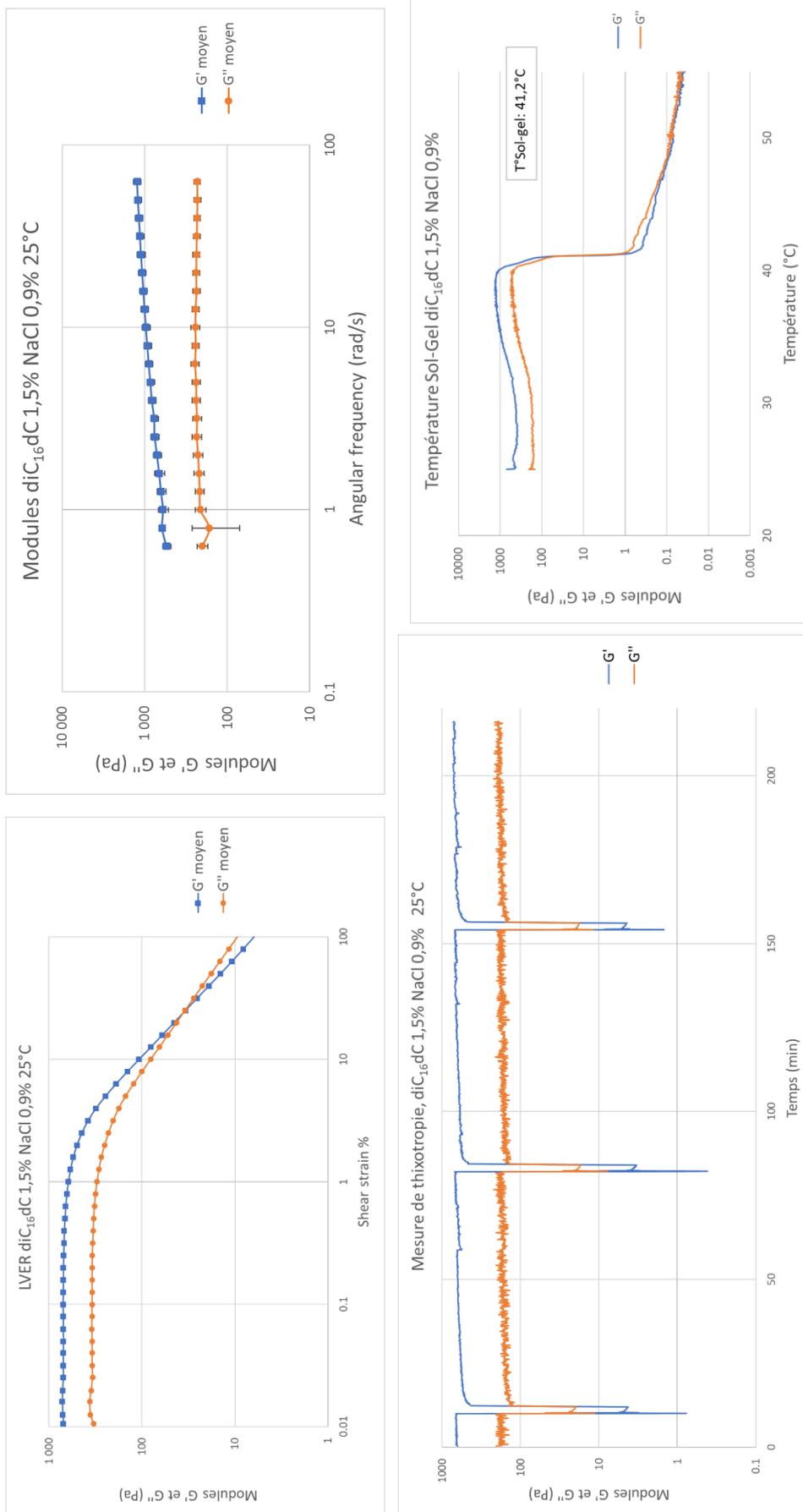


Figure Annexe 11: CR des gels de diC<sub>16</sub>dC 1,5% NaCl 0,9% à 25°C

**diC<sub>16</sub>dC 1,5% DMEM@+**

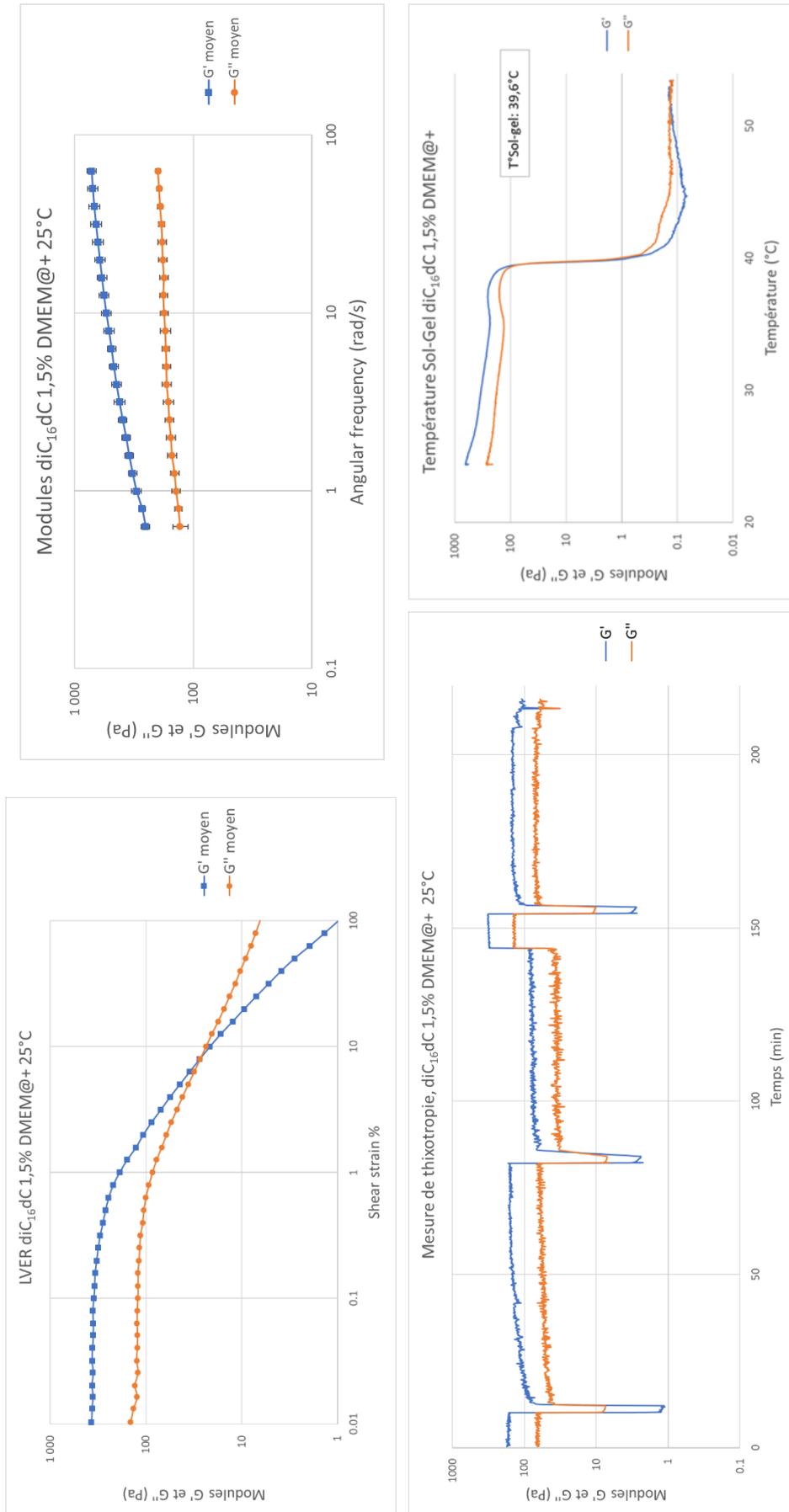


Figure Annexe 12: CR des gels de diC<sub>16</sub>dC 1,5% DMEM@+ à 25°C

**diC<sub>16</sub>dC 2% NaCl 0,9%**

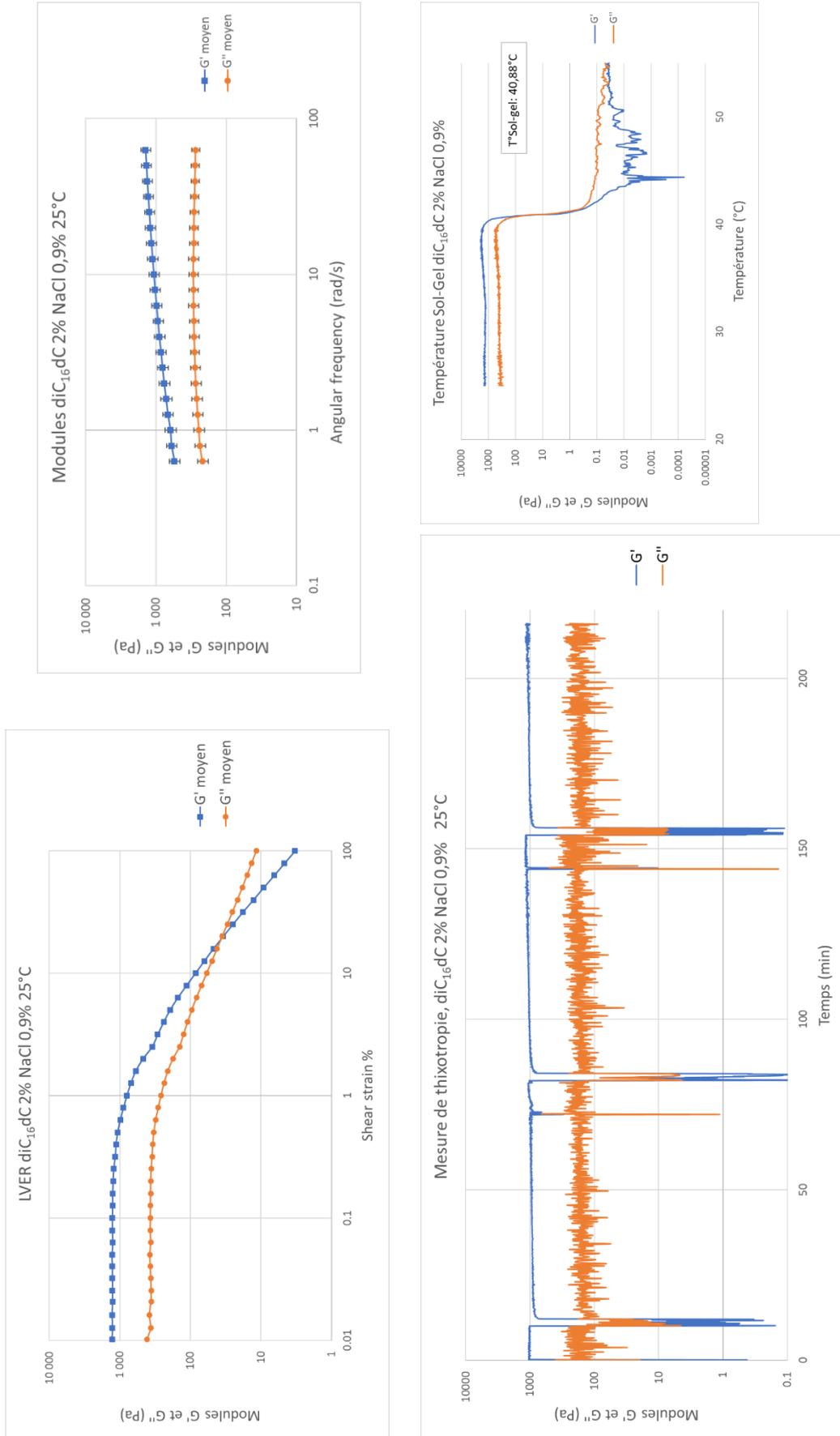
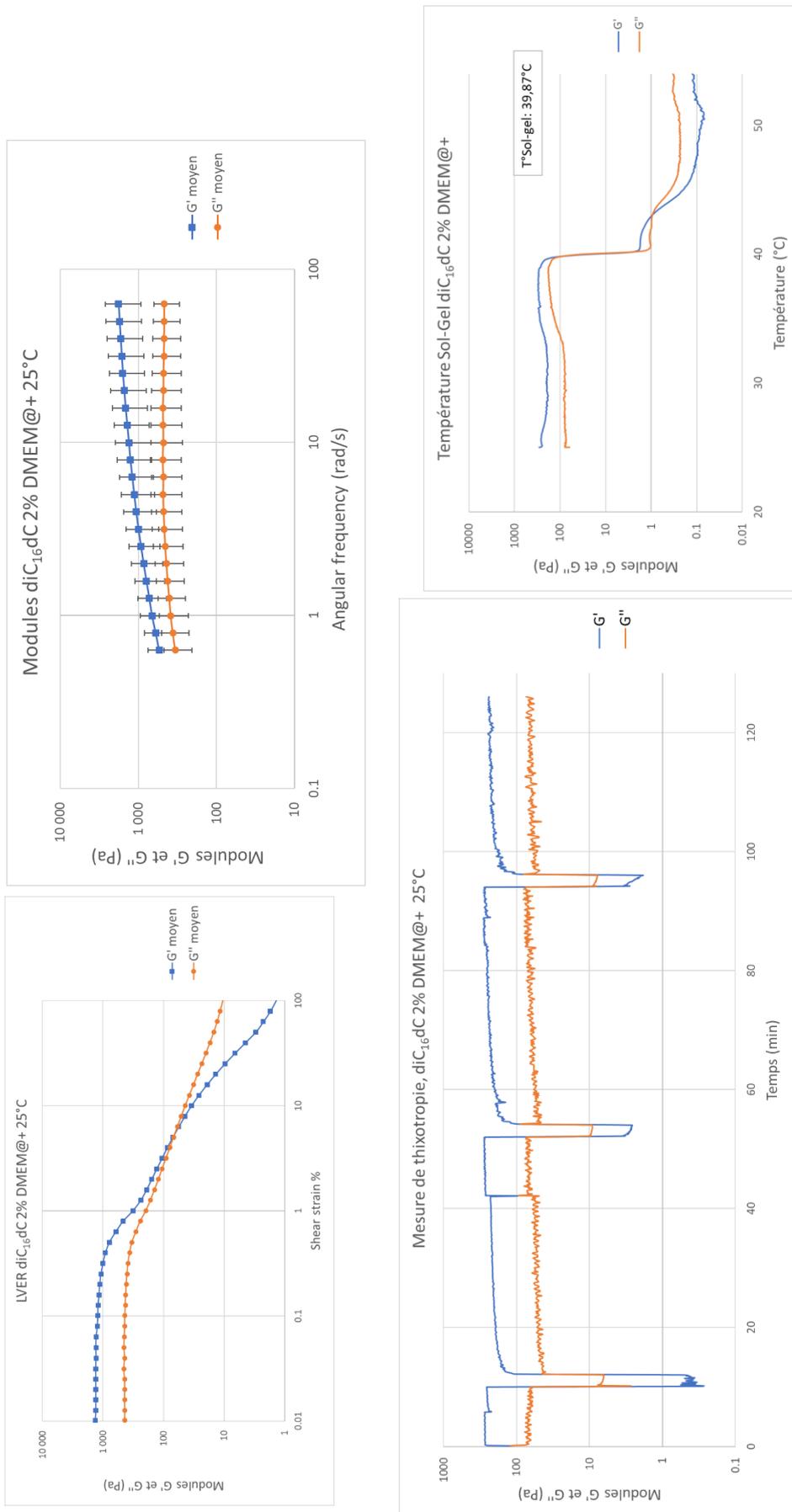


Figure Annexe 13: CR des gels de diC<sub>16</sub>dC 2% NaCl 0,9% à 25°C

**diC<sub>16</sub>dC 2% DMEM@+**



**Figure Annexe 14: CR des gels de diC<sub>16</sub>dC 2% DMEM@+ à 25°C**

**diC<sub>16</sub>dC 3% NaCl 0,9%**

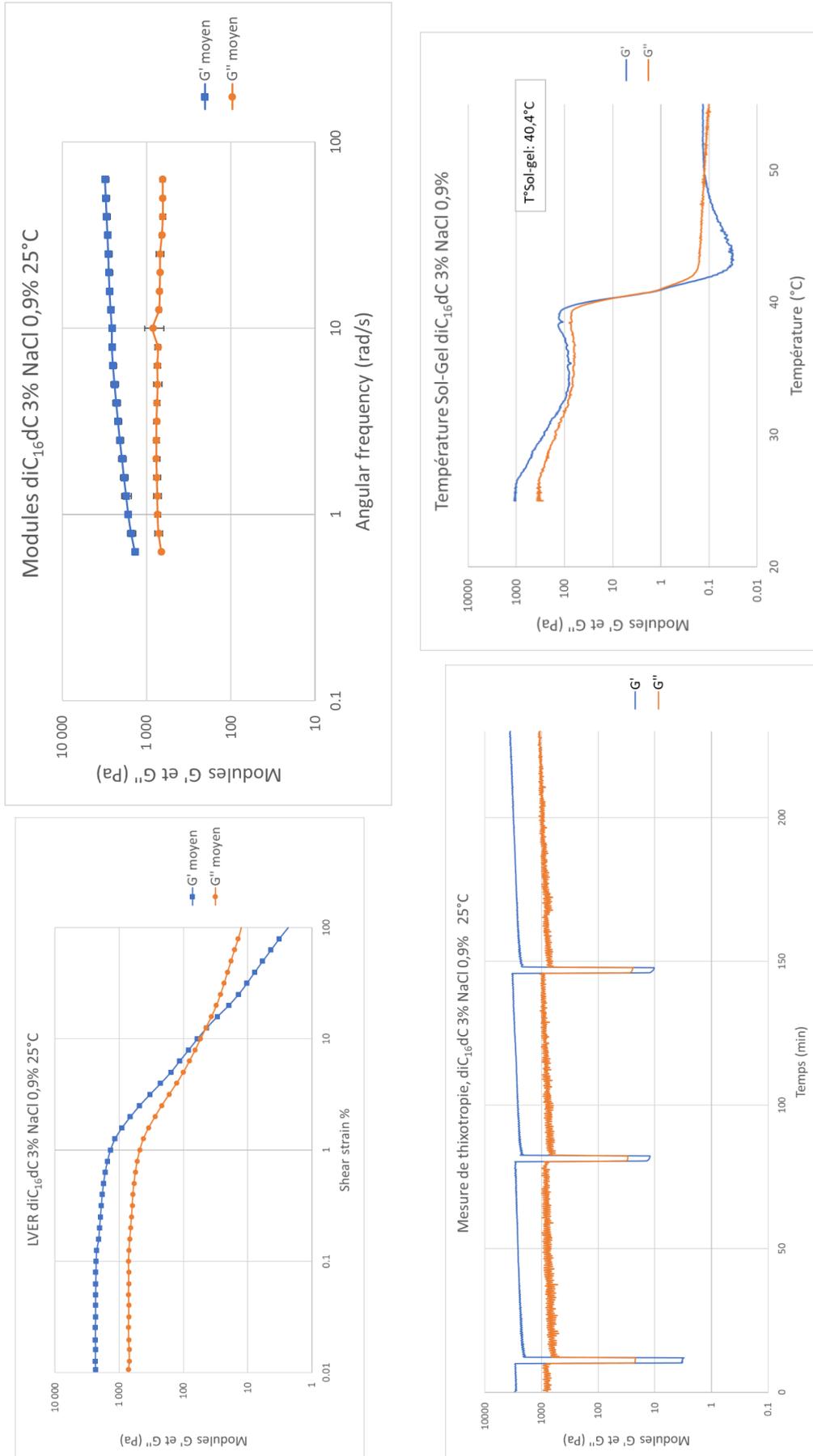
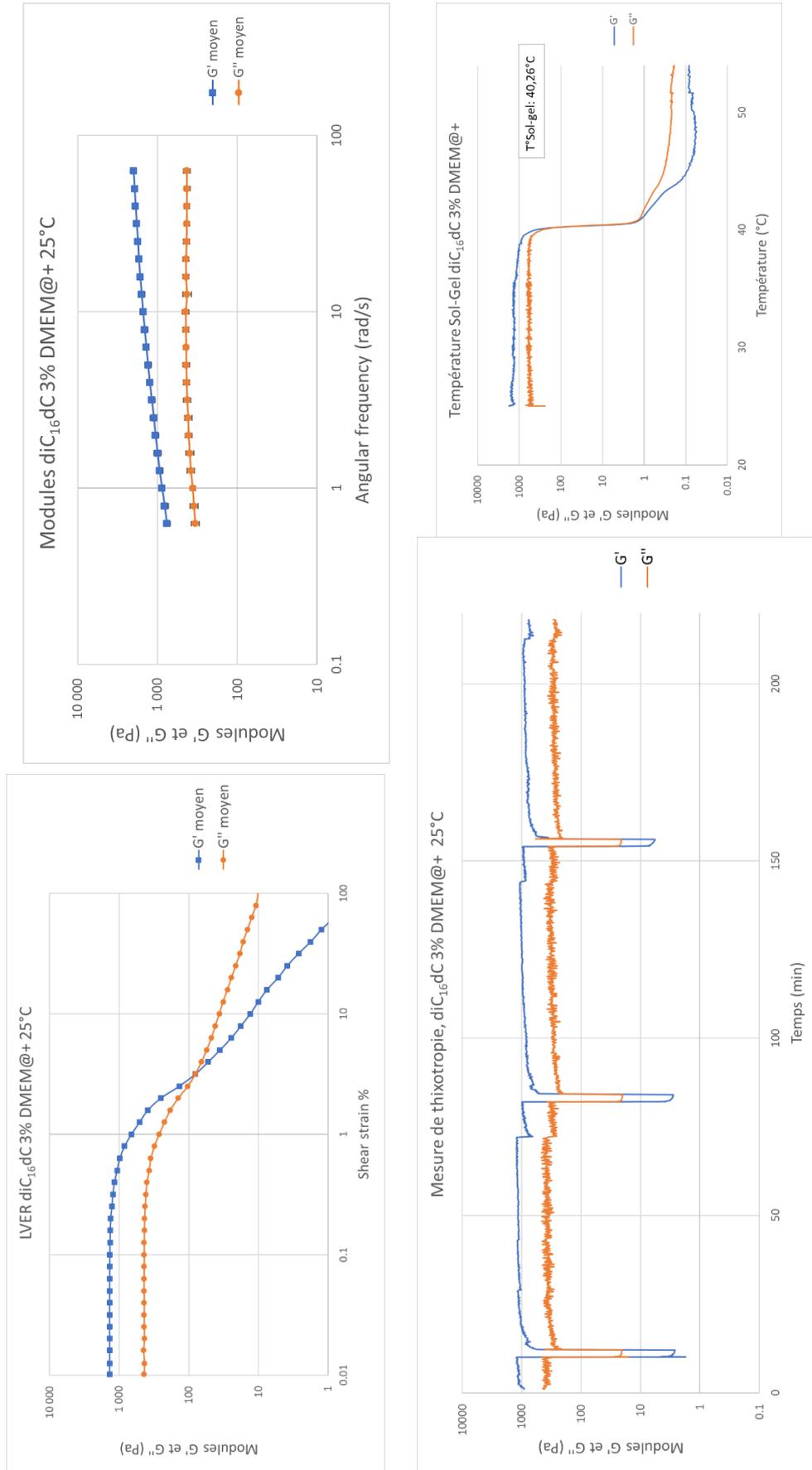


Figure Annexe 15: CR des gels de diC<sub>16</sub>dC 3% NaCl 0,9% à 25°C

**diC<sub>16</sub>dC 3% DMEM@+**



**Figure Annexe 16: CR des gels de diC<sub>16</sub>dC 3% DMEM@+ à 25°C**

Tableau Annexe I : Composition des milieux de culture utilisés

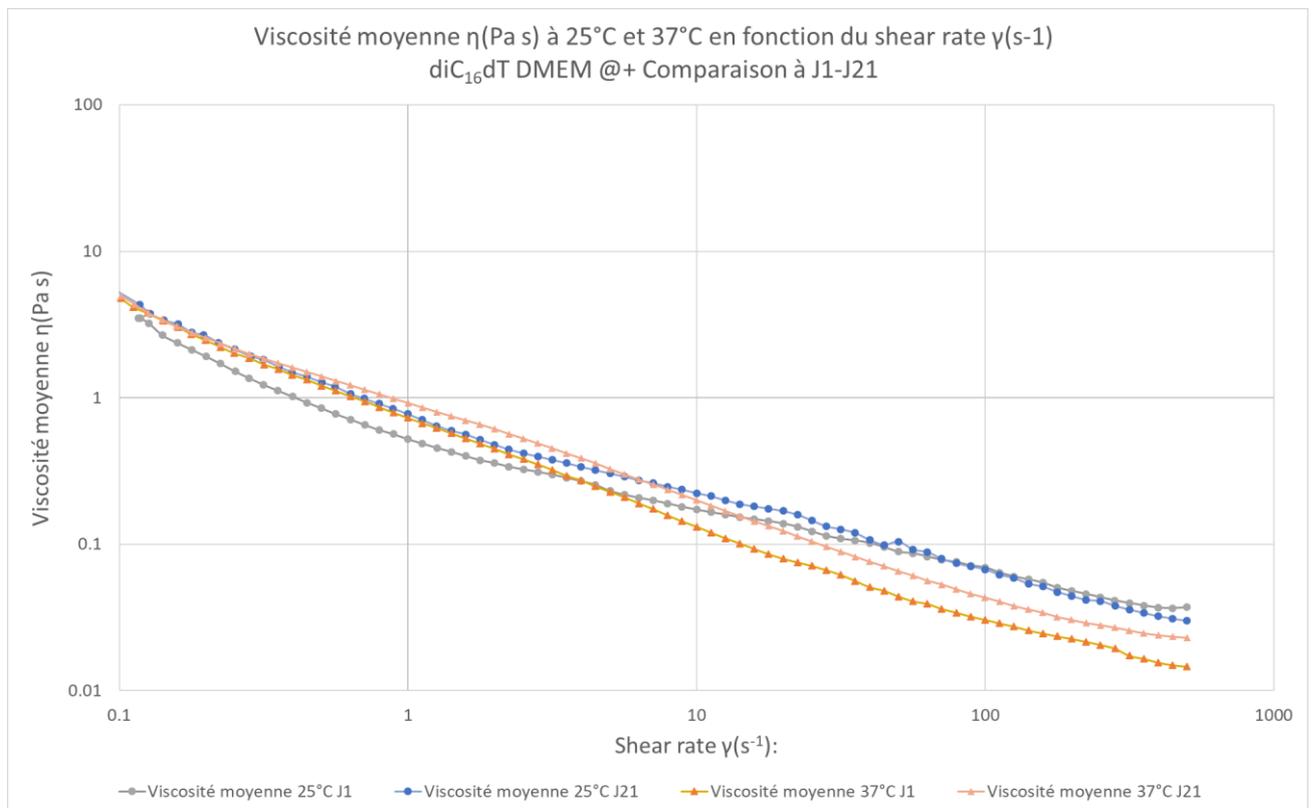
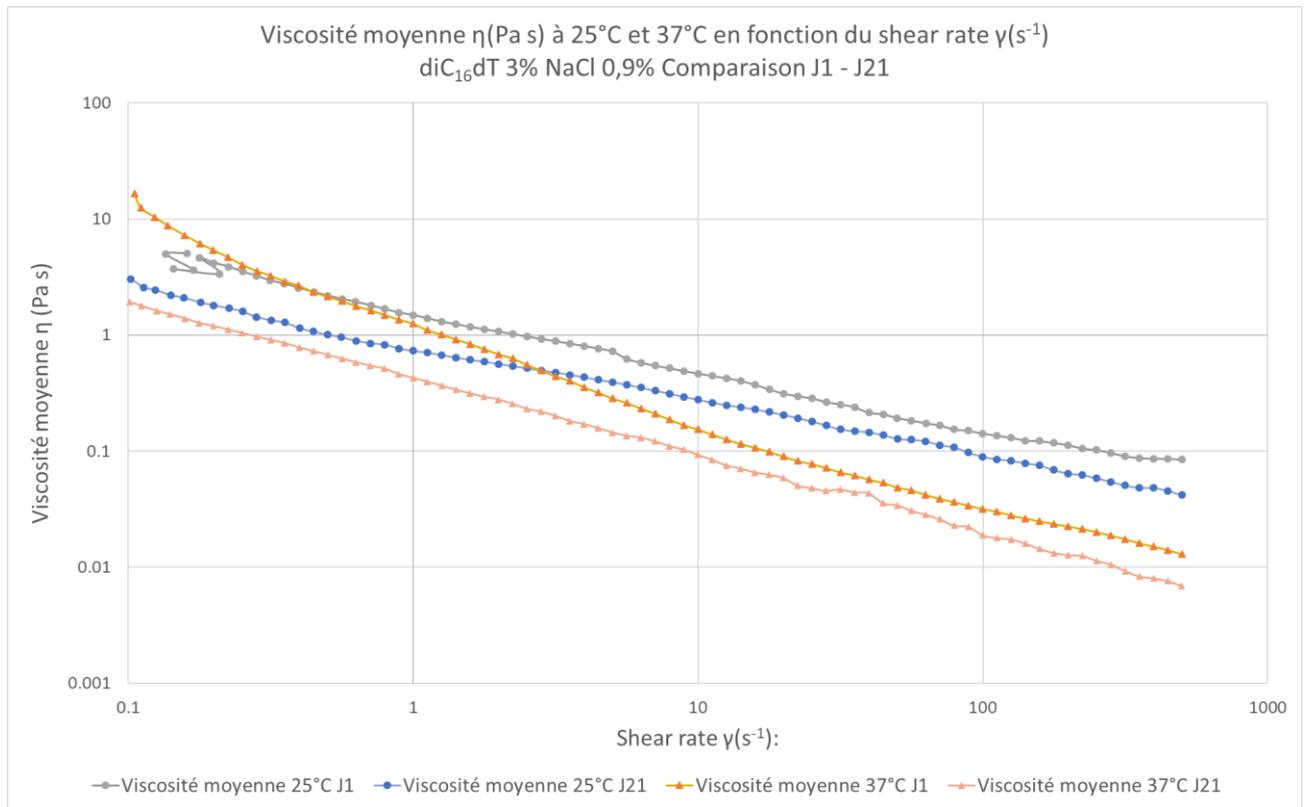
	DMEM	IMDM	StemSpan™		DMEM	IMDM	StemSpan™
<b>Glucides (mg/L)</b>				<b>Electrolytes Sels inorganiques (mg/L)</b>			
D Glucose	1000	4500	4500	CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	264	165	165
<b>Acides Aminés (mg/L)</b>				Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O	0.1	-	-
Glycine	30	30	30	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	200	97	97
L-Alanine	-	25	25	KCl	400	330	330
L-Arginine HCl	84	84	84	NaCl	6400	4505	4505
L-Asparagine H <sub>2</sub> O	-	25	25	NaHCO <sub>3</sub>	3700	3024	3024
L-Aspartic Acid	-	30	30	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	141	125	109
L-Cystine 2HCl	48	91	91	KNO <sub>3</sub>	-	0.076	0.076
L-Glutamic Acid	-	75	75	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> 5H <sub>2</sub> O	-	0.017	0.017
L-Glutamine	862	584	584	<b>Vitamines</b>			
L-Histidine HCl H <sub>2</sub> O	42	42	42	D-Biotine (Vit B8)	-	0,013	0,013
L-Isoleucine	105	105	105	Chlorure de Choline	4	4	4
L-Leucine	105	105	105	Acide pantothénique (Vit B5)	4	4	4
L-Lysine HCl	146	146	146	Acide Folique (Vit B9)	4	4	4
L-Methionine	30	30	30	Nicotinamide ou Niacinamide	4	4	4
L-Phénylalanine	66	66	66	Pyridoxine (Vit B6)	4	4	4
L-Proline	-	40	40	Riboflavine (Vit B2)	0,4	0,4	0,4
L-Serine	42	42	42	Thiamine (Vit B1)	4	4	4
L-Threonine	95	95	95	Inositol	7,2	7,2	7,2
L-Tryptophan	16	16	16	Cobalamine (Vit B12)	-	0,013	0,013
L-Tyrosine disodique	72	104	104				
L-Valine	94	94	94				
<b>Divers</b>							
Rouge de Phénol sodique (mg/L)	15	15	15	Sérum-albumine bovine	-	-	X
HEPES (solution tampon) mg/L	-	5958	5958	Insuline humaine recombinante	-	-	X
Acide pyruvique (mg/L)	110	110	110	Transferrine humaine	-	-	X
				2-Mercapto-ethanol	-	-	X

X = quantité non précisée par le fabricant ; «-» = absence

Source des compositions: DMEM (215), IMDM (216), StemSpan™ SFEM (217)

I.2 Partie 2 : la diC<sub>16</sub>dT dans la formulation d'encre et bioencre

**diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+**



**Figure Annexe 17: Détermination de la viscosité des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% formés dans le NaCl 0,9% et le DMEM@+ à 25°C et 37°C. Comparaison des mesures à J1 et J21.**

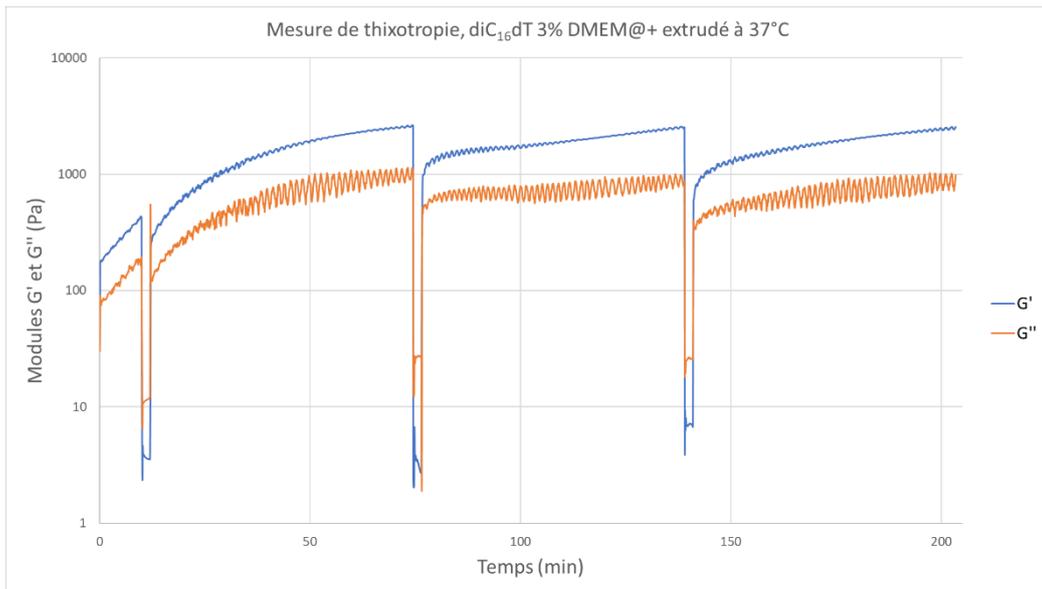
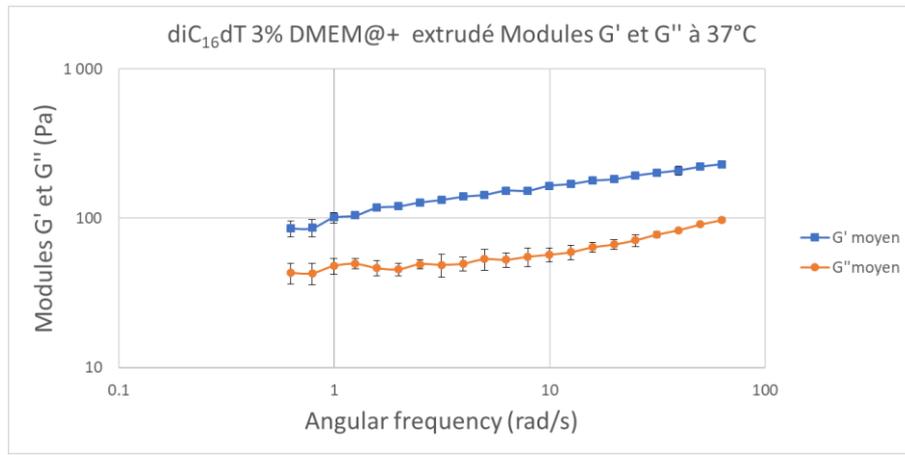


Figure Annexe 18: CR des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+, extrudés, à 37°C

Tableau Annexe II : Distance moyenne entre chaque brin vertical et horizontal pour 5 grilles et analyse statistique

Distance inter-brins		Grille 1		Grille 2		Grille 3		Grille 4		Grille 5	
		$\mu$ (mm)	$\sigma$								
Brins verticaux	I-II	2965	18	3036	20	3012	8	3034	24	3212	11
	II-III	2986	26	2763	0	2750	24	3038	13	2759	13
	III-IV	2941	19	3086	24	3096	25	2893	20	3200	18
Brins horizontaux	W-X	2852	9	2797	11	2833	7	2843	25	2898	32
	X-Y	2969	9	3067	11	3022	17	2928	21	3052	69
	Y-Z	3315	19	3133	15	3201	11	2937	60	3015	41

$\mu$  = moyenne;  $\sigma$  = écart type;

Tableau Annexe III: Calcul du volume des pores, de la porosité des grilles et analyse statistique réalisée sur 5 grilles imprimées

		Grille 1	Grille 2	Grille 3	Grille 4	Grille 5	Grille théorique
<b><u>Volume des pores (mm<sup>3</sup>)</u></b>							
<b>Pores</b>	<b>A1</b>	1.45	1.14	0.77	1.94	1.83	4.62
	<b>A2</b>	1.21	2.23	1.25	3.37	2.88	4.62
	<b>A3</b>	4.51	1.38	1.57	3.36	2.71	4.62
	<b>B1</b>	1.22	0.84	0.44	0.00	2.29	4.62
	<b>B2</b>	1.33	0.26	1.01	2.40	2.47	4.62
	<b>B3</b>	1.10	0.88	0.51	1.73	2.26	4.62
	<b>C1</b>	1.57	0.24	0.34	1.73	1.83	4.62
	<b>C2</b>	2.41	1.37	1.76	1.42	2.00	4.62
	<b>C3</b>	0.77	2.16	2.86	1.15	1.50	4.62
	<b>Volume total des pores</b>	15.58	10.51	10.51	17.09	19.79	41.58
	<b>Volume moyen d'un pore</b>	1.73	1.17	1.17	1.90	2.20	4.62
<b>Ecart type</b>	1.14	0.72	0.81	1.06	0.45	0.00	
<b>Volume moyen des pores d'une grille</b>		1.63					
<b>Ecart type</b>		0.46					
<b><u>Hauteur des grilles (mm)</u></b>							
<b>Hauteur (mm)</b>		1.53	1.57	1.55	1.48	1.50	1.155
<b><u>Longueur des brins (mm)</u></b>							
<b>Brins</b>	<b>I</b>	10.35	10.19	10.02	10.60	10.34	10
	<b>IV</b>	10.63	10.32	10.40	10.62	10.53	10
	<b>w</b>	10.94	10.59	10.91	11.07	10.86	10
	<b>z</b>	10.65	10.89	10.86	11.17	10.83	10
<b><u>Volume des grilles sans les pores (mm<sup>3</sup>)</u></b>							
<b>Volume (mm<sup>3</sup>)</b>		170.17	165.53	166.88	177.31	170.09	115.5
<b><u>Porosité %</u></b>							
<b>Porosité %</b>		9.16	6.35	6.30	9.64	11.63	36
<b>Porosité moyenne %</b>		8.61					
<b>Ecart type</b>		2.29					

**diC<sub>16</sub>dT 4% DMEM@+**

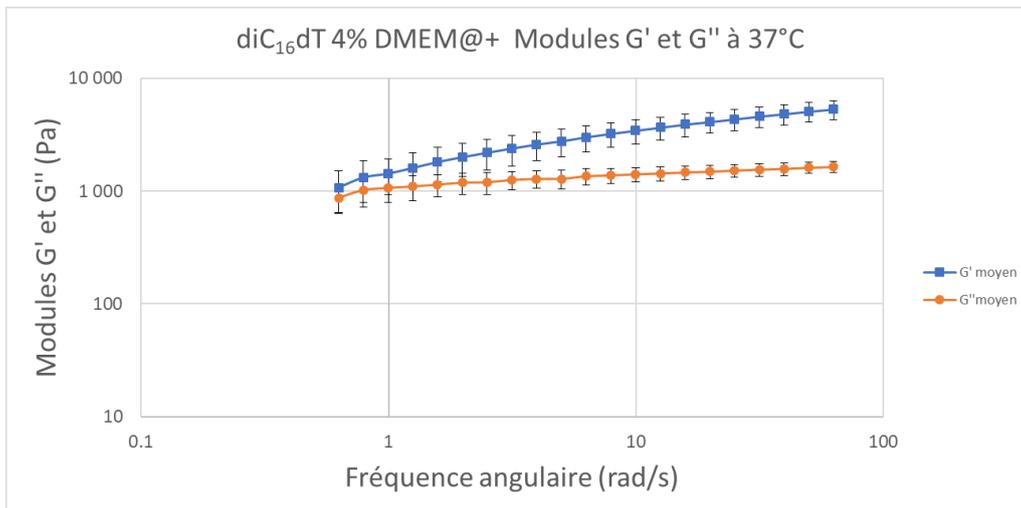
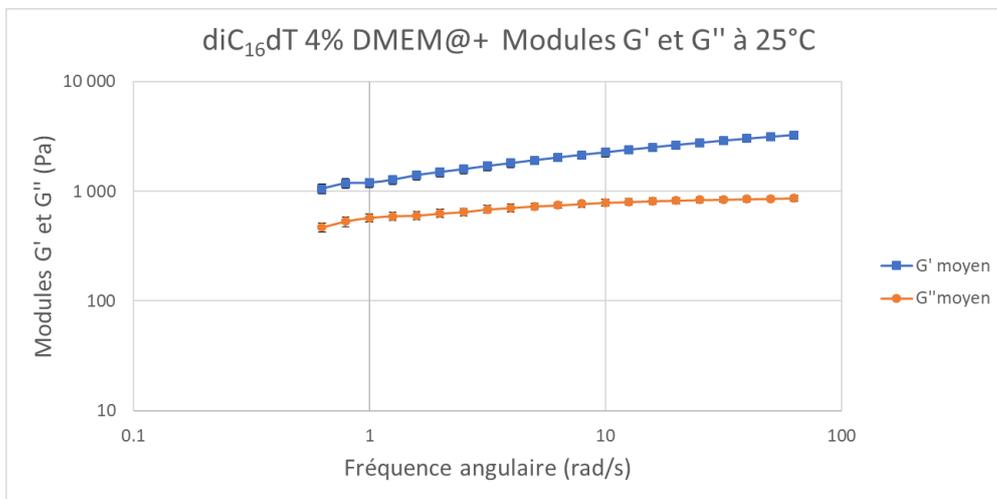
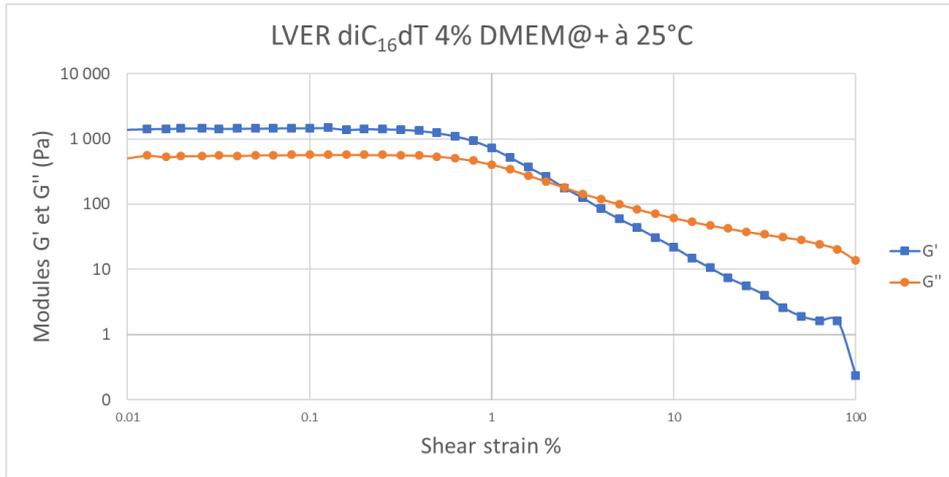


Figure Annexe 19: CR des gels de diC<sub>16</sub>dT 4% DMEM@+, non extrudés, à 25°C et 37°C

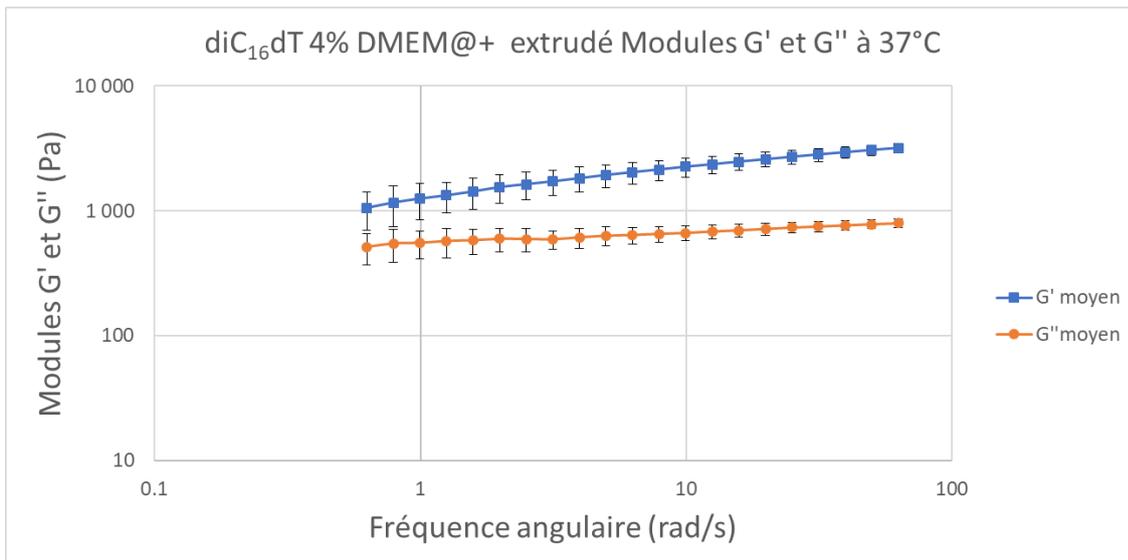
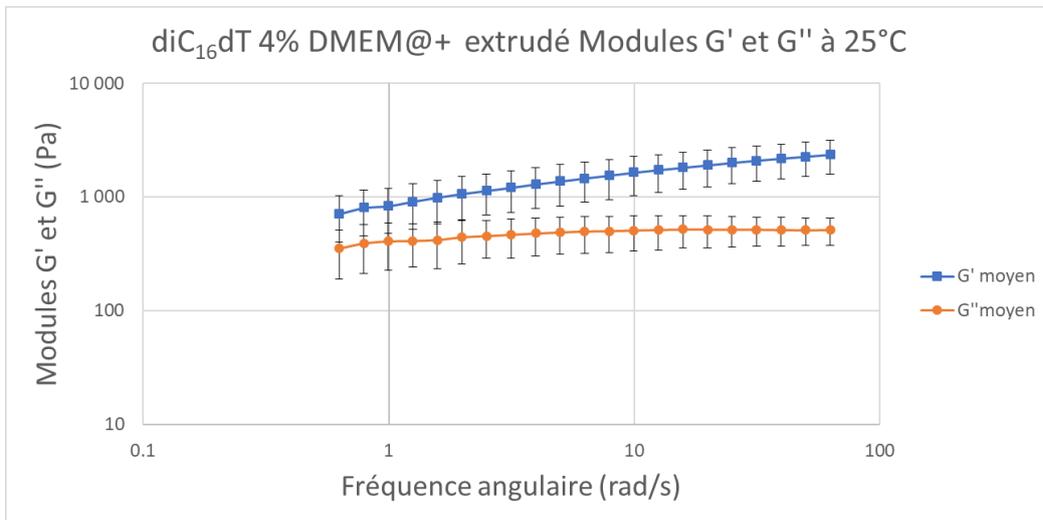
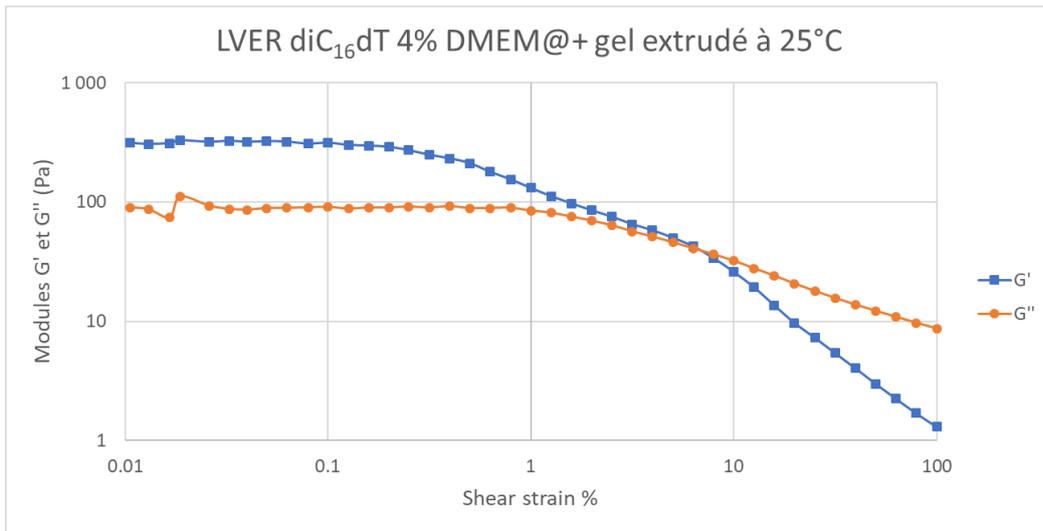


Figure Annexe 20: CR des gels de diC<sub>16</sub>dT 4% DMEM@+, extrudés à 25°C et 37°C

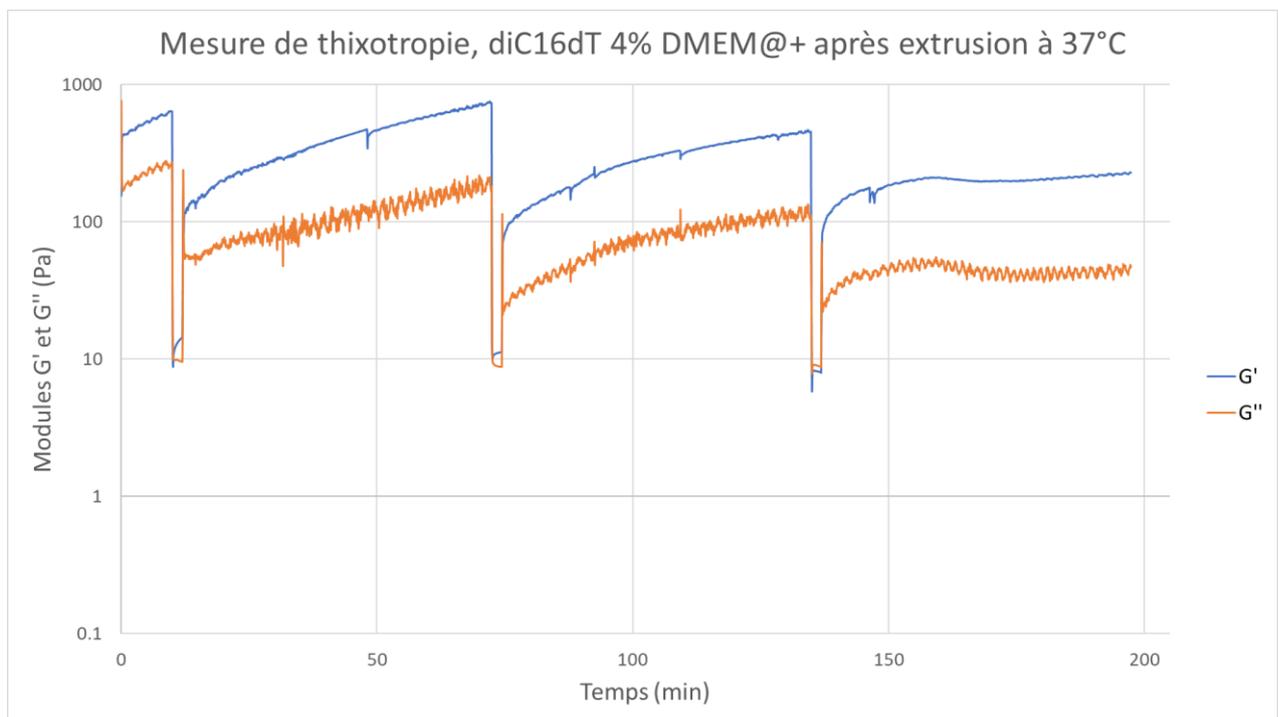
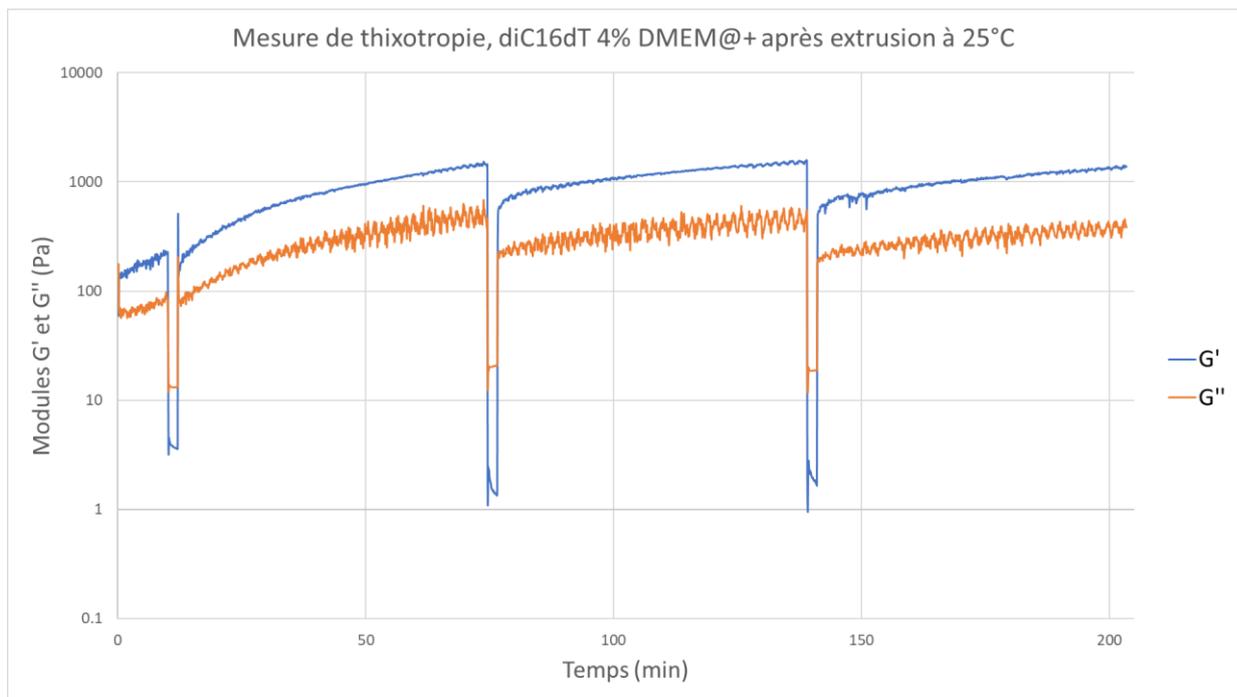


Figure Annexe 21: Détermination des propriétés thixotropes des gels de diC<sub>16</sub>dT 4% DMEM@+, extrudés à 25°C et 37°C

**diC<sub>16</sub>dT 5% DMEM@+**

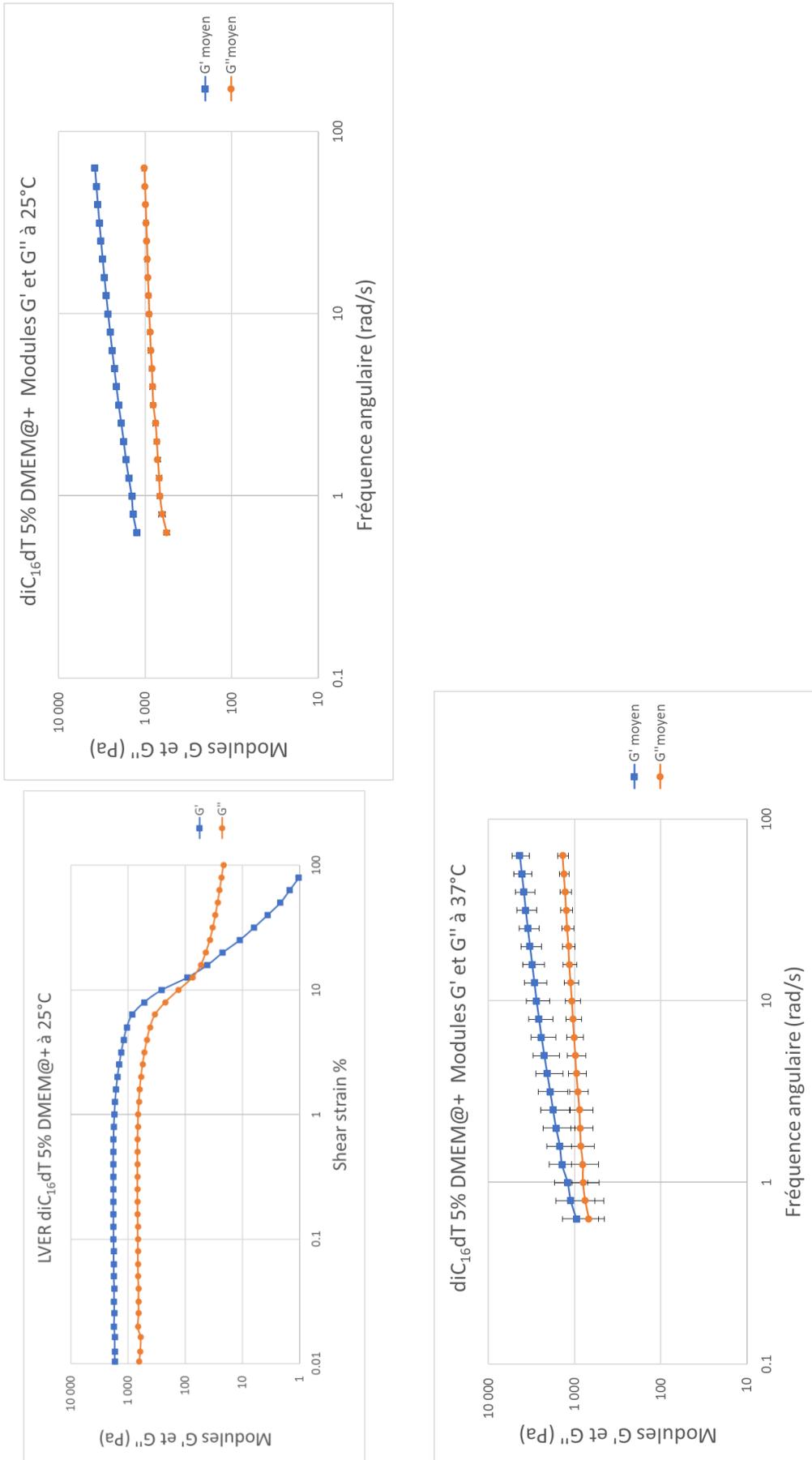


Figure Annexe 22: CR des gels de diC<sub>16</sub>dT 5% DMEM@+, non extrudés, à 25°C et 37°C

**diC<sub>16</sub>dT 6% DMEM@+**

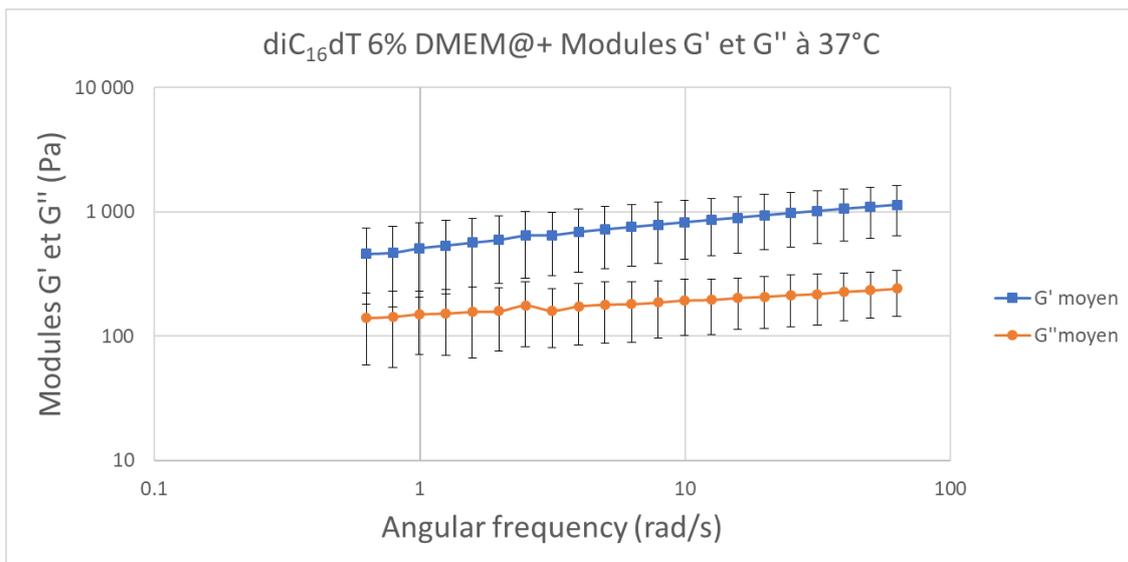
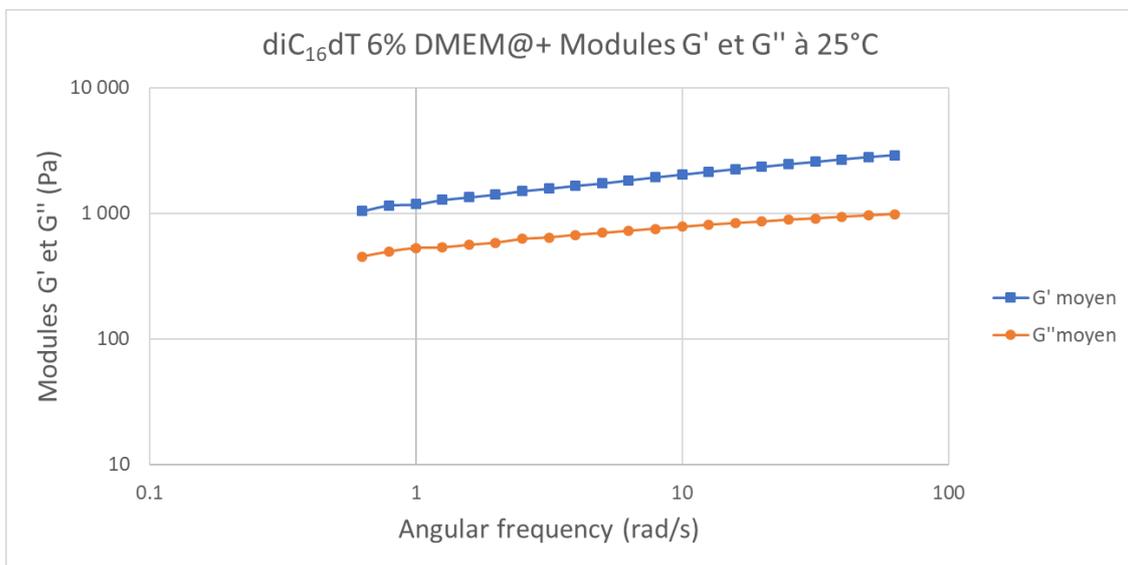
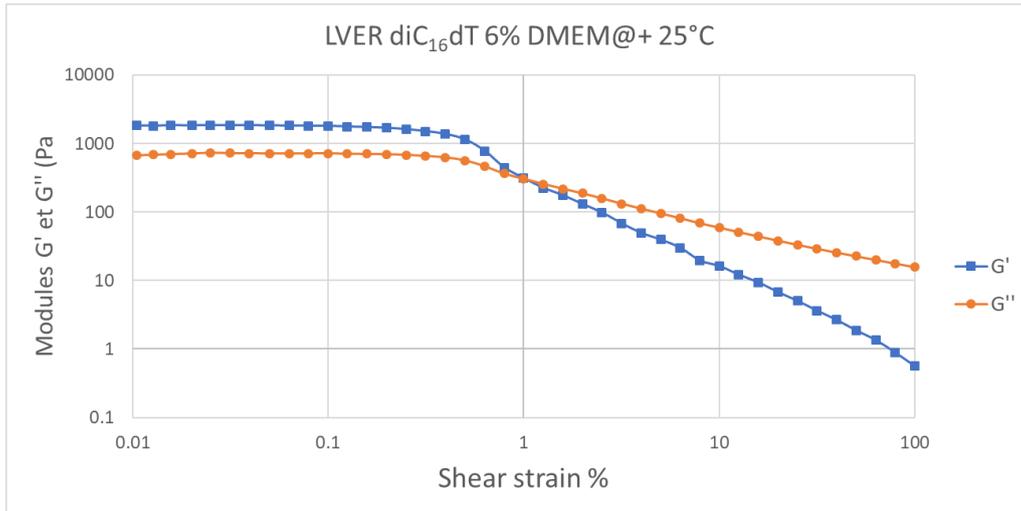


Figure Annexe 23: CR des gels de diC<sub>16</sub>dT 6% DMEM@+, non extrudés, à 25°C et 37°C

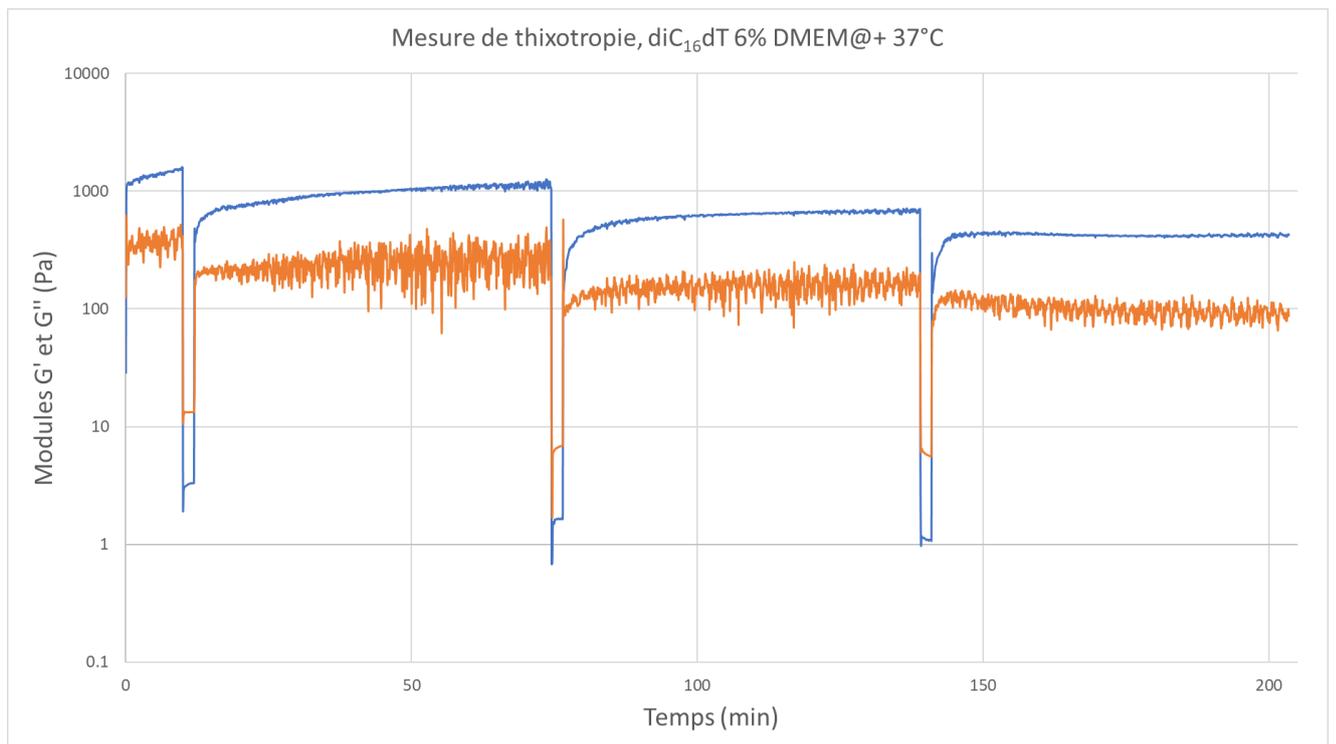
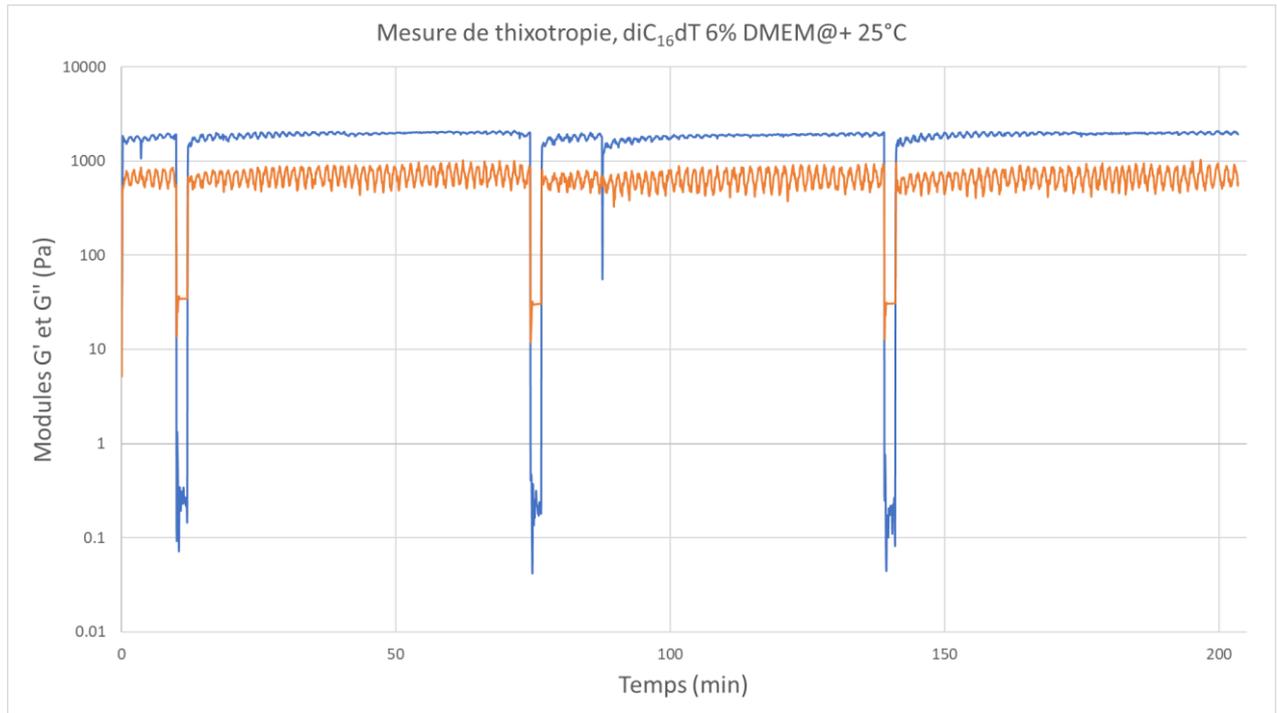
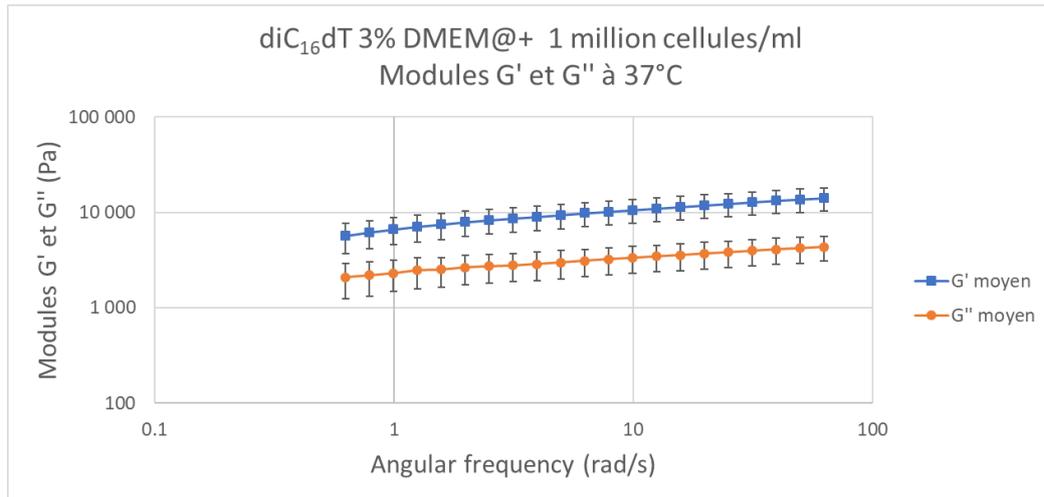


Figure Annexe 24: Détermination des propriétés thixotropes des gels de diC<sub>16</sub>dT 6% DMEM@+, non extrudés, à 25°C et 37°C.

**Bioencres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+**



**Figure Annexe 25 : CR des bioencres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ contenant 1 millions de cellules, à 37°C**

**Tableau Annexe IV: Suivi du volume des gels de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ (exprimé en mm<sup>3</sup>) injectés chez des souris en fonction du temps.**

NM. = non mesurable

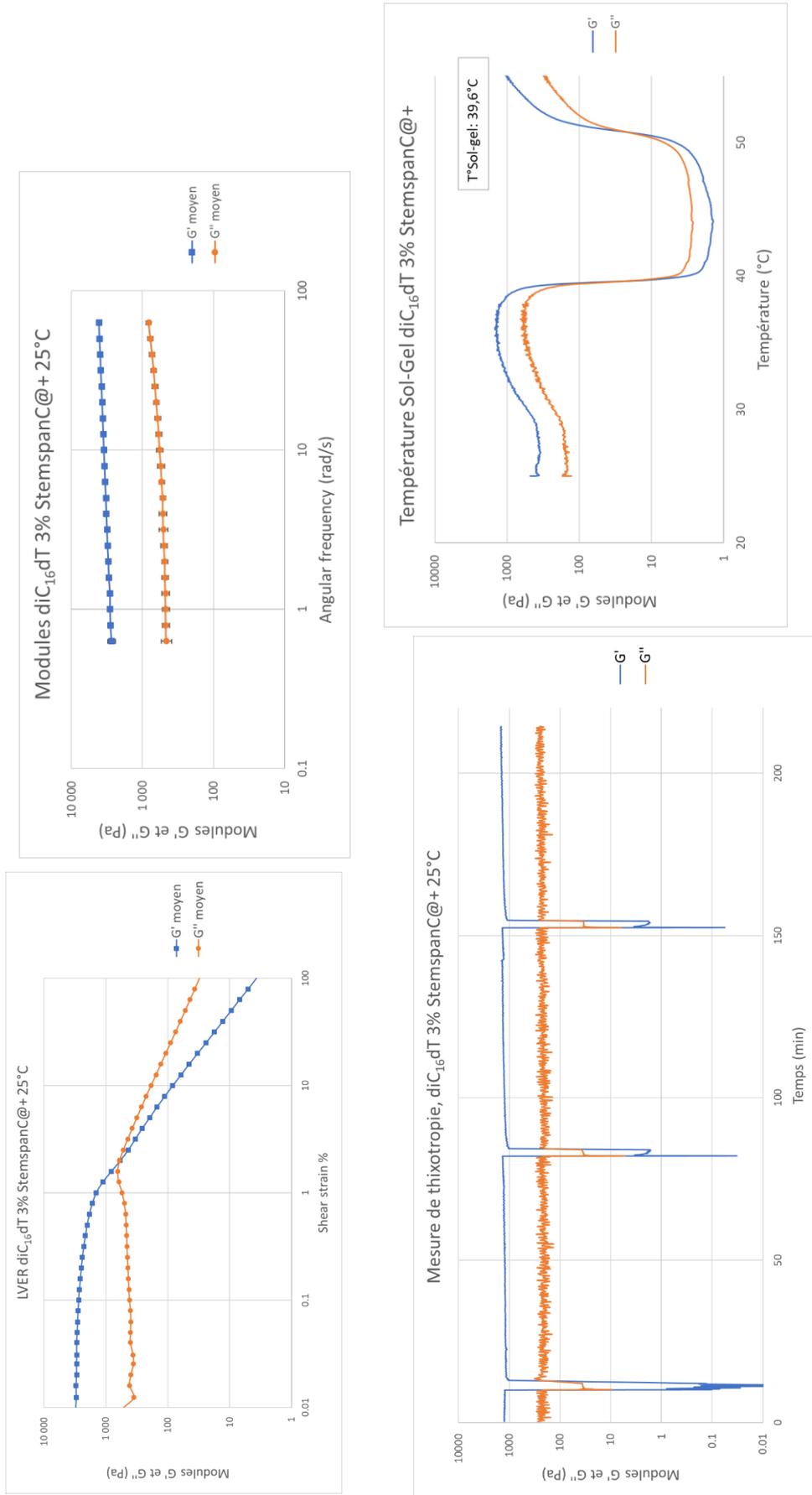
Temps (jours)	Volume des gels (mm <sup>3</sup> )							
	Souris 1	Souris 2		Souris 3		Souris 4		Ecart type
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6	Moyenne	
0	226.70	149.15	154.13	124.48	121.41	206.21	163.68	43.37
3	128.89	NM	119.55	99.89	101.68	121.21	114.25	12.79
8	120.68	129.54	115.54	107.66	101.68	NM	115.02	10.90
11	124.04	120.99	97.01	102.11	96.43	122.37	110.49	13.30
14	94.58	91.41	89.54	88.92	82.93	100.06	91.24	5.77
17	84.53	72.72	90.12	70.21	80.45	91.89	81.65	8.91
21	79.51	36.33	76.47	61.81	65.16	NM	63.85	17.09
24	60.90	20.87	73.74	62.00	55.97	79.58	58.84	20.57

**Tableau Annexe V: Suivi de la dégradation des gels de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ (exprimé en %) injectés chez des souris en fonction du temps.**

NM. = non mesurable

Temps (jours)	Pourcentage de dégradation des gels (%)							
	Souris 1	Souris 2		Souris 3		Souris 4	Moyenne	Ecart type
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	43.15	NM	22.44	19.75	16.25	41.22	28.56	12.65
8	46.77	13.15	25.04	13.51	16.25	NM	22.94	14.16
11	45.28	18.88	37.06	17.97	20.58	40.66	30.07	12.28
14	58.28	38.71	41.91	28.57	31.69	51.47	41.77	11.42
17	62.71	51.24	41.53	43.59	33.74	55.44	48.04	10.46
21	64.93	75.64	50.39	50.34	46.33	NM	57.53	12.36
24	73.14	86.01	52.16	50.19	53.90	61.41	62.80	14.13

**diC<sub>16</sub>dT 3% StempsanC@+**



**Figure Annexe 26: CR des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% StempsanC@+ à 25°C**

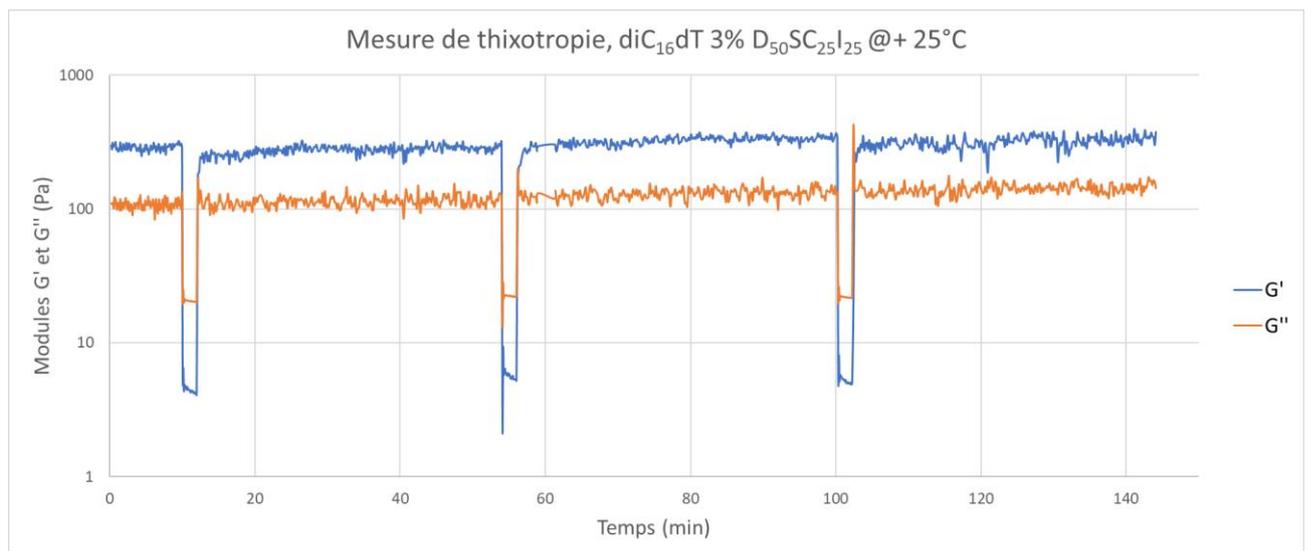
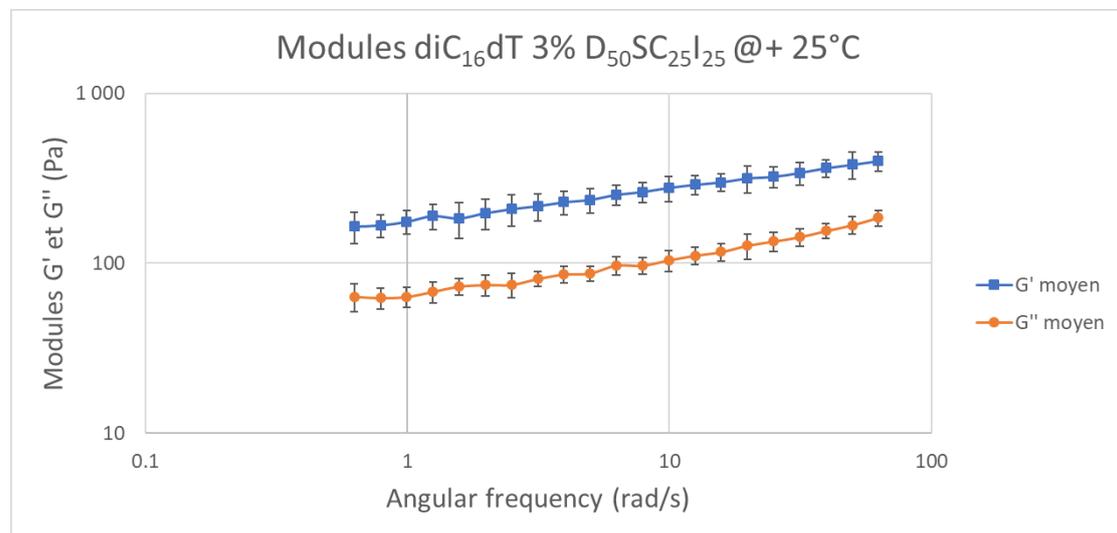
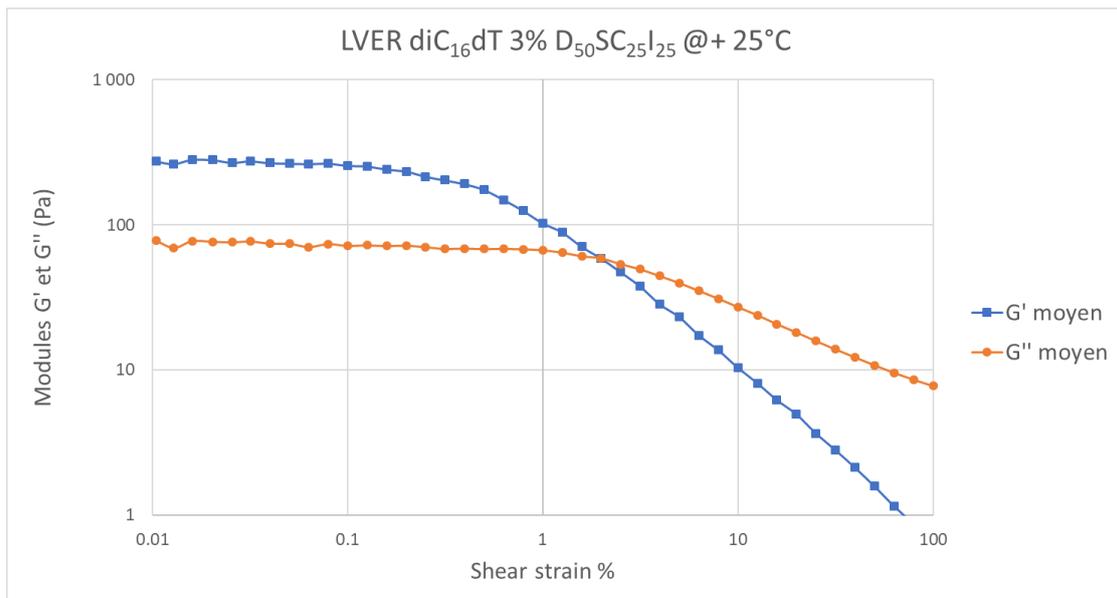


Figure Annexe 27: CR des gels de diC<sub>16</sub>dT 3% D<sub>50</sub>SC<sub>25</sub>I<sub>25</sub> @+ à 25°C

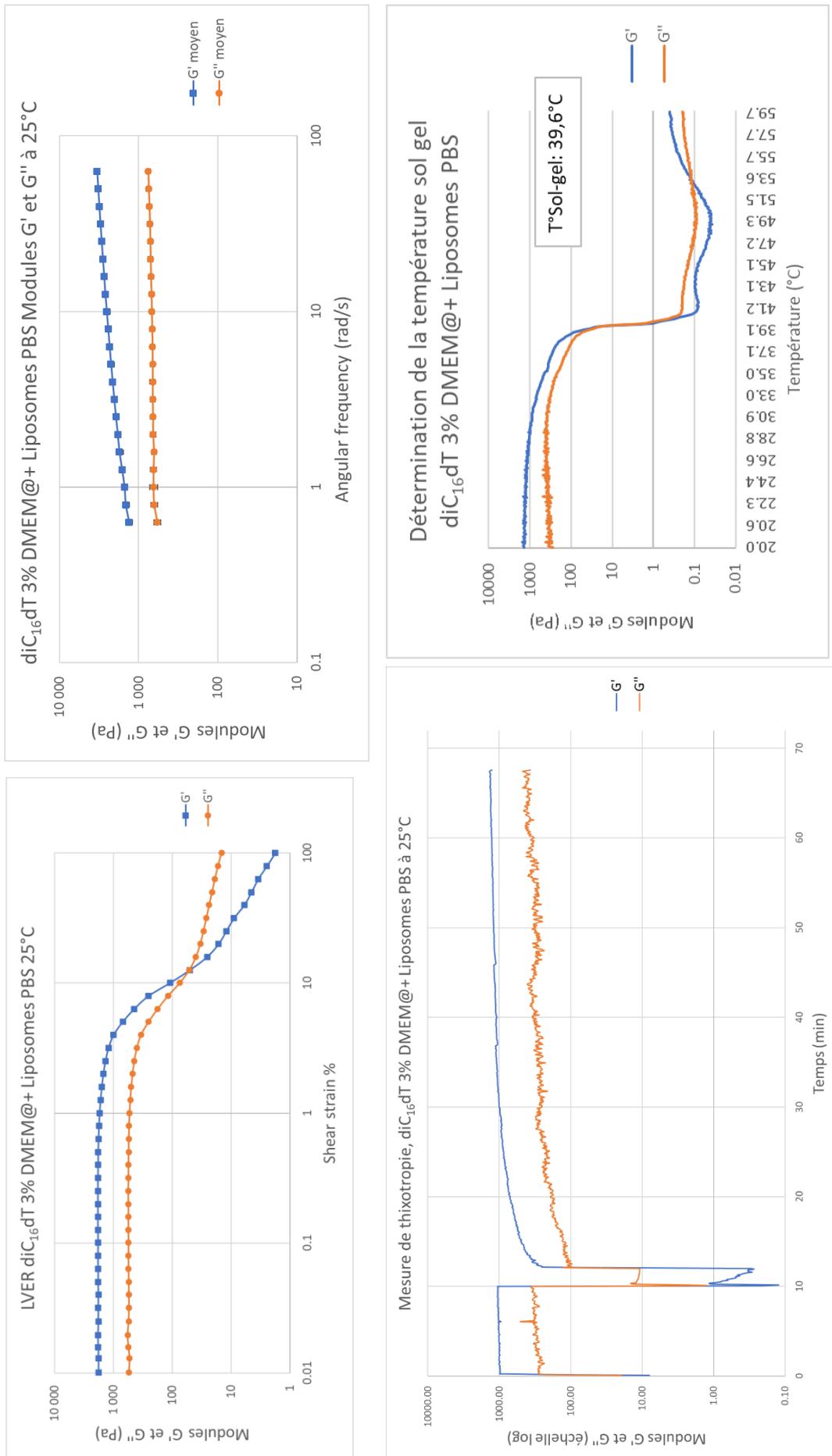


Figure Annexe 28: CR des encres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ chargées en liposomes de PBS à 25°C

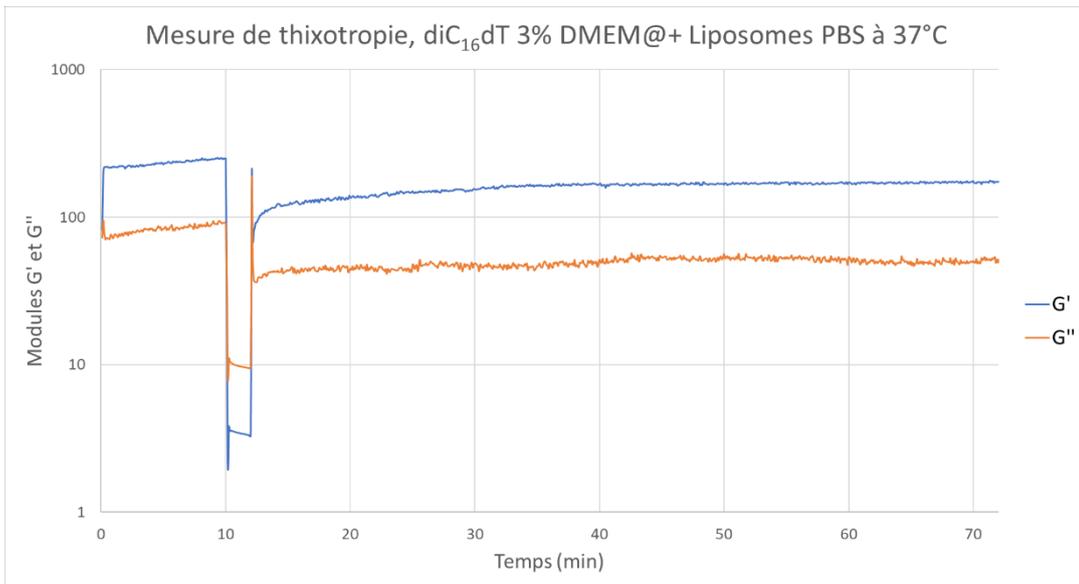
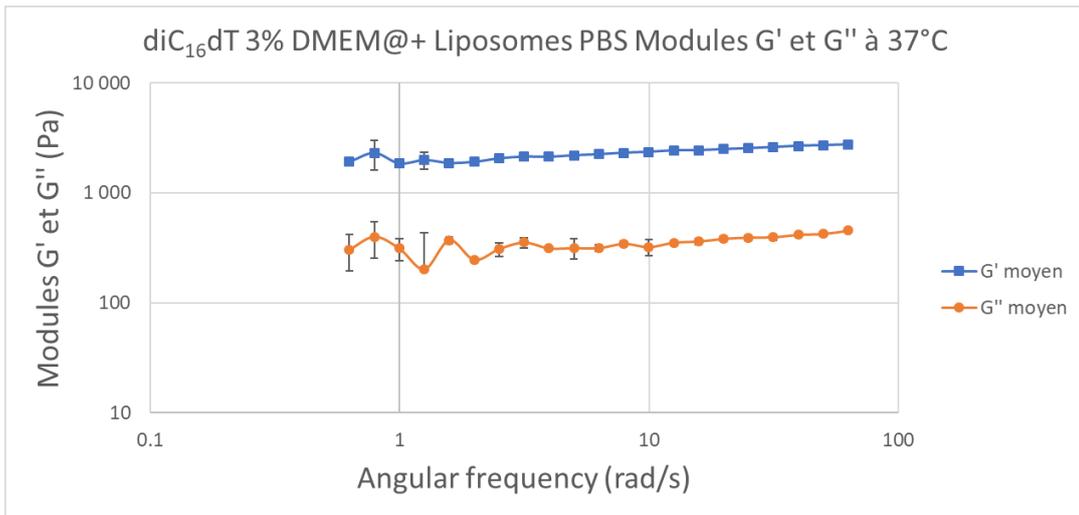


Figure Annexe 29: CR des encres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ chargées en liposomes de PBS à 37°C

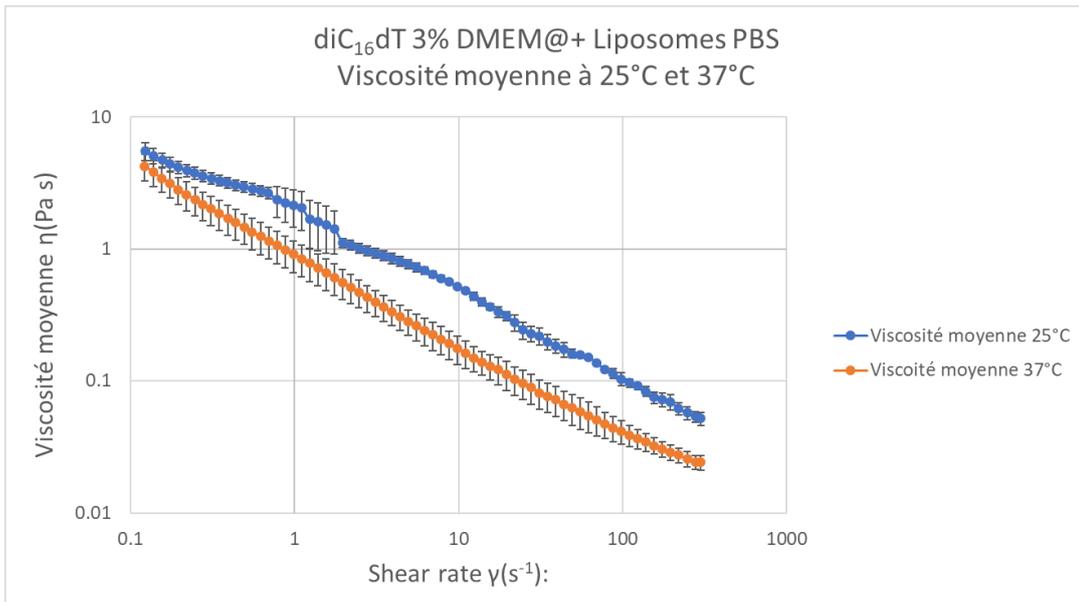


Figure Annexe 30 : Mesure de viscosité de l'encre de diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ chargée en liposomes de PBS

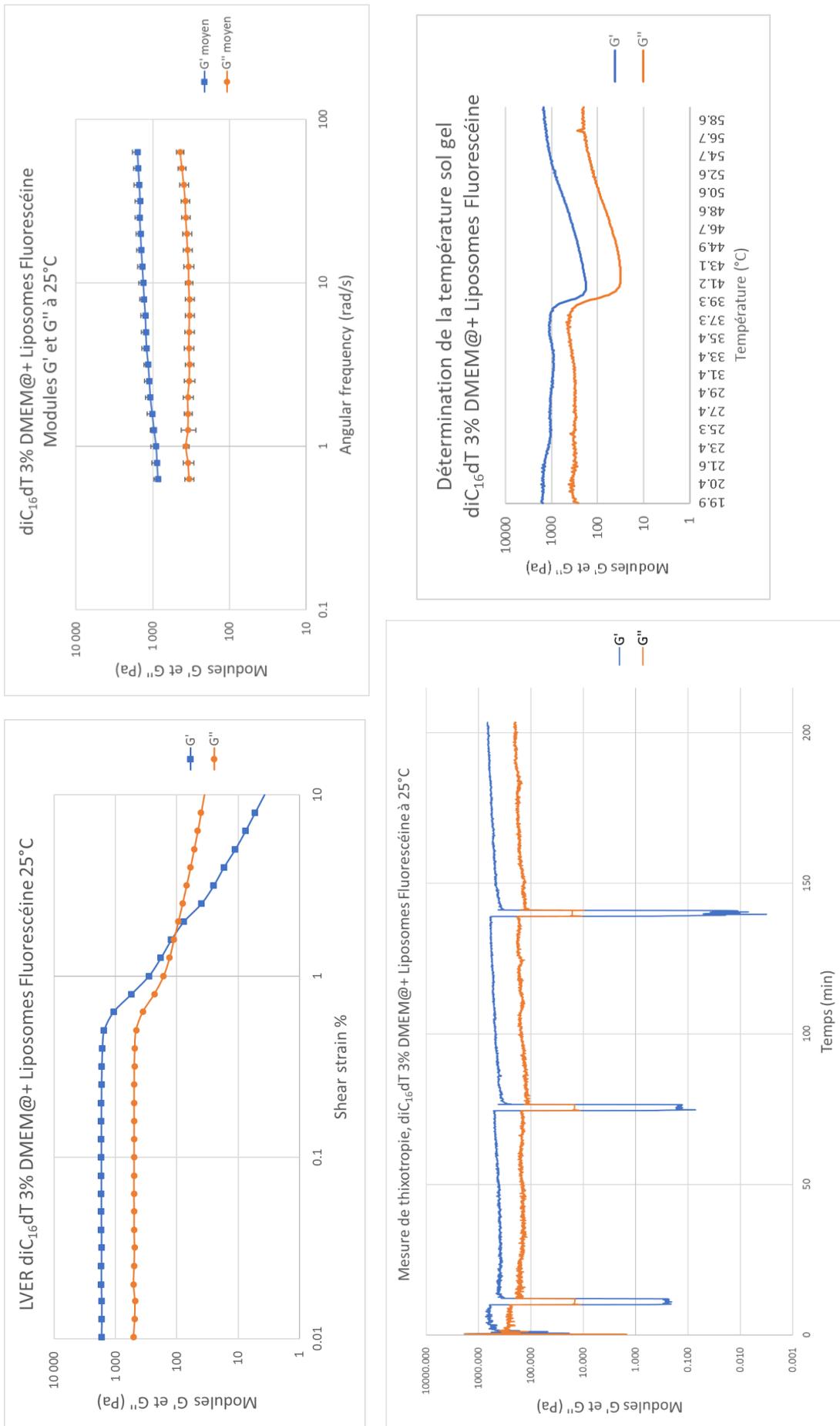


Figure Annexe 31: CR des encres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ chargées en liposomes de fluorescéine à 25°C

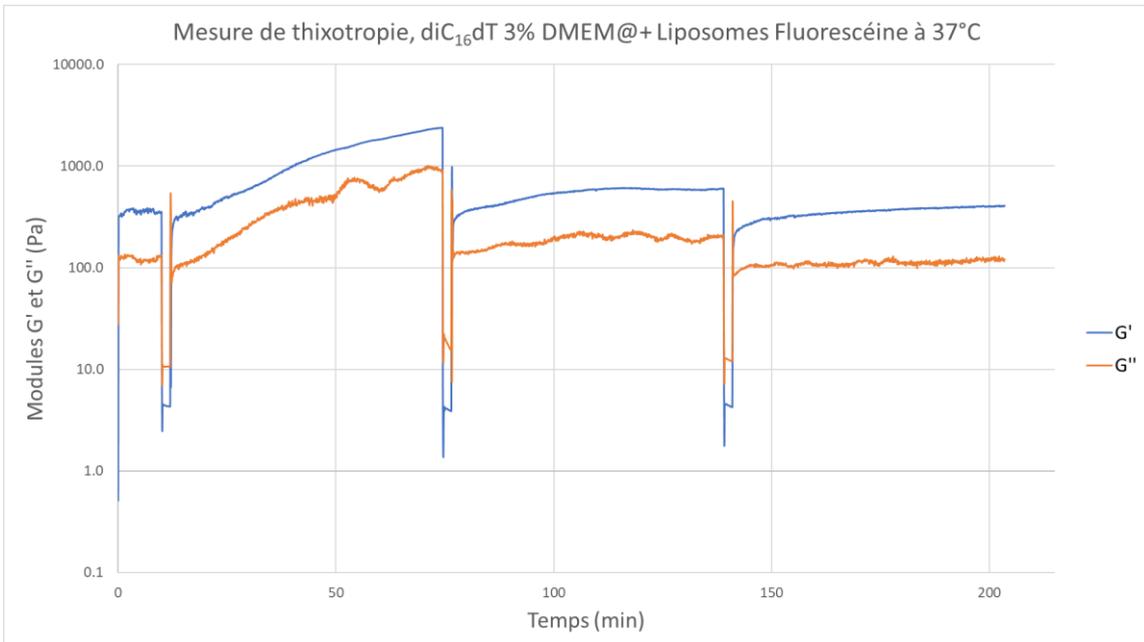
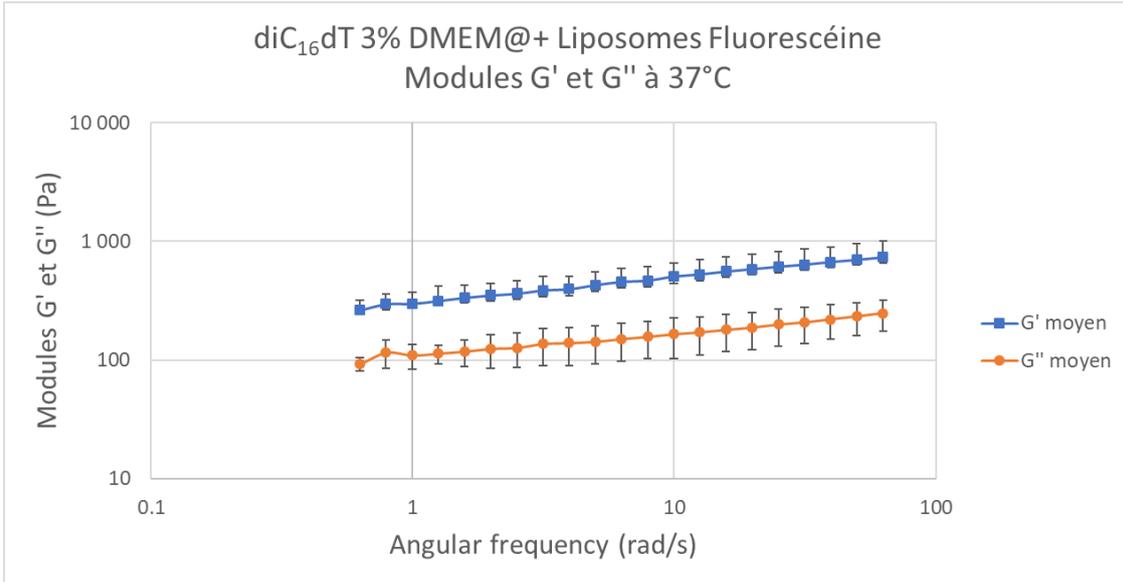


Figure Annexe 32: CR des encres de diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ chargées en liposomes de fluorescéine à 37°C

## II. Documents annexes

### **Document Annexe 1: Micro- and nano-formulations for bioprinting and additive manufacturing**

Keynote review publiée en 2018 dans le journal « Drug Discovery Today ».

*Drug Discovery Today* (**IF: 6.880**), 24 (1), **2019**, 163-178. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.10.013.

Pages 255-270

### **Document Annexe 2 : Nucleotide lipid-based hydrogel as a new biomaterial ink for biofabrication**

Article publié en 2020 dans le journal « Scientific Reports ».

*Scientific Reports* (**IF : 4,122**), **2020**, 10, 2850. DOI : 10.1038/s41598-020-59632-w.

Pages 271-287



*Teaser Incorporation of nano- and micro-objects in composite inks and bioinks enables improved bioprinting for regenerative medicine applications.*



# Micro- and nano-formulations for bioprinting and additive manufacturing

Reviews • KEYNOTE REVIEW

**Guillaume Bouguéon<sup>1,2</sup>, Tina Kauss<sup>1</sup>, Bérangère Dessane<sup>1,2</sup>, Philippe Barthélémy<sup>1</sup> and Sylvie Crauste-Manciet<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> University of Bordeaux, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, ARNA, ChemBioPharm, F-33000 Bordeaux, France

<sup>2</sup> University Hospital of Bordeaux (CHU de Bordeaux), F-33000 Bordeaux, France

Recent developments in bioprinting have enabled an optimized formulation of bioinks by incorporating pharmaceuticals into cell-containing gel matrices. The proof-of-printability of a variety of forms has been provided, such as particles and fibers in the nanometric or micrometric range like dendrimers or micelles, although this is still lacking for some (liposomes for example). Resulting composite bioinks have the advantage of (i) improving cell growth and differentiation, (ii) delivering active molecules or (iii) improving mechanical properties of bioinks, printed scaffolds or the printing process. Improvement of these properties brings bioprinting one step forward toward clinical applications. Applications are reviewed for each field of improvements.

## Introduction

Bioprinting has recently been redefined as the 'use of computer-aided transfer processes for patterning and assembly of living and non-living materials with a prescribed 2D or 3D organization to produce bioengineered structures serving in regenerative medicine, pharmacokinetics and basic cell biology studies' [1]. This strategy consists of printing living single cells or cell aggregates, biomaterials and bioactive molecules [2]. To do so, a printing material, an ink (generic term), is needed. The bioink is currently defined as a 'formulation of material(s) and biological molecules or cells processed using bioprinting technologies' [1]. Consequently, when the formulation does not contain the cells, the term ink is used strictly.

Additive manufacturing (i.e., 3D scaffold construction followed by cell seeding) is considered as bioprinting when inducing cell development into tissues [1,2]. Although being a particular case of 'bioprinting', according to the definitions here, additive manufacturing uses inks (and not bioinks) – cells being seeded afterwards. Alternatively to bioprinting, bioassembly (i.e., fabrication of hierarchical organized constructs from previously constructed building blocks) is the second major strategy for biofabrication of living and functional structures used in tissue engineering and regenerative medicine [1,2]. In line with the subject of this review, bioprinting, we focus here on bioprinted building blocks only. Recent developments have allowed regenera-

**Tina Kauss** is PharmD, PhD in pharmaceutical sciences. She has been Assistant Professor of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy in ARNA Laboratory, ChemBioPharm, INSERM U1212 UMR 5320 CNRS at Faculty of Pharmacy at Bordeaux University, France, since 2011. Her major research area is pharmaceutical development; specifically, formulation development and optimization, including reformulation of anti-infectious drugs for bioavailability enhancement, nanoformulations and formulation of hydrogel bioinks for 3D printing.



**Philippe Barthélemy** is a Professor at the University of Bordeaux, France. He received his PhD in chemistry from the University of Montpellier II, France, in 1993. He is leading the ChemBioPharm team of the INSERM U1212 (<http://chembiopharm.fr>). Over the course of his tenure, Barthélemy's research on bioinspired systems has yielded > 140 peer-reviewed publications, 20 patents and 110 invited conference presentations.



**Sylvie Crauste-Manciet** is PharmD, PhD, Professor of Pharmaceutical Technology in ARNA Laboratory, ChemBioPharm, INSERM U1212 UMR 5320 CNRS at Bordeaux University, France. She combines her academic position with a hospital pharmacy position where she is the Head of the Pharmaceutical Technology Department at University Hospital of Bordeaux, France. For many years, she has been developing smart nanovesicular systems (i.e., nanoemulsions) for therapy and/or for imaging. Her current axes of research on nanosystems are the design and characterisation of platforms for targeting and imaging atheroma plaque by MRI and MPI and formulation of bioinspired supramolecular hydrogels for 3D bioprinting.



Corresponding author: Kauss, T. ([tina.kauss@u-bordeaux.fr](mailto:tina.kauss@u-bordeaux.fr))

tive medicine to address the highly challenging issue of designing living and complex functional tissues and organs replacing previous inert prostheses [3].

Bioprinting is currently considered as a highly promising technique in a variety of applications of regenerative medicine, including bone and cartilage regeneration [4–8], skin substitutes [9], cardiac valve [10] and cardiovascular system repair [11], craniofacial reconstruction [12], management of severe spinal conditions [13], musculoskeletal applications [14], hand surgery [15], reconstructive surgery [16], otorhinolaryngology [17], dental applications [18] and imaging [19], but also in the domain of biosensors [20]. Different technologies of bioprinting (i.e., extrusion, particle-fusion-based methods, light-assisted methods and inkjet) were recently reviewed and it was highlighted that the design of bioink needs to be adjusted to each technology chosen [21].

The matrices serving to formulate cell-containing bioinks include polymers, hydrogels and composite gels, combining several technologies including micro- and nano-forms. Among them, hydrogels are of particular interest, providing a microenvironment that mimics the extracellular matrix (ECM) with the versatility of its mechanical properties, degradation and functionalization which could be printed along with cells. The shear-thinning properties allow injection, which is of translational interest [21]. Molecular design, synthesis, physicochemical properties and fine-tuning of supramolecular assemblies in relation to stem-cell behavior have recently been described [22,23]. The characteristics of a suitable bioink for scaffold printing should involve: sufficient mechanical strength and material degradation rate; modulation of a 3D cellular microenvironment; supporting cellular adhesion, proliferation and tissue formation; and enabling adequate nutrient and waste exchange for cells contained in the bioink [24]. Matrigel<sup>®</sup>, a protein hydrogel commonly used in non-printed regenerative medicine, presents poor mechanical properties and, unless modified, has not been considered as a good bioink candidate for tissue constructs [25]. To meet the requirements of a suitable bioink, nanoengineering has recently been introduced in the bioink design. Using nanoforms to functionalize the surface, deliver growth factors or drugs or increase the viability and differentiation of cells have been described for many fields of regenerative medicine [20,26,27]. Chimene *et al.* [28] recently reviewed new perspectives and strategies for 3D printing ink development such as multimaterial inks (to overcome the limitations of single-component hydrogels), interpenetrating networks (hydrogels in which each polymer network has limited interactions with the other) and nanocomposite bioinks (i.e., bioinks containing nano-objects). The major part of research work reviewed by Chimene *et al.* was not printed, however their interest for the applications in regenerative medicine was demonstrated.

The functionality and effective differentiation of stem cells depend not only on chemical signs and growth factors but also on biophysical signals. For this reason, the nanotopography has recently gained interest in regenerative medicine [29]. Approaches like electrospinning to produce nanofibers, soft lithography for specific outcomes like nanodots, nanoridges and grooves and nanotechnology providing nanoparticles, nanotubes, nanostructured hydrogels and other nanoforms have been shown to be effective for tissue engineering applications. Several mechano-transduction pathways, coupled with several growth factors that

mediated signaling pathways to regulate stem cell development, were proposed to explain the observed effects [29]. Additionally, pharmaceutical forms can be used in regenerative medicine for their common pharmaceutical purposes like delivery of active molecules, or for tissue engineering specific applications, related to tissue regeneration and functionality.

The progress in bioprinting and nanotechnology could render viable the approach of composite bioinks for the *in vivo* regeneration of tissues immediately after injury or during surgery [30]. These outlines raise the question regarding what the considered contributions and added values of composite bioinks containing pharmaceutical forms are that we address in this review. Here, we focus mainly on microforms and nanoforms included in inks or bioinks and printed. First, a general overview of major printed pharmaceutical forms for regenerative medicine applications is presented. Based on these data we propose to classify the applications according to the role that each pharmaceutical form has in a specific bioink for a specific application. Then, applications for each role are developed to highlight how the current challenges of bioprinting in regenerative medicine could be addressed by using pharmaceutical forms included in composite (bio)inks.

### Pharmaceutical forms used in composite inks

Nanomaterials commonly used in regenerative medicine include nanoparticles (magnetic, gold, silver, ceramic, polymeric), liposomes, carbon nanotubes, micelles, dendrimers and quantum dots [30]. Microparticles and microfibers can also be used [31]. However, a persisting challenge is to include these pharmaceutical forms into composite inks and successfully print them. Significant changes in mechanical properties including stiffness, shear-thinning and different kinetics of degradation could be observed for nanoengineered hydrogels compared with single-component inks. An important parameter to check is therefore the impact of the nano- or micro-formulation inclusion on printability and on printing parameters of the composite ink [28] – but this is not systematically the case in the literature.

An overview of successfully printed pharmaceutical forms is given in Table 1. A distinction is made when additive manufacturing, as a particular case of bioprinting, was used. Among the most common printed forms, various nanoparticles and microparticles can be cited with a major application in bone or osteochondral tissue engineering. Additionally, fibers of various sizes (micrometer on nanometer range) but also micelles, dendrimers and nanotubes have performed their proof-of-printability. Brief definitions, details of applications and references of these forms are given in Table 1. However, in the literature related to the regenerative medicine and tissue engineering, liposomes [32–35], niosomes [36] and magnetoliposomes [37] have been shown to be of great potential. To the best of our knowledge, these forms have not been printed yet but would be of interest for bioprinting providing their proof-of-printability. A graphical illustration of printed and potentially printable forms, matrices and supports is presented in Fig. 1.

When comparing the contribution (i.e., the added value that inclusion of nanoforms and microforms brings to the ink used) some common features can be driven out, summarizing the main roles of composite inks compared with simple inks and the challenges that could be addressed using composite inks. Here, we

**TABLE 1**  
**Summary of major pharmaceuticals added to composite inks and bioinks for additive manufacturing and bioprinting applications**

Definition of pharmaceutical forms and subtypes	Application scope	Details on the form	Contribution	Biofabrication technique	Refs
<i>Additive manufacturing</i>					
<b>Nanoparticles</b> Nanomeric range objects made from various organic or inorganic, natural or synthetic materials; e.g., bioceramics, magnetic particles, nanotubes, polymeric nanoparticles	Bone tissue engineering	Biphase calcium phosphate containing hydroxyapatite or tricalcium phosphate	Cell proliferation and viability	3D printing	[39]
<b>Bioceramics</b> Biocompatible ceramic nanoparticles (commonly nanospheres) with inert or resorbable material, similar to biological hydroxyapatite, commonly used in bone regeneration		Poly(lactic-co-glycolic acid) solution post treatment of the ceramic scaffold	Enhanced mechanical properties		
		TiO <sub>2</sub> and bioactive glass nanoparticles	Induction of a lag time in cell adhesion, proliferation and differentiation	3D printing	[41]
		Mesoporous bioactive glass and mesoporous silica nanoparticles	Local drug delivery	Extrusion printing	[79]
		Nanoclays incorporated into N-acryloyl glycinamide hydrogel	Improved mechanical properties of printed scaffolds and further increased adhesion, proliferation and cell differentiation	Extrusion printing	[44]
		Mesoporous silica nanoparticles incorporated in a polyglycidol and hyaluronic acid hydrogel	Drug release	Extrusion printing	[81]
		Collagen-nanosilicate-based hydrogels	Improved hydrogel shear-thinning mechanical properties. Promoted osteoblast differentiation and induction of production of mineralized extracellular matrix	Fused deposition modelling	[45]
<b>Nanofibers</b> Nanometer range fibers made of natural or synthetic polymer chains, produced by various methods including electrospinning	Cartilage and bone tissue engineering	Polycaprolactone nanofibers	Improved cell viability	Electrospinning and inkjet	[8]
	Bone tissue engineering	Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofibers	Improved cell adhesion and mechanical stability of the scaffold	Electrospinning and fused deposition modelling	[48]
	Musculoskeletal tissue engineering	Polystyrene submicron fibres coated with fibroblast growth factor	Growth factor local delivery	Inkjet printing	[31]
<i>Bioprinting</i>					

**TABLE 1 (Continued)**  
**Definition of pharmaceutical forms and subtypes**

Definition of pharmaceutical forms and subtypes	Application scope	Details on the form	Contribution	Biofabrication technique	Refs
<b>Nanoparticles</b> Nanomeric range objects made from various organic or inorganic, natural or synthetic materials; e.g., bioceramics, magnetic particles, nanotubes, polymeric nanoparticles	Bone tissue engineering	Bioactive glass and hydroxyapatite nanoparticles	Increased strength, making extracellular matrix deposition easier and upregulating bone-related gene expression	Ink jet printing	[46]
<b>Bioceramics</b> Biocompatible ceramic nanoparticles (commonly nanospheres) with inert or resorbable material, similar to biological hydroxyapatite, commonly used in bone regeneration		Hydroxyapatite nanoparticles and $\beta$ -tricalcium phosphate microparticles	Induction of osteoclast activation	Extrusion printing	[40]
		Magnesium synthetic nanosilicate clays (Laponite) incorporated to an alginate and methylcellulose bioink	Drug delivery and improvement of mechanical properties (colloidal ligand)	Extrusion printing	[43]
		Core-shell PLGA nanospheres incorporating transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1)	Local drug delivery	Stereolithography and electrospaying	[72]
<b>Magnetic nanoparticles</b> Particles made of material expressing magnetic properties (e.g., Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Shape construction in uterine and vascular tissue engineering	Magnetized cells with magnetic nanoparticle assembly (i.e., NanoShuttle)	Scaffold architecture and cell placement to form a required shape	Extrusion printing	[57,58]
<b>Nanotubes</b> Mono- or multi-layer nanometric hollow tubes formed by carbon atom assembly	Cardiac surgery medical device engineering (patch)	Carboxyl functionalized carbon nanotubes (CNTs) incorporated in an alginate and methacrylated collagen hydrogel	Reinforce the 3D printed structure and improve its electrical conductivity	Extrusion printing	[51]
<b>Microfibers</b> Micrometric range fibers made of natural or synthetic polymer chains connected via covalent bonds produced by various methods including electrospinning	Bone tissue engineering	Bone morphogenetic protein 2 bound on collagen microfibers	Growth factor delivery	Extrusion printing	[75]
<b>Microparticles</b> Micrometric range object from various form and wide variety of materials (e.g., polymeric microcapsules, microcarriers, microspheres)	Proof of concept (no specific application defined)	Poly-L-lysine and chitosan microcapsules	Enhanced cell-cell contact, cellular proliferation and aggregation. 3D controlled constructs bead-by-bead	Laser-assisted bioprinting	[63]
<b>Polymeric microspheres</b> Matrix microparticles composed by a polymeric network	Bone tissue engineering	Gelatin microspheres loaded with bone morphogenetic protein 2	Growth factor release	Extrusion printing	[69]
	Vessel engineering	Vascular endothelial growth factor loaded gelatine microspheres	Prolonged release of growth factor in vitro and in vivo	Extrusion printing	[70]
	Osteochondral tissue engineering	Mesenchymal-stromal-cell-laden poly(lactic acid) microcarriers, encapsulated in a gelatin methacrylamide-gellan gum bioink	Improved compressive modulus of the bioink and hydrogel constructs, facilitated cell adhesion, support osteogenic differentiation and bone matrix deposition by MSC	Extrusion printing	[62]
	Scaffold engineering	DNA-coated carboxylate microspheres	Gel shape maintenance, improved scaffold sturdiness, viability and cell growth	Extrusion printing	[101]

classify these issues into three main fields of added value for the contribution of pharmaceutical forms to printed constructs: (i) cell functions and cell fate, (ii) delivery of bioactive molecules and (iii) improvement of mechanical ink properties, printing process or printed scaffolds. Inclusion of micro-objects or nano-objects into composite inks for the printing process allows one to address several challenges (Box 1). Each contribution is further illustrated by representative applications in the following sections.

### Improving cell functions and fate

The contribution of nanoforms to cell function and fate includes the cell survival and growth, but also their differentiation to fully assume all the functions necessary to replace the injured tissue. The aim of regenerative medicine is to be a functional and long-term viable replacement and not a mechanical prosthesis. In addition, encapsulation of cells allows them to get better contact between them on the one hand and to use cell-containing capsules as building blocks for tissue construction on the other hand. The first point joins the idea of cell viability, growth and differentiation enhancement, whereas the second point allows the structural precision of scaffolds.

#### Cell viability, growth and differentiation enhancement

To fulfil the renewal of injured tissues and provide a viable and functional tissue substitute, cells need not only to survive but also to differentiate properly. Micro- and nano-engineered composite inks and bioinks have been developed to enhance cell viability, differentiation and, hence, the functionality of the new tissue. Some illustrations of these applications are given in Fig. 2. Several studies concerned engineered scaffolds for bone regeneration and the input of nanoparticles and microparticles, in particular bioceramics, on cell growth and differentiation. Bioceramic scaffolds

#### BOX 1

### Contribution of printed pharmaceutical forms in regenerative medicine

#### Cell functions and fate

- ✓ Cell viability enhancement, growth and differentiation promotion
- ✓ Cell encapsulation

#### Delivery of bioactive molecules

- ✓ Growth factors
- ✓ Drugs
- ✓ Genetic material

#### Improvement of mechanical properties of

- ✓ (Bio)inks for printing process optimization
- ✓ Scaffolds for optimal scaffold design

are commonly printed without cells, which are added by seeding afterwards using an additive manufacturing strategy. Hence, they are not considered as bioinks but still comply with the definition of bioprinting [1,2,38]. The chemical structure of bioceramic nanoparticles is naturally of importance, but nanotopography can also have a major impact on cell fate.

Porous bioceramic printed scaffolds have been shown to be biocompatible with good cell proliferation and cell ingrowth [4]. In particular, calcium phosphate bioceramics are widely used in bone tissue engineering owing to their excellent bioactivity, osteoconductivity and similarities in composition to bone [5]. Comparing different calcium phosphate derivatives, the bone remodeling potential of 3D printed biphasic calcium phosphate (BCP) microparticles showed an enhanced cytocompatibility, cell adherence, cell viability and cell proliferation seeded on these scaffolds. BCPs were found to be more effective in inducing elaborate bone formation at the ectopic location compared with calcium triphosphate or hydroxyapatite scaffolds [39,40].

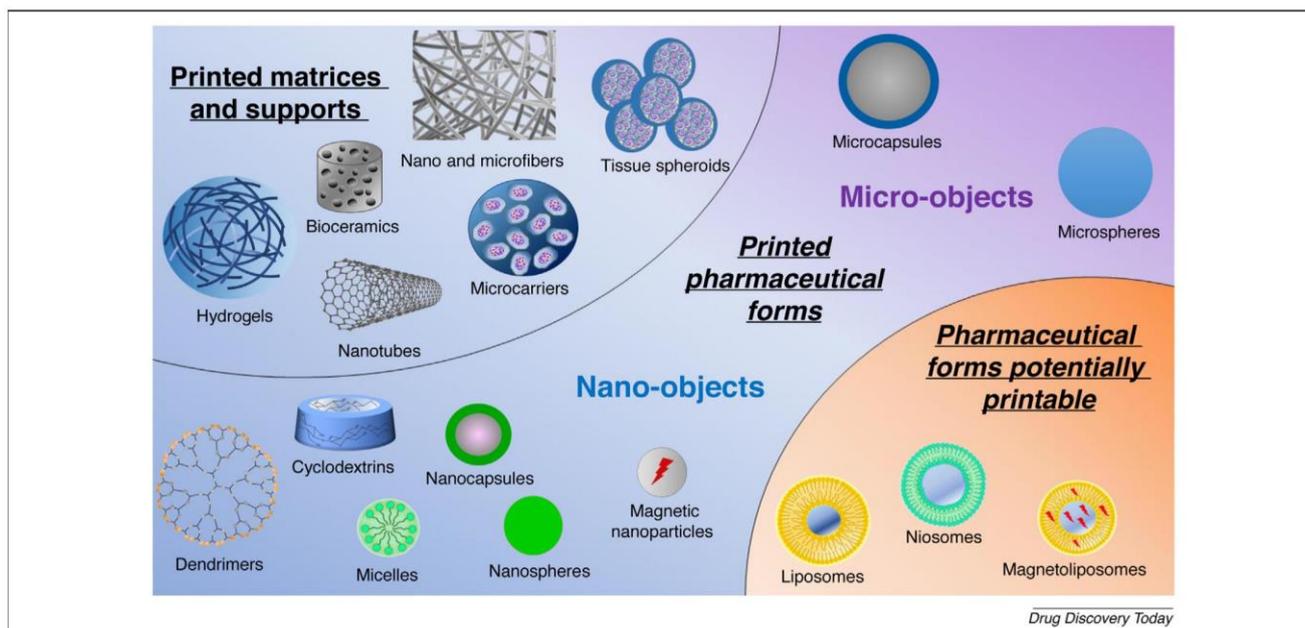


FIGURE 1

Printed and potentially printable pharmaceutical forms, matrices and supports in regenerative medicine.

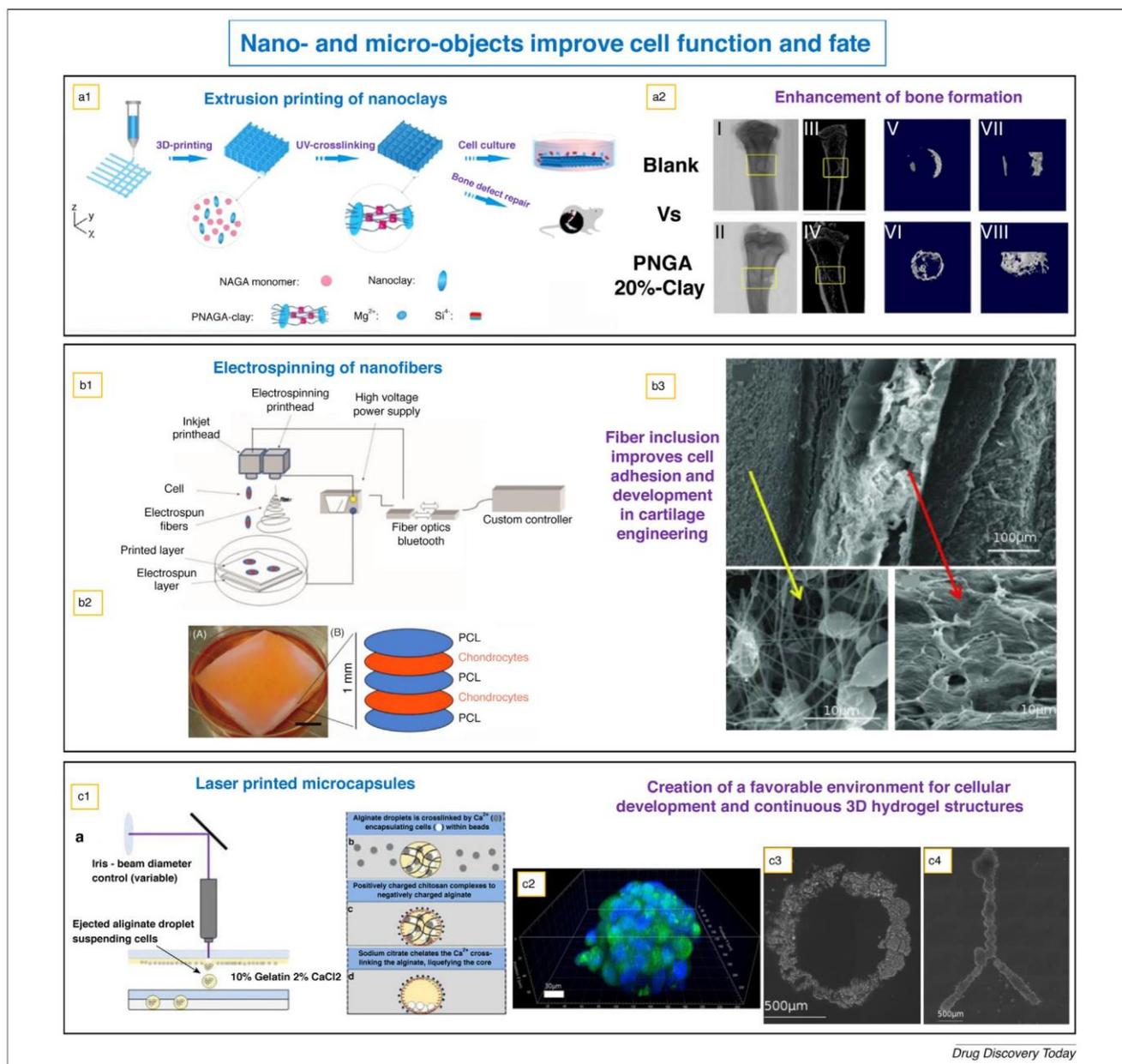


FIGURE 2

Contribution of nano-objects incorporated in inks and bioinks for cell function and fate improvement in printed constructs. **(a1)** Procedure of 3D-printing poly (*N*-acryloyl glycinamide (PNAGA-Clay) scaffold incorporating nanoclays. **(a2)** Nanoclays of enhanced new bone formation implanted in rat tibia (yellow area): **(a2 I–IV)** micro-computed tomography (sagittal cut), and **(a2 V–VIII)** reconstructed 3D images (V and VI: top view; VII and VIII: side view) [44]. **(b1)** Schematic representation of the hybrid printing system: the electrospinning printhead (generating a polymeric fiber-based scaffold) is coupled to an inkjet printhead. **(b2)** Successively, a layer of polycaprolactone (PCL) fibers is electrospun and followed by the printing of a chondrocytes plus fibrinogen and collagen hydrogel solution. **(b3)** Microstructural analysis of the printed hybrid constructs using scanning electron microscopy: PCL porous microstructures promote cellular infiltration and integration within the 3D-printed structure; above (cross-section of the 3D-printed constructs: PCL layer (yellow arrow, beneath left) is followed by a chondrocyte plus collagen layer (red arrow, beneath right) [8]. **(c1)** Schematic representation of the 3D-laser-printed microbead formation. Microbeads fabricated by a single laser pulse that volatilizes a sacrificial layer (thin film of 10% gelatin plus 2% alginate), ejecting a droplet of transfer material (cells suspended in 2% alginate) to a receiving substrate; formation of capsules by alginate crosslinking, addition of chitosan, sodium citrate core liquefaction. **(c2)** Representation of cell-loaded microcapsule after 7 days of development (confocal imaging), illustrating the formation of a 3D cellular aggregate within the chitosan shell. The structures formed [**(c3)** circular and **(c4)** bifurcated strand] present continuous cell growth and differentiation within the structure after 10 days in culture [63].

Beside chemical derivatives of bioceramics, the available surface and its nanotopography is another important issue for cell fate. The uniform cell growth in porous scaffolds was shown to be curvature-dependent for nonsoluble ceramic particles and material-dependent for soluble fillers like bioactive glass nanoparticles [41]. When the surface of the 3D-printed polycaprolactone scaffolds was decorated with TiO<sub>2</sub> and bioactive glass nanoparticles to mimic ECM nanoarchitecture, a lag time in cell differentiation was induced [41]. Scaffolds doped with SrO and MgO induced faster tissue regeneration, leading to a fully mineralized bone after 12 weeks, in contrast to non-doped scaffolds [42].

Combining nanoparticles with synthetic or natural hydrogels has been further considered. Alginate- and methylcellulose-bioink-containing synthetic layered silicates (Laponite<sup>®</sup>) allowed >70% cell viability 21 days after extrusion [43]. Recently, it was shown that incorporating nanoclays (i.e., nanoparticles of layered mineral silicates) into gels from acrylate derivatives (*N*-acryloyl glycinamide hydrogel) significantly improved cell adhesion, proliferation and differentiation of primary rat osteoblasts when used for bone regeneration (Fig. 2a) [44], induced production of mineralized ECM [45] and upregulated bone-related gene expression [46].

Scaffolds containing nanofibers and microfibers based on natural polymers (e.g., collagen, gelatin, chitosan, fibrin and hyaluronic acid) or synthetic polymers [e.g., poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly(urethane) (PU)] as the raw material could be designed [47]. The nanofiber-like physiological structure of bone and cartilage tissue makes these nanostructures of particular interest in bone and cartilage tissue engineering and they have been shown to efficiently enhance mesenchymal stem cell and chondrocyte proliferation, differentiation and infiltration in nanofibrous scaffolds, as recently reviewed [26]. The interest of fiber inclusion into viable 3D-printed constructs was further shown for cartilage regeneration of rabbit elastic chondrocytes (Fig. 2b) in a fibrin–collagen hydrogel *in vitro* and *in vivo* [8]. When bioengineered PCL scaffolds were further covered with PLGA electrospun fibers, mesenchymal stem cells seeded using an additive manufacturing approach were able to differentiate into osteogenic and chondrogenic lineages and showed greater cell adhesion compared with noncoated scaffolds [48]. Thus, several micro- and nano-forms (e.g., particles, fibers, nanotubes) have shown their uses for cell growth and differentiation by offering an appropriate nanosurface.

Current biomedical applications of carbon nanotubes include their role as a support for cell adherence, differentiation and proliferation in bone, cartilage and neural tissue engineering. Enhanced neuronal impulse conduction, neural network formation and neurite outgrowth on carbon nanotube and graphene substrates and enhanced osteogenesis or chondrogenic differentiation have recently been shown [29,49,50]. In addition, titania nanotubes used as a surface modification strategy in dental non-printed applications have gained in interest because they can promote bone cell functions, mainly in relation with their increased surface roughness or energy, incorporation of fluoride ions from the anodization electrolyte and ability to mechanically stimulate cells [18]. Further loading of nanotubes could add a local therapeutic action or enhanced modulation of various cellular functions and, hence, faster integration of dental implants in

the bone and soft tissues. Combining titania nanotubes with 3D-printing technology could achieve the desired dual micro- and nano-structured surface of future implants for early osseointegration and soft tissue sealing [18]. Recently, carboxyl-functionalized carbon nanotubes were successfully printed within hybrid cardiac patches for myocardial tissue engineering [51]. Indeed, incorporated to an alginate framework and cell-laden methacrylate hydrogel, these nanotubes improved the bioink stiffness, reinforced 3D-printed constructs and, moreover, facilitated electrical conductivity of the implant.

Besides bioceramic nanoparticles, fibers or nanotubes, bone regeneration was also addressed using magnetic nanoparticles. Magnetic bioprinting, despite potential toxicity of magnetic particles for cell behavior, has been considered to enhance cell differentiation [52]. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles and exposure to electromagnetic fields were used to induce human bone marrow stem cell differentiation [53]. Furthermore, superparamagnetic particles were shown to promote the proliferation of human mesenchymal stem cells by quenching H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [54]. In addition, inclusion of iron oxide nanoparticles covalently conjugated to glial-derived neurotrophic factor (GDNF) enhanced the stability and bioactivity of the hydrogel, as it significantly increased neurite outgrowth from dorsal root ganglia [55]. However, in these examples of applications, nanoparticles were not bioprinted.

However, printed magnetic nanoparticles have also been used for spatial patterning of bioprinted scaffolds. Spatial patterning enables formation of cell assemblies for tissue development (i.e., blood vessels, skeletal muscle or bone tissue) by using magnetic properties of nanoparticles incorporated in the cells to induce a levitation under the action of a magnetic field and design desired patterns. It has been shown to play an important part in stem cell fate through influencing juxtacrine and paracrine cellular signaling, and directing early differentiation by modifying the cell microenvironment and cell communication [56]. For example, cells could be magnetized with nanoshuttle particles (nanoparticle assembly consisting of gold, iron oxide and poly-L-lysine) subjected to levitation, which induced ECM production of cell aggregates. A design of uterin and vascular smooth muscle segments, made of cells bioprinted in 3D hollow rings to study their contractility properties, was achieved using magnetic bioprinting [57,58]. Magnetic nanoparticles also permitted the ring-shaped homogeneous distribution of cells on a polysaccharide porous scaffold for biomimetic vascular graft design [59] and further allowed post-transplantation tracking of cells [60].

To limit the adverse effects and cytotoxicity related to magnetic nanoparticle degradation, magnetoliposomes (i.e., liposomes containing magnetic particles) have been employed [37]. Beside the conventional properties granted to liposomes (e.g., configuration facilitating incorporation in cellular membranes, the possibility to graft PEG to increase encapsulation efficiency, their biocompatibility and biodegradable properties) magnetoliposomes highlight some shield properties by limiting magnetic particle degradation by lysosomes (i.e., phospholipases) and reducing aggregation [37]. Not yet printed, magnetoliposomes could easily find their place among inks and bioinks for applications in regenerative medicine to limit adverse effects of magnetic particles.

An alternative way to differentiate promoting composite inks has been described using cyclodextrins. Singh *et al.* [61] worked on

hydrogel formed by  $\alpha$ -cyclodextrin ( $\alpha$ -CD) nanobeads threaded on PEG chains. They demonstrated that  $\alpha$ -CD PEG hydrogel led to chondrogenic differentiation and increased cartilage matrix production of mesenchymal stroma cells (MSCs). According to chemical substitution of  $\alpha$ -CD hydroxyl function, different cell types (i. e., adipogenic or osteogenic) were observed, thus demonstrating that the chemical environment modulation influenced the tissue development [61]. In view of all these results, most of them concern inclusion of nanoparticles, mainly bioceramics, into scaffolds for bone regeneration. Beyond this application, fibers and tubes offer an appropriate support for cell growth and differentiation. The applications of magnetic particles cited are rather specific and difficult to generalize for cell fate improvement.

#### Cell encapsulation as tissue engineering building blocks

An alternative strategy to bioprinting is bioassembly, which consists of using building blocks (microcarriers or tissue spheroids) to address the challenges in fabricating functional grafts of clinically relevant size [1]. Microcarriers (MCs) are 40–600  $\mu$ m polymeric microspheres that permit adhesion and growth of cells by offering an appropriate surface for cell development and facilitating cell–cell contact for optimal differentiation. They could be used as such by a bioassembly strategy, or combined for bioprinting [62]. For instance, MCs included in gelatin methacrylamide-gellan gum bioinks and bioprinted enabled high MSC concentrations and high viability by facilitating cell adhesion and supporting osteogenic differentiation of cells [62]. Alternatively, bioprinted microbeads can be further coated to form microcapsules. Kingsley *et al.* [63] encapsulated cells containing beads using a laser-direct writing process, offering the interior shell surface of the capsule for optimal cell development (Fig. 2c). Encapsulating several cell types such as fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells could enable the creation of blood vessel structures with functional lumens [63].

The exact mechanism-of-interaction of cells with carriers is still not completely elucidated; MCs induce cell shape change and consequent pathways via RhoA modulation for mesenchymal stem cells or E-cadherin modulation for pluripotent stem cells [64]. Furthermore, MCs can play an important part in stem cell differentiation while being loaded with bioactive molecules and releasable factors [i.e., collagen-coated MCs; polylactic acid MCs; fibronectin-coated PLGA MCs releasing transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 3] [65].

To further scale-up the size of constructs, tissue spheroids have been considered and reviewed as an alternative to bioprinting of sheets or rods and layer-by-layer assembly for tissue reconstruction [66]. They could be produced by a diversity of methods including hanging-drop culture or microwell culture microfluidic techniques (e.g., rotary culture, spinner culture, nonadhesive surfaces) [66] or printing cell-laden droplets into a crosslinking solution [56]. The key idea is to use hydrogel microbeads as volume pixels, or ‘voxels’, for cell capsulation and further structuring them into more complex constructs like microstrands and bifurcations [56]. These spheroidal microcapsules ensured cell–cell interaction, differentiation and 3D cell growth [56], such as that described for microcarriers.

Taken together, using building blocks has been shown to be efficient for cell fate improvement even if all mechanistic details

are not yet completely elucidated. Microcarriers and tissue spheroids can be used alternatively to improve cell interaction and outcome. In the cited applications, these building blocks were bioprinted. Independently from the production method, spheroids can further be used as a bioink for tissue bioprinting, providing flowability, nozzle-compatible size and sufficient physical integrity of spheroids. The tissue fusion process would then be crucial for 3D tissue construction and viability [66].

#### Delivery of bioactive molecules

As commonly used in the pharmaceutical field, micro- and nanoforms could deliver active compounds, like drugs. Genes or nucleic acids could be another type of delivered active biomolecule. In the field of regenerative medicine, growth factors need to be delivered as well and the advantage of controlled or site-specific delivery is interesting for optimal tissue regeneration. Spatially and temporally controlled delivery is of key importance for efficient cell differentiation and function. Some examples of composite inks delivering active molecules are illustrated in Fig. 3.

#### Growth factor delivery

Controlled and prolonged release of growth factors is one of the key challenges for optimal cell growth and differentiation. The delivery systems need to comply with general requirements like biocompatibility, predictable biodegradability, low immunogenicity and antigenicity, affinity with growth factor and tissue, maintenance or enhancement of growth factor activity, ease of manufacture, safety, stability, sterility, availability and cost-effectiveness, as well as approval by regulatory agencies [67]. Commonly, collagen, alginate, chitosan, hyaluronic acid, hydroxyapatite and some synthetic biodegradable polymers or composite materials for bone grafts can be used as delivery systems by direct inclusion of factors into matrices [67], but this approach does not provide the optimal control and prolonged efficient local concentrations of growth factors.

To further optimize controlled and prolonged release, pharmaceutical drug release systems have been tested for growth factor delivery. Growth-factor-loaded nanoparticles have been considered for stem cell engineering, delivering growth and differentiation factors for bone and cartilage regeneration, adhesion molecules, extracellular matrices, tight junction proteins and signaling molecules for vascular tissue engineering [26,68]. Alternatively, tissue growth agents were also incorporated in the polymeric nanofibers for wound dressing [26,68]. These applications have not been bioprinted but, from these developments, the application of microparticles and nanoparticles loaded with growth factors was extended to bioprinted matrices and applied to various tissues. For example, bone morphogenetic protein (BMP)-2 loaded in gelatin microparticles and formulated in alginate bioink containing goat multipotent stromal cells allowed continuous 3-week BMP-2 release, enabling significant osteogenic differentiation and bone formation in rats and mice [69]. Site-specific bioprinting of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded microspheres allowed regional differences in vasculogenesis of scaffolds dependent on VEGF release *in vivo* [70].

Bioprinting was further used for multi-cell-type printed constructs to specifically control growth factor release, which was

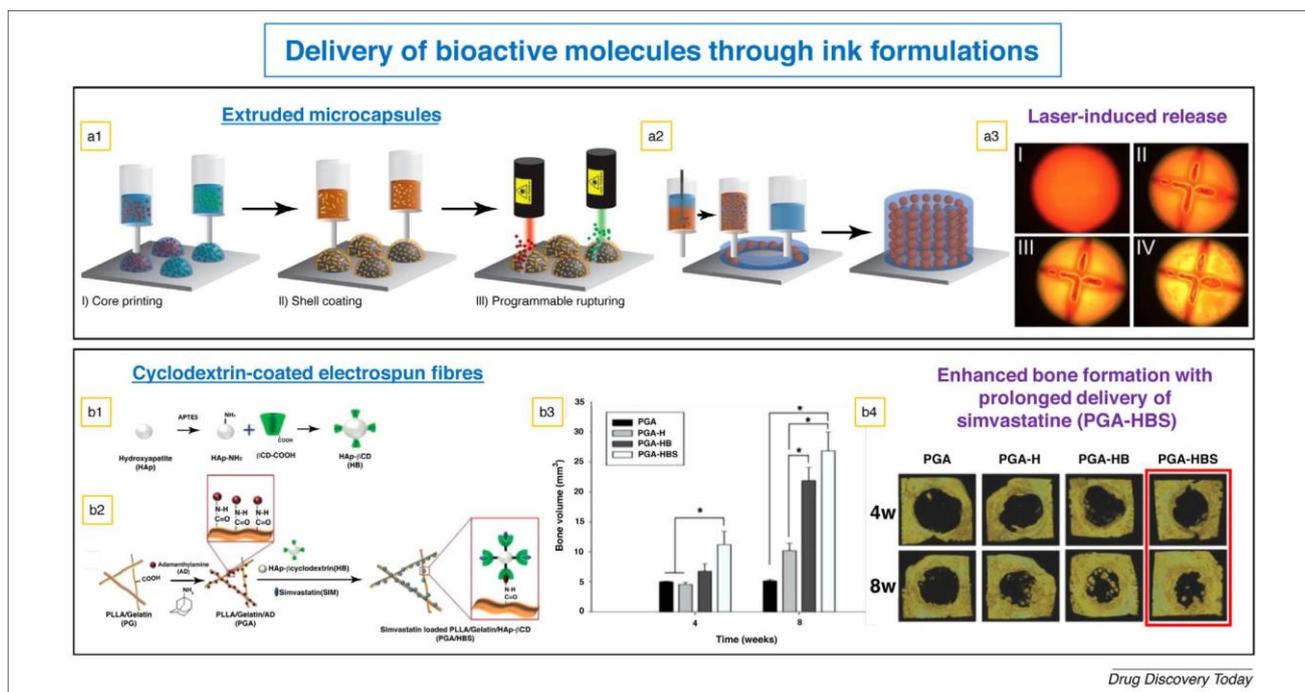


FIGURE 3

Delivery of bioactive molecules and drugs through formulations of composite inks and bioinks. **(a1)** Schematic representation of programmable printing and rupturing of capsules: (I) aqueous printing core containing payloads; (II) coating with PLGA solution containing AuNRs (nanorods); (III) capsule-selective rupturing adapted to the absorption wavelength of the nanorods. **(a2)** Schematic illustration of layer by layer 3D construct of complex capsule arrays, using emulsion ink in hydrogel. **(a3)** Rupture and kinetic release (from 15 min (II) to 2 h (IV)) of fluorescein dye from an emulsion capsule [82]. **(b1)** Synthesis of  $\beta$ -cyclodextrin-grafted hydroxyapatite. **(b2)** Preparation of simvastatin-coated poly(L-lactic acid) (PLLA) and gelatin fibrous scaffold. Adamantylamine plays the part of linker between PLLA plus gelatin fibers and simvastatin-loaded hydroxyapatite. **(b3)** Recovered rabbit calvarial bone area implanted with PGA, PGA-H, PGA-HB and PGA-HBS in the defect site. **(b4)** Microcomputerized tomography scan images of rabbit calvarial after scaffold 4 and 8 weeks of implantation [90]. Abbreviations: PGA, PLLA plus gelatin plus adamantylamine; PGA-H, hydroxyapatite-coated PGA; PGA-HB,  $\beta$ -cyclodextrin-coated PGA-H; PGA-HBS, simvastatin-coated PGA-HB.

adjusted locally to each cell type. A biomimetic 3D nanocomposite scaffold for osteochondral regeneration containing growth factors for chondrogenic and osteogenic differentiation (TGF- $\beta$ 1 and BMP-2, respectively) was designed. The bone layer and cartilage layer were functionalized with nanospheres for efficient growth factor encapsulation and sustained delivery. Significantly improved stem cell adhesion and differentiation in bone and cartilage layers was obtained simultaneously [71]. A similar approach was adopted using the sustained release properties of core-shell nanospheres to deliver TGF- $\beta$ 1 to human bone marrow MSCs within a bioprinted cartilage construct [72]. Nanospheres properly distributed in the cartilage construct permitted a TGF- $\beta$ 1-progressive delivery along the 21 days of the study, which improved chondrogenic differentiation of encapsulated MSCs.

Local delivery of biomolecules, including growth factors, has also been shown to be feasible on printed ceramic matrices [73,74] or using magnetic particles bound to growth factors that could be of interest for delivering growth factors at a precise time (controlled release) and at a specific place using external magnetic stimulation [52]. Beside particles, fibers have also been shown to be effective in controlled growth factor release. Bioprinted BMP-2-bound collagen microfibrils enabled bone mesenchymal stem cell differentiation into osteocytes more efficiently compared with

microfibrils without growth factor [75]. Additionally, a spatially controlled specific cell differentiation has been achieved by functionalizing oriented submicron fibers with different printed growth factors [76], leading to myocyte, tenocyte and osteoblast differentiation where no growth factor, fibroblast growth factor (FGF)-2 or BMP-2 were locally printed, respectively [76].

Niosomes could also be used for efficient and sustained growth factor delivery but, to the best of our knowledge, have not been bioprinted yet. Indeed, in a recent study, Moghassemi *et al.* [36] reported the formulation and evaluation of basic fibroblast growth factor (bFGF)- and BSA-loaded nano-niosome-hydrogel allowing sustained growth factor release to modulate human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) behavior. Although not printed in this application, this strategy could be used in printed and bioprinted scaffolds to locally release bioactive agents over time. In view of these results, several formulation approaches, including particles, fibers and vesicles, have been shown to be efficient for growth factor delivery. However, attention should be paid because some data tend to demonstrate that bioprinting could affect biological activity of loaded growth factors. For example, when printed in bioceramic matrices using ink jet technology, biological activity of recombinant BMP-2 was decreased by 10% compared with the non-printed control solution [77].

### Drug and gene delivery

Using antibiotics and anti-inflammatory substances in regenerative medicine is a common clinical approach to reduce infections and inflammatory reactions. Including these drugs in scaffolds allows spatially and temporally controlled drug release by incorporating drugs into nanoparticles or fibers. Nanostructured materials including polymeric micelles, polymeric vesicles, nanogels, nanoparticles, nanocapsules and dendrimers were reviewed [26] for their biomedical (non-printed) applications and, more specifically, for tissue engineering and regenerative medicine. In general, the solid, hollow or porous nanoparticles are suitable for bone and cartilage applications. Several synthetic and natural polymers, including PLA, PCL, PLGA, polyurethane, polyvinyl alcohol, dextran, chitin, chitosan, cellulose acetate, gelatin and collagen, were considered as candidates for dressing materials [26]. Recently, an additional step forward was done by incorporating some drug-loaded particles and fibers into composite bioinks and printing them along with biomaterials and cells.

Antibiotic-loaded ceramic particles were considered for the treatment of several infectious bone diseases including osteoarticular tuberculosis [78,79] and osteomyelitis [7]. Mesoporous bioactive glass was used as a drug delivery system and co-printed with isoniazid and rifampicin for bone tuberculosis treatment after surgery. Local drug release and good osteogenic potential in a rabbit bone defect model demonstrated the interest of this approach for treating osteoarticular tuberculosis [78]. The same approach was found successful using mesoporous silica nanoparticles as a composite scaffold loaded with isoniazid and rifampicin [79]. Analogously, calcium phosphate scaffolds were loaded by adding powder antibiotics to bioceramics before printing, or by infusing an antibiotic solution into the scaffolds via a second set of inkjets – vancomycin- and rifampicin-laden and co-printed for osteomyelitis treatment after surgery [7]. Further studies of vancomycin, ofloxacin and tetracycline sorption and release, loaded onto 3D-powder-printed microporous bioceramics (hydroxyapatite, brushite and monetite), showed delayed antibiotic-dependent drug release. Additional polymer impregnation of the drug-loaded matrix with polylactide-polyglycolide (50:50) polymer solutions further sustained the antibiotic drug release [80]. However, this approach was unsuccessful for poly(methyl methacrylate), which could not be co-printed with vancomycin or rifampicin because of interference with polymerization [7]. Moreover, as demonstrated for mesoporous silica nanoparticles incorporated into polyglycidol and hyaluronic acid 3D-printed hydrogel, surface particle charges should be taken into account for appropriate drug release within 3D-printed scaffolds and integration by cells [81].

Beside particles, fibers could be loaded with drugs for local and controlled delivery in printed scaffolds. A recent review [47] summarized fabrication methods of drug-loaded fiber-based composite scaffolds and their application in tissue regeneration. In a general manner, microfibers could achieve a more sustained drug release compared with nanofibers [47]. Stimuli-responsive microcapsules were embedded in a hydrogel matrix to release biomolecules from a PLGA shell when excited by a laser, as shown in Fig. 3a. Dyes, biomolecules or enzymes were printed on a hydrophobic solid substrate and recovered by a PLGA shell containing gold nanorods, printed over the hydrogel matrices. This functionalization of capsules allowed their selective rupturing when irradiated with a laser

and, hence, temporal and spatial 2D and 3D control of release from grafted microcapsules [82]. However, analogously to growth factors, (bio)printing could affect the biological activity of loaded drugs. The biological activity reduction of heparin and vancomycin following spraying through the ink jet nozzles was between 1% and 18% [77]. For vancomycin, a further loss of 11% of biological activity was found following incorporation into a cement and subsequent *in vitro* release [77]. Printing parameters like printing temperature, pressure and time between two layers need to be adapted for composite inks and bioinks, and taken into account to avoid a negative effect on drug delivery after printing [47].

Several additional formulation strategies have been shown to be of interest in regenerative medicine, including liposomes, micelles, dendrimers and cyclodextrin solubilization but, to the best of our knowledge, have not been printed yet for drug delivery applications in regenerative medicine. Liposomes are commonly used as carriers in drug delivery, using their ability in protecting and delivering over time a wide range of molecules. Recently, they were formulated as carriers for the sustained and local delivery of drugs but also bioactive agents as growth factors or genetic materials (i.e., DNA, RNA or derivative RNA) within a scaffold used as a support for cell development [32–34]. They could be incorporated in a desired place within the scaffold, with a programmed kinetic profile (i.e., based on lipid composition, particle size, morphology, surface charge, a drug's loaded charge), possibly triggered with a stimuli-responsive ability (i.e., release with temperature, pH, UV influence) [34,35,83]. Additionally, several liposome-loaded biohydrogels (e.g., chitosan, gelatin, dextran) were developed [35] to protect drugs and minimize their burst-release in biohydrogels. Their biocompatibility and their physical and rheological properties underlined their therapeutic potential in regenerative medicine [83] but, surprisingly, to the best of our knowledge, liposomes have not yet been used in bioprinting.

Tissue engineering applications of dendrimers include drug delivery or controlled delivery of nutrients and growth factors as nanocarriers [84]. This specific application has not been printed, but the proof-of-printability of dendrimers has been done for other applications [85] – the reason why we considered dendrimers as a form having shown proof-of-printability in Fig. 1. In addition to non-printed applications of liposomes and dendrimers, solubilization approaches using micelles or cyclodextrins have been reported and could be of interest for future bioprinting developments. Rey-Rico *et al.* [86] recently published supramolecular polypseudorotaxane gels as scaffolds that can durably deliver recombinant adeno-associated viral vectors encapsulated in polymeric micelles in human mesenchymal stem cells for applications in cartilage regeneration. Poloxamer PF68 and poloxamine T908 polymers combined with alpha-cyclodextrin, hyaluronic acid or chondroitin sulfate were of particular interest to encapsulate viral vectors. Compared with free vectors, the gels provided higher cellular concentrations of vectors and sustained levels of transgene expression over time. The same approach had been shown to be efficient in human osteoarthritic chondrocytes using linear or X-shaped copolymers [87]. These formulations were not bioprinted in this specific application, but the proof-of-printability of micelles is being carried out for other applications [88], considering bioprinting genetic material containing micelles would be of interest for the next step of development in gene delivery.

Additional studies have been performed on cyclodextrin drug delivery applied to bioprinting and regenerative medicine. For example,  $\gamma$ -cyclodextrins were immobilized on a hydrogel to release osteogenic agents (e.g., dexamethasone) to human-adolescent-derived stem cells (hASCs), allowing efficient bone regeneration [89]. Furthermore, Lee *et al.* [90] designed poly(L-lactic acid) (PLLA) and gelatin fibrous scaffolds (illustrated in Fig. 3b) on which hydroxyapatite particles were coated with simvastatin (osteogenic agent) loaded  $\beta$ -cyclodextrin and adamantylamine (linker to hydroxyapatite) loaded  $\beta$ -cyclodextrin. This construction prolonged simvastatin release by a factor of two-to-four, enhancing *in vivo* and *in vitro* bone regeneration [90]. This application was not bioprinted but the proof-of-printability of cyclodextrins was done for other applications [91]. In conclusion regarding the delivery of bioactive molecules, unsurprisingly common pharmaceutical forms like nanoparticles and microparticles are found. Applications using loaded fibers allow the combined delivery of growth factors or active substances with the appropriate nanotopography for optimal cell adhesion. Among unprinted forms, liposomes, commonly used in the field of pharmacy, appear promising, providing their proof-of-printability.

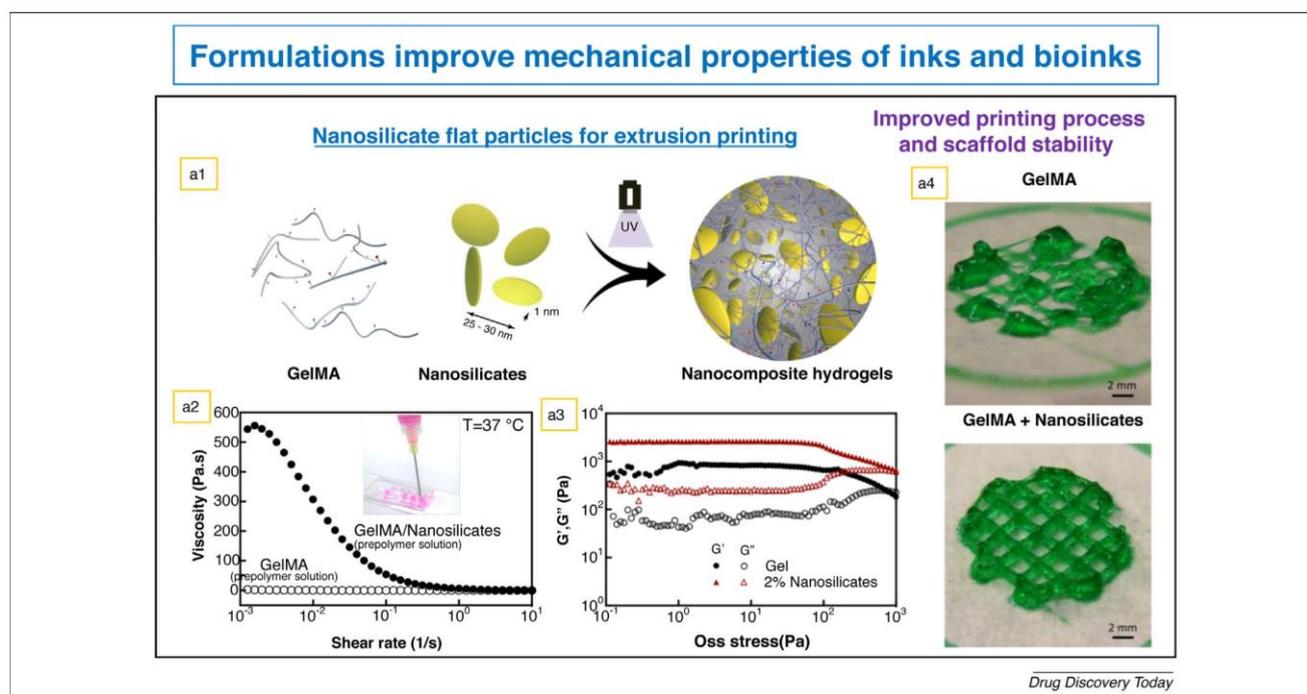
### Improvement of mechanical properties of inks and scaffolds

Beside the cell fate and the delivery of biomolecules, the inclusion of forms into bioinks could be used to reach optimal properties of the bioink for the printing process (Fig. 4). This could be achieved by modulating the nanotopography, bioink stiffness and porosity,

while maintaining shear-thinning properties. Optimal mechanical properties of the printed scaffold as a final object, such as the scaffold's hardness and porosity, its rate of degradation and its architecture, are also essential for efficient tissue regeneration.

### Improvement of mechanical properties of inks

The appropriate modulation of mechanical properties of the designed bioink is one of the major challenges for successful bioprinting, because these properties impact the printing process and the fate of the printed scaffold. Several approaches have been tested to modulate mechanical properties of bioinks. Inclusion of particles to improve mechanical properties of hydrogels was the chosen strategy. Initially added to facilitate cell adhesion and differentiation, microcarriers significantly influence the bioink stiffness in a size-dependent manner [65,92]. For instance, polylactic acid microcarriers provided an increased compressive modulus of the gelatin methacrylamide-gellan gum bioink for bone and osteochondral constructs allowing a successful printing of bilayered osteochondral graft models of clinically relevant sizes [62]. The preparation of these microcarriers had previously been shown as biocompatible and the potential of drug release was demonstrated using fluorescent probes [93]. Furthermore, the excipients used for microcarriers should be nontoxic, and the rate of degradation should correspond to the desired properties of the optimal scaffold [94]. However, the technical challenge of the technique is the successful delivery of the microcarriers during the printing stage and assembly in a 3D structure, because the microcarriers could be at the origin of nozzle obstruction [94].



**FIGURE 4**

Contribution of formulations to improve mechanical properties of printing process. (a1) Schematic representation of fabrication of nanocomposite hydrogels from gelatin methacrylate (GelMA) and nanosilicates by covalent crosslinking under UV radiation. (a2) Viscosity shear rate and (a3) rheological analysis highlight shear-thinning characteristic of the prepolymer solution GelMA loaded with nanosilicates. (a4) Illustration of printed hydrogels showing the contribution of nanoparticles to increase printing precision and strengthen mechanical properties of the scaffold [45].

To avoid obstruction-related issues during printing, nanoparticles could be used. For instance, nanoclays incorporated into N-acryloyl glycinamide hydrogel significantly improved the mechanical properties of 3D-extrusion-printed scaffolds for bone regeneration [44]. Furthermore, the size was not the only important parameter while incorporating objects into hydrogels. According to the shape of incorporated objects, the hydrogel could benefit from shear-thinning properties, allowing liquefaction of a gel under physical constraint for an easy administration, and regelling *in situ* afterwards. For instance, shear-thinning nanocomposite hydrogels composed of synthetic silicate nanoplatelets (disks) and gelatin were developed as injectable hemostatic agents that promoted *in vitro* and *in vivo* coagulation [95]. Inclusion of coin-like 2D synthetic silicate clay nanoparticles (Fig. 4a) to gelatin methacrylate composite ink using an additive manufacturing approach resulted in strong, reversible, noncovalent interactions leading to shear-thinning mechanical properties [45]. Another possibility for tuning mechanical properties of bioinks is to use Pluronic<sup>®</sup> F127 diacrylate micelles, which have reportedly [88] provided a suitable rheological behavior and shear-thinning properties for 3D printing of living responsive materials and devices with programmed bacterial cells as responsive components. Additionally, fibers could be used for optimizing mechanical properties. PLGA fibers were integrated into the 3D-printed polycaprolactone matrices. The tensile moduli were comparable for nude scaffolds, scaffolds coated with nanofibers and cell-seeded scaffolds. Higher mechanical stability of scaffolds and greater cell adhesion were obtained by coating scaffolds by PLGA nanofibers [48]. The fiber size was shown to be of key importance not only for conferring a physiologically relevant environment for bone and cartilage regeneration but also for the properties of the printed scaffold. Although nanofibers could better reproduce ECM layout, larger pores obtained with microfibers provide better cell migration inside the scaffold and better mechanical support. Microfiber diameter influences porosity of the scaffold, the migration and development of cells [47]. Further reinforcement of fibers was studied recently by adding short fibers to a matrix of cellulose-modified gypsum powder, which allowed ten-times more work of fracture values compared with nonreinforced printed samples [96].

Alternatively to stiffening hydrogels with incorporation of individual objects to optimize bioink properties, glue-like molecules could be used to structure the scaffolds and optimize mechanical properties of printed constructs. For this purpose, dendrimers have recently been used in tissue engineering and regenerative medicine as an inter-particle or inter-cell glue for building larger constructs. For example, cyclodextrin-functionalized polystyrene nanoparticles were assembled in monolayers using guest-functionalized complementary adamantyl-terminated poly(propylene imine) dendrimers as a noncovalent supramolecular glue [97]. Furthermore, as an intercellular glue, 32-arm dendrimers were considered optimal for cell linking while preserving viability and cell functions and proliferation (however modification of cells using sodium periodate to introduce aldehyde groups onto the cell surface was necessary) [98]. Dendrimers have the potential to cross cell membranes and can deliver the entrapped bioactive inside the cell *in vivo*. Their functionalization greatly improved the toxicity profile of the parent dendrimer, reducing their cytotoxicity sig-

nificantly after functionalization [99], which increases their potential for future applications in bioprinting. As cited above, dendrimer bioprinting has not yet been described for regenerative medicine but printed dendrimers were used as a model for the studies of biomineralization of cell walls by nanoprecipitation of silica nanoparticles [85].

An alternative approach [100] to improve printed scaffolds described the use of cyclodextrins as a crosslinker to mechanically reinforce networks and viscoelastic features of conventional hydrogels (e.g., hyaluronic acid and collagen). The supramolecular interactions thereby generated between cyclodextrin units, mostly engaged by photopolymerization, permit use of these syringeable hydrogels in bioprinting. A bioink for extrusion bioprinting was developed [91] where a hyaluronic acid hydrogel was functionalized with adamantanes and  $\beta$ -cyclodextrins, in a guest–host interaction that reinforced the original hydrogel network formation. Moreover, the cyclodextrin intermolecular connection was also reported in electrospinning to enhance the tensile strength of polymeric nanofibers or facilitate the electrospinning of nonprocessable polymers [100]. Allen *et al.* [101] used DNA-coated carboxylate microparticles that could assemble by DNA–DNA interactions to form the 3D shape of the scaffold. Microparticle-laden polystyrene gel was extruded with a 3D printer and the 3D assembly solely held together by DNA interactions. They also coextruded cells with microparticle-laden hydrogel and demonstrated that cells had better viability and growth when coextruded with hydrogel compared with polystyrene gel alone [101].

#### Printing process and improving mechanical properties of scaffolds

Scaffold hardness and porosity are of high importance for efficient tissue regeneration and, as described here above, can be successfully tuned by appropriate bioink formulation, taking into account bioink mechanical properties. In addition, the printing process can also significantly affect the properties of scaffolds. The kinetics of printed scaffold degradation, of key importance for efficient tissue regeneration, is dependent upon various factors, including process conditions [28,102]. Mechanical properties of scaffolds are particularly important for bone defect regeneration. They are mainly related to the porosity, which is physiologically high (>50%) in the inner part of the bone but low (<10%) at the external parts [5]. Scaffold porosity has been shown to be essential for bone reconstruction. Pores were dependent on 3D-printing technology and post-processing that can harden the scaffolds [5].

Common printing technology of bone scaffolds is available in printing ceramic particles but, alternatively, bioceramic bone scaffolds could be obtained by ‘powder-based 3D printing’ [39], technology renamed in recent consensus terminology only as ‘3D printing’ [1]. The technique consists of printing a binder solution over a powder layer of calcium phosphate, alpha-tricalcium phosphate or hydroxyapatite, doped or not by adding SrO and MgO [4,5,42]. The quality of scaffolds obtained by 3D printing used commonly for bone regeneration depends on parameters such as powder packing density, powder flowability, powder layer thickness, binder drop volume, binder saturation and powder wettability. The obtained porosity and mechanical properties are of great importance for bone scaffolds [5]. The 3D printing is followed by de-powdering and post-processing treatments, commonly by dip-

ping them in a binder solution or by sintering, to enhance their mechanical properties [4].

To better understand required key powder parameters and printing accuracy which conditions the final outcome of printed scaffolds, a 3D printability study of calcium phosphate powders was performed. Results showed that particle size, powder flowability and compaction rate were of key importance for the final outcome of the printed object [6,103]. However, it has been shown that the particle size also impacts the kinetics of bone formation, not only mechanical properties. In a recent study, different particle sizes of calcium polyphosphate, crushed to obtain submicron and 1–3  $\mu\text{m}$  particulates were considered as a filler in a rabbit model of bone defects. Higher new bone formation was obtained *in vivo* with low degradation kinetics (i.e., higher size particulates) [5,104].

Mechanical properties can also be tuned after printing, using a post-printing treatment of scaffolds to harden them. Post-treatment of the biphasic calcium phosphate and hydroxyapatite scaffolds with a polylactic-co-glycolic acid solution enhanced the mechanical properties by a factor of 8. Scaffolds showed bone remodeling potential for 3D-printed individual and complex bone substitutes [39]. To conclude, on improvement of mechanical properties of inks, each inclusion of micro- or nano-objects modifies mechanical and rheological properties of the matrices by stiffening the gel used. According to geometric properties of objects, additional shear-thinning properties can be achieved. Alternatively, glue-like approaches through dendrimers or cyclodextrins were shown to be efficient. The improvement of printed scaffolds mainly depends on the printing process or post-printing treatment. The geometry of printed scaffolds has also been shown to impact biological performances but the impact is not fully understood yet [105].

### Remaining challenges and future outcomes

Most of the remaining challenges and future outcomes of composite-formulation-based bioprinted constructs are related to the field of bioprinting in general, micro- and nano-objects being already at the commercial level. Ongoing research for bioprinting of functional tissues and organs concerns several applications, including skeletal, muscular, integumentary, nervous, endocrine, reproductive, respiratory, digestive, urinary, lymphatic and circulatory systems [106,107]. Recent estimations indicate that we are about two decades from bioprinting a fully functional complex organ like the heart [108]. The analysis of manufacturing readiness level (i.e., manufacturing maturity, risk and gap identification for technology to manufacturing transition) shows that bioprinting is starting the translational phase [109]. Although the number of encouraging results of research applications is growing daily, printing of viable tissues and organs for clinical applications of regenerative medicine remains a challenge. Several issues still have to be addressed for a successful clinical translation of bioprinting technologies for the pre-bioprinting phase (e.g., biopsy, cell expansion), bioprinting (e.g., bioink issues, technology, resolution, biocompatibility) and post-bioprinting (e.g., conditioning, affordability) [110]. Regarding commonly limited availability of primary cells, the availability of sufficient quantities of biological material for bioprinting a clinically relevant size of tissues is a hurdle. Recent developments on upscaling stem cell culture [111] are

addressing this barrier. The technology issues are also currently addressed to be able to print sterile hard and soft tissues containing matrix and viable cells of clinically relevant size [107]. In addition, the very first *in situ* bioprinting proof-of-concept results need further development [108]. The technology readiness level is considered as level 3 out of 10, meaning that experimental proof-of-concept is done, but full rate production is still far from being reached [109].

Tissue growth or tissue fusion post-printing is another challenge that can be addressed with computational studies [106], as well as 4D bioprinting development (i.e., considering the time as the fourth dimension for printed tissue evolution upon response to intrinsic or external stimuli) [112,113]. The fate of implanted printed objects needs to be taken into account for efficient long-term replacement of tissues by integrating unavoidable, mechanical and biological changes in the development. *In situ* innervation and vascularization is of key importance for tissue survival. Fine-tuning of supramolecular assemblies of low-molecular-weight gelators has been shown to control stem cell behavior [22]. Formulation of new inks or bioinks with tunable mechanical and rheological properties, as well as stimuli-responsive hydrogels and further mechanobiological studies on cell–ink interaction, can allow an optimal outcome of printed objects [106]. Including microparticles or nano-objects in inks or bioinks can address some challenges, as discussed in this review. These objects are already at a commercialized scale; however, the impact of the addition of such objects to inks needs to be assessed on the mechanical and biological levels for each specific application. Furthermore, addressing the ethical, social and regulatory issues concerning bioprinting still needs to be completed before implementing bioprinting in everyday clinical practice [106,114]. For efficient patient management, bioprinting needs to become commercially viable and safe [115]. Through 5-year anticipated advances, overall medical costs could be reduced using printing technology [108].

### Concluding remarks

Recent advances in bioprinting and additive manufacturing have led to a significant improvement of regenerative medicine, allowing the development of viable and functional tissues that advantageously replace prostheses in numerous applications. However, this development has raised several challenges related to the mechanical and biological issues related to viable constructs. Some of these challenges can be efficiently addressed by incorporating pharmaceutical forms into bioinks for bioprinting. In this review, we have classified the challenges into cell fate (viability, growth and differentiation) related issues, biomolecule delivery issues and mechanical improvement of either inks or printed constructs. The added values of pharmaceutical forms included in nanoengineered inks and bioinks are reviewed. The results show that composite inks and bioinks bring the regenerative medicine one step forward from the bench to the bedside, providing that inherent rheological modifications of the ink or the consequences of printing process on the forms are considered. Inclusion of pharmaceutical forms like nanoparticles, microparticles and fibers allowed improvement of cell growth and differentiation, encapsulating biomolecules or improving the printing process and scaffold outcome.

## REVIEWS

Printing stimuli-responsive materials, currently studied for magnetic particles, is one possible strategy, but a variety of other stimuli (temperature, pH, light, etc.) could also be explored. Bioprinting could benefit from recent developments of smart delivery platforms [116]. Future perspectives will possibly further combine the main therapeutic advances and bioprinting technology. For instance, recent findings on cell-mediated delivery of nanoparticles showed that, by chemical modification, nano- and micro-particles could be bound to the cell surface in a noncovalent (e.g., chitosan- or hyaluronic-acid-mediated adhesion, antibody-targeted adhesion, biotin-avidin adhesion) and covalent (e.g., coupling to cell surface amine groups, maleimide-thiol coupling) way [117]. Future developments of bioprinting could print cells along with encapsulated particles containing everything cells need for proper differentiation and optimal tissue replacement.

Currently, little is known about how to clean cell-elimination products. Accumulation of metabolites and cell waste could be harmful in immature constructs, where vascularization is not yet optimal, and could limit the maximal size of printed constructs where elimination is diffusion based. An *in vitro* detoxification system using polydiacetylene nanoparticles in a liver-inspired hydrogel structure was efficiently used to detoxify toxins [118]. Analogous biocompatible applications could be considered for printed tissue constructs in regenerative medicine to assure optimal conditions for the lag time of tissue development and maturation. Combining bioprinting with recent advances in nanotechnology, printing technology and also precise and fine understanding of physiological processes of tissue development and differentiation, allows regenerative medicine to get closer to the clinics and to personalized medicine.

## References

- Moroni, L. *et al.* (2018) Biofabrication: a guide to technology and terminology. *Trends Biotechnol.* 36, 384–402
- Groll, J. *et al.* (2016) Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication* 8 <http://dx.doi.org/10.1088/1758-5090/8/1/013001>
- Murphy, S.V. and Atala, A. (2014) 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* 32, 773–785
- Brunello, G. *et al.* (2016) Powder-based 3D printing for bone tissue engineering. *Biotechnol. Adv.* 34, 740–753
- Bose, S. *et al.* (2013) Bone tissue engineering using 3D printing. *Mater. Today* 16, 496–504
- Zhou, Z. *et al.* (2014) Printability of calcium phosphate: calcium sulfate powders for the application of tissue engineered bone scaffolds using the 3D printing technique. *Mater. Sci. Eng. C* 38, 1–10
- Inzana, J.A. *et al.* (2015) 3D printed bioceramics for dual antibiotic delivery to treat implant-associated bone infection. *Eur. Cells Mater.* 30, 232–247
- Xu, T. *et al.* (2012) Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. *Biofabrication* 5 015001
- Michael, S. *et al.* (2013) Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. *PLoS One* 8, e57741
- Soumen, J. and Lerman, A. (2015) Bioprinting a cardiac valve. *Biotechnol. Adv.* 33, 1503–1521
- Zhang, Z. *et al.* (2017) 3D bioprinting of soft materials-based regenerative vascular structures and tissues. *Compos. B Eng.* 123, 279–291
- Nyberg, E.L. *et al.* (2017) 3D-printing technologies for craniofacial rehabilitation, reconstruction, and regeneration. *Ann. Biomed. Eng.* 45, 45–57
- Provaggi, E. *et al.* (2017) Applications of 3D printing in the management of severe spinal conditions. *Proc. Inst. Mech. Eng. H J. Eng. Med.* 231, 471–486
- Popov, A. *et al.* (2017) 3D bioprinting for musculoskeletal applications. *J. 3D Print. Med.* 1, 191–211
- Hayman, L. *et al.* (2017) Tissue engineering in hand surgery: a technology update. *J. Hand Surg. Am.* 42, 727–735
- Jessop, Z.M. *et al.* (2017) 3D bioprinting for reconstructive surgery: principles, applications and challenges. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* 70, 1155–1170
- Zhong, N. and Zhao, X. (2017) 3D printing for clinical application in otorhinolaryngology. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 274 (12), 4079–4089
- Gulati, K. and Ivanovski, S. (2017) Dental implants modified with drug releasing titania nanotubes: therapeutic potential and developmental challenges. *Expert Opin. Drug Deliv.* 14, 1009–1024
- Marro, A. *et al.* (2016) Three-dimensional printing and medical imaging: a review of the methods and applications. *Curr. Probl. Diagn. Radiol.* 45, 2–9
- Sumerel, J. *et al.* (2006) Piezoelectric ink jet processing of materials for medical and biological applications. *Biotechnol. J.* 1, 976–987
- Guvendiren, M. *et al.* (2016) Designing biomaterials for 3D printing. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2, 1679–1693
- Latxague, L. *et al.* (2015) Control of stem-cell behavior by fine tuning the supramolecular assemblies of low-molecular-weight gelators. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 4517–4521
- Baillet, J. *et al.* (2018) Lipid and nucleic acid chemistries: combining the best of both worlds to construct advanced biomaterials. *Adv. Mater.* 30 (11), 1705078
- O'Brien, C.M. *et al.* (2015) Three-dimensional printing of nanomaterial scaffolds for complex tissue regeneration. *Tissue Eng. B Rev.* 21, 103–114
- Fan, R. *et al.* (2016) Bio-printing cell-laden Matrigel–agarose constructs. *J. Biomater. Appl.* 1, 684–692
- Tang, Z. *et al.* (2016) Polymeric nanostructured materials for biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 60, 86–128
- Sumerel, J. *et al.* (2006) Digital printing of bioinks. *Digit. Fabr.* Available at: <https://www.ingentaconnect.com/content/ist/nipdf/2006/00002006/00000003/art00030>
- Chimene, D. *et al.* (2016) Advanced bioinks for 3D printing: a materials science perspective. *Ann. Biomed. Eng.* 44, 2090–2102
- Krishna, L. *et al.* (2016) Nanostructured scaffold as a determinant of stem cell fate. *Stem Cell Res. Ther.* 7, 1–12
- Venugopal, J.R. and Ramakrishna, S. (2016) Nanotechnology: 21st century revolution in restorative healthcare. *Nanomedicine* 11, 1511–1513
- Ker, E.D.F. *et al.* (2011) Bioprinting of growth factors onto aligned sub-micron fibrous scaffolds for simultaneous control of cell differentiation and alignment. *Biomaterials* 32, 8097–8107
- Janczek, A.A. *et al.* (2017) PEGylated liposomes associate with Wnt3A protein and expand putative stem cells in human bone marrow populations. *Nanomedicine* 12, 845–863
- Olekson, M.A.P. *et al.* (2015) SDF-1 liposomes promote sustained cell proliferation in mouse diabetic wounds. *Wound Repair Regen.* 23, 711–723
- Monteiro, N. *et al.* (2014) Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J. R. Soc. Interface* 11 20140459
- Grijalvo, S. *et al.* (2016) Biodegradable liposome-encapsulated hydrogels for biomedical applications: a marriage of convenience. *Biomater. Sci.* 4, 555–574
- Moghassemi, S. *et al.* (2017) Growth factor-loaded nano-niosomal gel formulation and characterization. *AAPS PharmSciTech* 18, 34–41
- Wu, M. *et al.* (2017) Strategies to reduce the intracellular effects of iron oxide nanoparticle degradation. *Nanomedicine* 12, 555–570
- Levato, R. *et al.* (2017) The bio in the ink: cartilage regeneration with bioprintable hydrogels and articular cartilage-derived progenitor cells. *Acta Biomater.* 61, 41–53
- Castilho, M. *et al.* (2014) Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate scaffolds for substitution of complex bone defects. *Biofabrication* 6 015006
- Fedorovich, N.E. *et al.* (2012) The osteoinductive potential of printable, cell-laden hydrogel-ceramic composites. *J. Biomed. Mater. Res. A* 100, 2412–2420
- Tamjid, E. *et al.* (2013) Tissue growth into three-dimensional composite scaffolds with controlled micro-features and nanotopographical surfaces. *Biomed. Mater. Res.* 101, 2796–2807
- Tarafder, S. *et al.* (2013) 3D printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds: effect of SrO and MgO doping on *in vivo* osteogenesis in a rat distal femoral defect model. *Biomater. Sci.* 1, 1250
- Ahlfeld, T. *et al.* (2017) Development of a clay based bioink for 3D cell printing for skeletal application. *Biofabrication* 9 (3), 034103
- Zhai, X. *et al.* (2017) 3D-printed high strength bioactive supramolecular polymer/clay nanocomposite hydrogel scaffold for bone regeneration. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3, 1109–1118

- 45 Xavier, J.R. *et al.* (2015) Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach. *ACS Nano* 9, 3109–3118
- 46 Gao, G. *et al.* (2014) Bioactive nanoparticles stimulate bone tissue formation in bioprinted three-dimensional scaffold and human mesenchymal stem cells. *Biotechnol. J.* 9, 1304–1311
- 47 Trachtenberg, J.E. *et al.* (2013) Fiber-based composite tissue engineering scaffolds for drug delivery. *Isr. J. Chem.* 53, 646–654
- 48 Maurmann, N. *et al.* (2017) Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. *Biomed. Phys. Eng. Express* 3, 045005 <http://dx.doi.org/10.1088/2057-1976/aa6308>
- 49 Lalwani, G. *et al.* (2016) Two- and three-dimensional all-carbon nanomaterial assemblies for tissue engineering and regenerative medicine. *Ann. Biomed. Eng.* 44, 1–16
- 50 Holmes, B. *et al.* (2013) Enhanced human bone marrow mesenchymal stem cell functions in novel 3D cartilage scaffolds with hydrogen treated multi-walled carbon nanotubes. *Nanotechnology* 24, 365102
- 51 Izadifar, M. *et al.* (2017) UV-assisted 3D bioprinting of nano-reinforced hybrid cardiac patch for myocardial tissue engineering. *Tissue Eng. C Methods* 24 (2), 74–88
- 52 Lee, E.A. *et al.* (2013) Application of magnetic nanoparticle for controlled tissue assembly and tissue engineering. *Arch. Pharm. Res.* 37, 120–128
- 53 Kim, M.-O. *et al.* (2015) Electromagnetic fields and nanomagnetic particles increase the osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Med.* 35, 153–160
- 54 Huang, D.M. *et al.* (2009) The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 30, 3645–3651
- 55 Assunção-Silva, R.C. *et al.* (2015) Induction of neurite outgrowth in 3D hydrogel-based environments Induction of neurite outgrowth in 3D hydrogel-based environments. *Biomed. Mater.* 10, 051001
- 56 Tricomi, B.J. *et al.* (2016) Stem cell bioprinting for applications in regenerative medicine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1383, 115–124
- 57 Souza, G.R. *et al.* (2017) Magnetically bioprinted human myometrial 3D cell rings as a model for uterine contractility. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (4), 683
- 58 Tseng, H. *et al.* (2016) A high-throughput *in vitro* ring assay for vasoactivity using magnetic 3D bioprinting. *Sci. Rep.* 6, 30640
- 59 Fayol, D. *et al.* (2013) Design of biomimetic vascular grafts with magnetic endothelial patterning. *Cell Transplant.* 22, 2105–2118
- 60 Hachani, R. *et al.* (2013) Tracking stem cells in tissue-engineered organs using magnetic nanoparticles. *Nanoscale* 5, 11362
- 61 Singh, A. *et al.* (2012) Modular multifunctional poly(ethylene glycol) hydrogels for stem cell differentiation. *Adv. Funct. Mater.* 23 (5), 575–582
- 62 Levato, R. *et al.* (2014) Biofabrication of tissue constructs by 3D bioprinting of cell-laden microcarriers. *Biofabrication* 6, 035020
- 63 Kingsley, D.M. *et al.* (2016) Microcapsules and 3D customizable shelled microenvironments from laser direct-written microbeads. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 2264–2274
- 64 Sart, S. *et al.* (2013) Engineering stem cell fate with biochemical and biomechanical properties of microcarriers. *Biotechnol. Prog.* 29, 1354–1366
- 65 Irvine, S. and Venkatraman, S. (2016) Bioprinting and differentiation of stem cells. *Molecules* 21, 1188
- 66 Das, A.A.K. *et al.* (2014) Artificial multicellular assemblies from cells interfaced with polymers and nanomaterials. In *Cell Surface Engineering: Fabrication of Functional Nanoshells* (Fakhrullin, R.F., ed.), pp. 162–184, Royal Society of Chemistry
- 67 Sivoletta, S. *et al.* (2013) Delivery systems and role of growth factors for alveolar bone regeneration in dentistry. *Regener. Med. Tissue Eng.* Chapter 28, pages 713–742 online book Regenerative medicine and Tissue engineering, consulted on <https://www.intechopen.com/books/regenerative-medicine-and-tissue-engineering> (retrieved June 6, 2018)
- 68 Keratitayanan, P. *et al.* (2015) Nanomaterials for engineering stem cell responses. *Adv. Healthc. Mater.* 4, 1600–1627
- 69 Poldervaart, M.T. *et al.* (2013) Sustained release of BMP-2 in bioprinted alginate for osteogenicity in mice and rats. *PLoS One* 8, e0072610
- 70 Poldervaart, M.T. *et al.* (2014) Prolonged presence of VEGF promotes vascularization in 3D bioprinted scaffolds with defined architecture. *J. Control. Release* 184, 58–66
- 71 Castro, N.J. *et al.* (2014) Biomimetic biphasic 3-D nanocomposite scaffold for osteochondral regeneration. *AIChE J.* 60, 432–442
- 72 Zhu, W. *et al.* (2018) 3D bioprinting mesenchymal stem cell-laden construct with core-shell nanospheres for cartilage tissue engineering. *Nanotechnology* 29, 185101
- 73 Becker, S.T. *et al.* (2012) Endocultivation: the influence of delayed vs: simultaneous application of BMP-2 onto individually formed hydroxyapatite matrices for heterotopic bone induction. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 41, 1153–1160
- 74 Cornelsen, M. *et al.* (2013) Infiltration of 3D printed tricalciumphosphate scaffolds with biodegradable polymers and biomolecules for local drug delivery. *Biomed. Technol.* 58, 9–10
- 75 Du, M. *et al.* (2015) 3D bioprinting of BMSC-laden methacrylamide gelatin scaffolds with CBD-BMP2-collagen microfibers. *Biofabrication* 7, 044104
- 76 Ker, E.D.F. *et al.* (2011) Engineering spatial control of multiple differentiation fates within a stem cell population. *Biomaterials* 32, 3413–3422
- 77 Vorndran, E. *et al.* (2010) Simultaneous immobilization of bioactives during 3D powder printing of bioceramic drug-release matrices. *Adv. Funct. Mater.* 20, 1585–1591
- 78 Li, K. *et al.* (2015) Three-dimensionally plotted MBG/PHBHHx composite scaffold for antitubercular drug delivery and tissue regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2), 102
- 79 Zhu, M. *et al.* (2015) 3D-printed hierarchical scaffold for localized isoniazid/rifampin drug delivery and osteoarticular tuberculosis therapy. *Acta Biomater.* 16, 145–155
- 80 Gbureck, U. *et al.* (2007) Low temperature direct 3D printed bioceramics and biocomposites as drug release matrices. *J. Control. Release* 122, 173–180
- 81 Baumann, B. *et al.* (2017) Control of nanoparticle release kinetics from 3D printed hydrogel scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 4623–4628
- 82 Gupta, M.K. *et al.* (2015) 3D Printed programmable release capsules. *Nano Lett.* 15, 5321–5329
- 83 Zylberberg, C. and Matosevic, S. (2017) Bioengineered liposome–scaffold composites as therapeutic delivery systems. *Ther. Ther. Deliv.* 8, 425–445
- 84 Gorain, B. *et al.* (2017) The use of nanoscaffolds and dendrimers in tissue engineering. *Drug Discov. Today* 22, 652–664
- 85 Deravi, L.F. *et al.* (2008) Piezoelectric inkjet printing of biomimetic inks for reactive surfaces. *Small* 4, 2127–2130
- 86 Rey-Rico, A. *et al.* (2017) Supramolecular polypseudorotaxane gels for controlled delivery of rAAV vectors in human mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Int. J. Pharm.* 531 (2), 492–503
- 87 Rey-Rico, A. *et al.* (2016) PEO-PPO-PEO carriers for rAAV-mediated transduction of human articular chondrocytes *in vitro* and in a human osteochondral defect model. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 20600–20613
- 88 Liu, X. *et al.* (2017) 3D printing of living responsive materials and devices. *Adv. Mater.* 30 (4), 170482
- 89 Lima, A.C. *et al.* (2014) Free and copolymerized  $\gamma$ -cyclodextrins regulate the performance of dexamethasone-loaded dextran microspheres for bone regeneration. *J. Mater. Chem. B* 2, 4943–4956
- 90 Lee, J.B. *et al.* (2016) Scaffold loaded with simvastatin/beta-cyclodextrin-modified hydroxyapatite poly(L-lactic acid)/gelatin inclusion complex for bone tissue regeneration. *Macromol. Biosci.* 2016, 1027–1038
- 91 Loebel, C. *et al.* (2017) Shear-thinning and self-healing hydrogels as injectable therapeutics and for 3D-printing. *Nat. Protoc.* 12, 1521–1541
- 92 Hözl, K. *et al.* (2016) Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication* 8, 032002
- 93 Levato, R. *et al.* (2012) Preparation of biodegradable polylactide microparticles via a biocompatible procedure. *Macromol. Biosci.* 12, 557–566
- 94 Ozbolat, I.T. and Hospodiuk, M. (2016) Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials* 76, 321–343
- 95 Gaharwar, A.K. *et al.* (2014) Shear-thinning nanocomposite hydrogels for the treatment of hemorrhage. *ACS Nano* 8, 9833–9842
- 96 Christ, S. *et al.* (2015) Fiber reinforcement during 3D printing. *Mater. Lett.* 139, 165–168
- 97 Ling, X.Y. *et al.* (2009) Transfer-printing and host–guest properties of 3D supramolecular particle structures. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1 (4), 960–968
- 98 Zhao, D. *et al.* (2008) Dendrimer hydrazides as multivalent transient inter-cellular linkers. *Biomaterials* 29, 3693–3702
- 99 Kesharwani, P. *et al.* (2011) Evaluation of dendrimer safety and efficacy through cell line studies. *Curr. Drug Targets* 12, 1478–1497
- 100 Alvarez-lorenzo, C. *et al.* (2017) Cyclodextrins as versatile building blocks for regenerative medicine. *J. Control. Release* 268, 269–281
- 101 Allen, P.B. *et al.* (2015) 3D printing with nucleic acid adhesives. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 1, 19–26
- 102 Gaharwar, A.K. *et al.* (2014) Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 441–453
- 103 Butscher, A. *et al.* (2012) Printability of calcium phosphate powders for three-dimensional printing of tissue engineering scaffolds. *Acta Biomater.* 8, 373–385
- 104 Pilliar, R.M. *et al.* (2017) Calcium polyphosphate particulates for bone void filler applications. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 105, 874–884
- 105 Gleadall, A. *et al.* (2018) Review of additive manufactured tissue engineering scaffolds: relationship between geometry and performance. *Burns Trauma* 6, 19

- 106 Vijayavenkataraman, S. *et al.* (2018) 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.004> Available online
- 107 Gao, G. *et al.* (2018) Organ bioprinting: are we there yet? *Adv Healthc. Mater.* 7, 1–8
- 108 Choonara, Y.E. *et al.* (2016) 3D-printing and the effect on medical costs: a new era? *Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res.* 16, 23–32
- 109 Wu, C. *et al.* (2017) Bioprinting: an assessment based on manufacturing readiness levels. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 333–354
- 110 Datta, P. *et al.* (2018) Essential steps in bioprinting: from pre- to post-bioprinting. *Biotechnol. Adv.* 36, 1481–1504
- 111 Wong, C.W. *et al.* (2018) A simple and efficient feeder-free culture system to up-scale iPSCs on polymeric material surface for use in 3D bioprinting. *Mater. Sci. Eng. C* 82, 69–79
- 112 Gao, B. *et al.* (2016) 4D bioprinting for biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 34, 746–756
- 113 Ionov, L. (2018) 4D biofabrication: materials, methods, and applications. *Adv. Healthc. Mater.* 7 (17), 1800412
- 114 Hourd, P. *et al.* (2015) A 3D bioprinting exemplar of the consequences of the regulatory requirements on customized processes. *Regener. Med.* 10, 863–883
- 115 Morris, S. (2018) Future of 3D printing: how 3D bioprinting technology can revolutionize healthcare? *Birth Defects Res.* 110 (13), 1098–1101
- 116 Alvarez-Lorenzo, C. and Concheiro, A. (2014) Smart drug delivery systems: from fundamentals to the clinic. *Chem. Commun.* 50, 7743–7765
- 117 Ayer, M. and Klok, H.A. (2017) Cell-mediated delivery of synthetic nano- and microparticles. *J. Control. Release* 259, 92–104
- 118 Gou, M. *et al.* (2014) Bio-inspired detoxification using 3D-printed hydrogel nanocomposites. *Nat. Commun.* 5, 3774

# OPEN Nucleotide lipid-based hydrogel as a new biomaterial ink for biofabrication

Bérangère Dessane<sup>1,2,6</sup>, Rawen Smirani<sup>3,4,6</sup>, Guillaume Bouguéon<sup>1,2,6</sup>, Tina Kauss<sup>1</sup>, Emeline Ribot<sup>5</sup>, Raphaël Devillard<sup>3,4</sup>, Philippe Barthélémy<sup>1\*</sup>, Adrien Naveau<sup>3,4</sup> & Sylvie Crauste-Manciet<sup>1,2</sup>

One of the greatest challenges in the field of biofabrication remains the discovery of suitable bioinks that satisfy physicochemical and biological requirements. Despite recent advances in tissue engineering and biofabrication, progress has been limited to the development of technologies using polymer-based materials. Here, we show that a nucleotide lipid-based hydrogel resulting from the self-assembly of nucleotide lipids can be used as a bioink for soft tissue reconstruction using injection or extrusion-based systems. To the best of our knowledge, the use of a low molecular weight hydrogel as an alternative to polymeric bioinks is a novel concept in biofabrication and 3D bioprinting. Rheological studies revealed that nucleotide lipid-based hydrogels exhibit suitable mechanical properties for biofabrication and 3D bioprinting, including i) fast gelation kinetics in a cell culture medium and ii) shear moduli and thixotropy compatible with extruded oral cell survival (human gingival fibroblasts and stem cells from the apical papilla). This polymer-free soft material is a promising candidate for a new bioink design.

Biofabrication is a growing field in regenerative medicine and represents a promising tool for the construction of complex 3D structures<sup>1–4</sup>. Several approaches<sup>5,6</sup> allow 3D-bioprinted construction to be achieved, with three main techniques: inkjet, laser and extrusion-based bioprinting<sup>7</sup>. Extrusion-based bioprinting (EBB) is one of the most widespread tools used in biofabrication, mainly due to its capacity to build large-volume constructs such as tissue or organ equivalents<sup>5,8</sup>. This technique offers a wide range of opportunities because it is suitable for various polymeric materials including scaffold-based (hydrogels, microcarriers, decellularised matrix components) as well as scaffold-free (cell aggregates) materials<sup>5</sup>.

Murphy *et al.*<sup>1</sup> presented their concept of the “ideal material”, which needs to display several features, including printability, biocompatibility, good degradation kinetics, and favourable structural and mechanical properties, as well as material biomimicry. According to recent definitions<sup>9</sup>, a bioink can be defined as “a formulation of cells that is suitable to be processed by an automated biofabrication technology”. The presence of cells is a key element, and formulations that do not contain cells or involve the seeding of cells after printing do not qualify as bioinks. The term “biomaterial ink” (BmI) is then used. Consequently, this distinction will be used throughout our work.

Hydrogels are commonly used for the formulation of bioinks or BmIs and seem to be promising biomaterials because they are affordable, are easy to handle and can mimic the extracellular matrix<sup>10</sup>. Initial approaches of EBB used synthetic polymers such as polyethylene glycol (PEG) or gelatine methacrylate (GelMA) as scaffold materials, but they suffered from poor biological properties<sup>11</sup>. As an alternative, natural polymers derived from fibrous proteins or peptides have been developed due to their intrinsic biological qualities<sup>12</sup>. Among these polymers, alginate<sup>13</sup>, chitosan<sup>14</sup>, collagen<sup>15</sup> and gelatine<sup>16</sup> are the most studied. However, these polymers encounter several issues, such as poor mechanical properties<sup>5</sup>, the need for an external crosslinker to form a solid-like structure (e.g., reticulation of alginate with calcium cations<sup>17</sup>), insufficient rheological properties at physiological

<sup>1</sup>ARNA Laboratory, Inserm, U1212, CNRS 5320 (ChemBioPharm), University of Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France. <sup>2</sup>Pharmaceutical Technology Department, University Hospital of Bordeaux, CHU de Bordeaux, Avenue de Magellan, 33604, Pessac, France. <sup>3</sup>Biotis, Inserm, U1026 University of Bordeaux 146 rue Léo-Saignat, Case 45 CEDEX 33076 F, 33000, Bordeaux, France. <sup>4</sup>Department of Oral Medicine University Hospital of Bordeaux, CHU de Bordeaux, Place Amélie Rabat Léon, 33076, Bordeaux Cedex, France. <sup>5</sup>Center for Magnetic Resonance for Biological System UMR 5536, CNRS, University of Bordeaux 146 rue Léo Saignat, 33076, Bordeaux, France. <sup>6</sup>These authors contributed equally: Bérangère Dessane, Rawen Smirani and Guillaume Bouguéon. \*email: philippe.barthelemy@inserm.fr

conditions preventing the printing process (e.g., pure gelatine presenting low viscosity at 37 °C<sup>18</sup>) and issues with long-term *in vivo* implantation (e.g., chitosan dissociating quickly at neutral pH<sup>19</sup>), as well as variability of sample properties from one batch to another (such as collagen<sup>20</sup>).

A major challenge in this field remains the development of bioinks and BmIs<sup>21,22</sup> that satisfy both the physicochemical and biological requirements. Regarding mechanical properties, BmIs should form microstructures mimicking the cell's native environment. In addition, bioink stiffness and porosity should be similar to the natural extracellular matrix to support cell growth and proliferation. These inks also have to exhibit shear-thinning behaviours to limit cellular stress resulting from the printing process<sup>23</sup>. More importantly, a bioink must neither be cytotoxic nor induce an immune or inflammatory response. In addition, if a bioink exhibits the capacity to be formulated in cell culture medium, it would be an advantage to ensure cell survival<sup>24,25</sup>.

Most of the synthetic or natural polymeric materials developed do not fully satisfy all the fundamental requirements for biofabrication at once, including both biological and physicochemical properties<sup>26</sup>. Despite the polymer-based materials reported so far, it remains challenging to develop a biocompatible material that can be printed under physiological conditions. A few studies have investigated non-polymeric supramolecular materials as potential BmIs or bioinks<sup>27</sup>. In this context, we hypothesised that low molecular weight gelators (LMWGs) could lead to non-toxic nucleotide lipid-based hydrogels suitable for biofabrication applications. As a supramolecular strategy involving biomolecules, this approach aims at developing biocompatible hydrogels under mild conditions<sup>28</sup>. Among LMWGs, bioinspired amphiphiles such as nucleotide lipids (NLs) and glycosyl-nucleoside lipids (GNLs) display interesting properties due to their chemical structure<sup>28–31</sup>. Composed of natural moieties such as nucleosides/nucleotides, sugars and aliphatic chains, these low molecular weight systems exhibit good biocompatibility, biostability and biodegradability. Their physical properties vary reversibly depending on conditions or stimuli (e.g., temperature<sup>32</sup>). Additionally, nucleotide lipid-based hydrogels formed by LMWGs<sup>33,34</sup> represent a promising tool in biomedical applications since they display self-assembly abilities<sup>35</sup> in complex aqueous media. The dynamic fibre networks in nucleotide lipid-based hydrogels provide soft scaffolds that mimic the extracellular matrix. Indeed, nucleotide lipid-based hydrogels are ideal physical gels because they possess the elastic behaviour of solids combined with the microviscous properties of fluids.

As a proof of concept, we demonstrated that a nucleotide lipid-based hydrogel could be used as a novel BmI or bioink for biofabrication. We have studied the physicochemical and biological properties of a bioconjugate<sup>28,31</sup>, including its rheological properties, printability in a culture medium, cell viability and *in vivo* tolerance.

## Materials and Methods

**Nucleotide lipid biomaterial ink formulation.** The amphiphilic thymidine-based nucleotide lipid bioconjugate diC<sub>16</sub>dT reported in this study was synthesised by our team<sup>28,30,31</sup>, and hydrogel formulations were adapted from our previous studies.

Briefly, the synthesis of NLs containing a thymidine head group and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol phosphate (diC<sub>16</sub>dT) is a direct synthesis achieved in a few steps starting from commercially available 5'-O-DMT-thymidine 3'-CE phosphoramidite. A standard synthetic procedure routinely used in oligonucleotide synthesis *via* phosphoramidite chemistry provides the thymidine-based NL in high yield<sup>36</sup>.

Regarding gel formation assays, diC<sub>16</sub>dT powder was dispersed in 0.9% sodium chloride aqueous solution (Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Germany) or DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) with low glucose, GlutaMAX™ and pyruvate Gibco® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) at 3% or 4% (w/v) concentration.

As diC<sub>16</sub>dT is counter-cation dependent to form a gel<sup>29</sup>, it was prepared in 0.9% sodium chloride aqueous solution as a reference and in culture medium (DMEM) or DMEM enriched with sodium chloride. The ratio between culture medium and 0.9% sodium chloride aqueous solution was optimised to induce gel formation in the culture medium. By convention, the latter solution is named DMEM@+ in this manuscript. The osmolarity of DMEM@+ solution was controlled with a Type 15 osmometer (Fisher Scientific SAS, Illkirch Graffenstaden, France) to ensure its cell compatibility.

The samples were heated at 55 °C and stirred at 1000 rpm simultaneously for 30 minutes and then allowed to cool to room temperature. To determine the gel formation, all samples were turned upside-down; no flow under its own weight indicates stabilisation of the gel.

**Nucleotide lipid biomaterial ink characterisation.** *Determination of biomaterial ink mechanical properties by rheology.* Rheological experiments were performed using a Malvern Kinexus Pro+ rheometer (Malvern Instrument SA, Worcestershire, United Kingdom) with a steel cone-plate geometry (diameter: 20 mm; angle: 1°). A solvent trap was used to prevent solvent evaporation and control the temperature. The lower plate was equipped with a Peltier temperature control system. Samples were studied at ambient (25 ± 0.01 °C) and physiological (37 ± 0.01 °C) temperatures.

Materials were placed in a low geometry under their gel state using a plastic spatula and allowed to rest 30 minutes before any experiment. All measurements were carried out within the linear viscoelastic regime (LVR), which was determined by amplitude strain sweeps from 0.01 to 100% deformation at an angular frequency of 1 Hz (6.283 rad/s). Elastic (also called storage modulus) ( $G'$ ) and viscous (also called loss modulus) ( $G''$ ) moduli were studied using a frequency sweep test ranging from 0.1 Hz to 10 Hz, and values were selected at 1 Hz.

To determine the transition temperature (Tsol-gel), a single-frequency stress-controlled temperature ramp was performed. This sol-gel transition temperature was determined at a 1 Hz frequency and a 1 Pa strain. The ramp ranged from 25 to 90 °C (heating rate of 2 °C/min).

Thixotropy was assessed by subjecting gels to low/high strain cycles. The gel was first subjected to a low strain (0.1%, into its LVR) for 10 minutes. Then, the sample was suddenly subjected to a higher strain (15%, beyond its

LVR) for 2 minutes. Finally, the strain returned to the first step value (0.1%, into its LVR) until full recovery of the initial properties.

**Biomaterial ink morphology.** Transmission electron microscopy (TEM) experiments were performed with a Hitachi H7650 microscope (Hitachi Ltd., Chiyoda, Tokyo, Japan) linked to an ORIUS SC1000 11MPX (GATAN, Pleasanton, USA) camera run by Digital Micrograph software (GATAN). Material ink samples (10  $\mu$ L) were placed on carbon-coated copper grids at room temperature. The excess was removed, and the samples were dried for 10 minutes. Before TEM imaging, grids were negatively stained using Uranyl-Less solution (Delta Microscopies, Mauressac France).

**Qualitative analysis of biomaterial printability.** Biomaterial ink was first tested using a simple extrusion test with a syringe and thin needles (18 and 22 gauge). Briefly, BmI was prepared as described above and loaded in a syringe while liquid. After complete gelation, it was extruded with a syringe pump (Razel Scientific Instrument, Fairfax, USA) at a 4  $\mu$ L/s flow rate, which is similar to the bioprinter flow rate.

**Extrusion-based bioprinter.** The Multiprint bioprinter used was a mechanical extrusion-based 3D printer designed by the Fablab Coh@bit (Technological University Institute of Bordeaux – IUT, Gradignan, France). Straight and non-bevelled Luer-lock needles of 18 and 22 gauge were employed. Computer-aided designs (CADs) were created with SketchUp software<sup>®</sup> (Trimble Inc., Sunnyvale, CA, USA). Multiprint was linked to BioPrinter<sup>®</sup> software, and one printing template was used: a lattice with 10 mm strands, 3 m inter-strand space and 2  $\times$  2 mm<sup>2</sup> pores (see Supplementary Fig. S1). Each layer of the lattice was composed of approximately 100  $\mu$ L of hydrogel. Successful constructs had to possess at least 3 layers. The Bioprinter<sup>®</sup> software allowed adjustment of theoretical extrusion parameters (syringe volume, needle internal diameter and layer height) as well as real-time control to adapt ink extrusion during printing. The real-time parameter called the “extrusion coefficient” was expressed as a percentage.

**Lattice characterisation.** Five three-layer lattices were printed using Multiprint and the 3% diC<sub>16</sub>dT-DMEM<sup>®</sup> + BmI in a six-well plate (one lattice per well). Whole lattices were then observed using a modular stereo microscope (MZ10F, Leica Microsystems, Germany) coupled with a Leica Application suite (V4.9.0, Leica Microsystems, Germany) at a magnification of  $\times$ 0.8. The distance between the vertical and horizontal strands of each lattice (see Supplementary Fig. S1) was determined using ImageJ software (1.52o, National Institute of Health, USA, Java 1.8.0\_112). Lattices were also observed with a manual inverted microscope (DMI 3000B, Leica microsystems, Germany) coupled with the Leica Application Suite software (V3.8.0, Leica Microsystems, Germany) at a magnification of  $\times$ 2.5. Surfaces of the upper and lower layers of each pore were then determined with the Leica software.

Lattice porosity ( $P_t$ , expressed as a percentage) was calculated using the formula F1, where  $V_p$  (mm<sup>3</sup>) represents the measured pore volume and  $V_t$  (mm<sup>3</sup>) represents the theoretical pore volume. Pores of a rather spherical shape were assimilated to truncated cones, and the F2 formula was used to determine their volumes ( $V_p$ ) ( $h$  is the height of the lattice (mm), and  $R_1$  and  $R_2$  are the radius of the upper and lower layer, respectively (mm)) (see Supplementary Fig. S2). The theoretical pore volume  $V_t$  (mm<sup>3</sup>) with a parallelepiped form was calculated using the F3 formula ( $h$  is the height of the lattice (mm),  $L$  is the length (mm) and  $l$  is the width (mm) of the pore). The lattice was placed on a microscope slide, and the height was measured using a numerical calliper (Halmart RS PRO, 150 mm, 841–2518) with a precision of 10  $\mu$ m. Finally, statistical analysis was performed on these data (described in the statistical section below).

$$F1: P_t = \frac{V_p}{V_t} \times 100$$

$$F2: V_p = h \times \frac{\pi}{3} \times (R_1^2 + R_2^2 + R_1 \times R_2)$$

$$F3: V_t = h \times L \times l$$

**Cell isolation and culture.** Human gingival fibroblasts (HGFs) and stem cells from the apical papilla (SCAPs) were isolated from patients who underwent surgery at the University Hospital of Bordeaux (CHU de Bordeaux). All patients gave their informed oral consent according to the 1975 Declaration of Helsinki and denied having recently taken drugs that could affect connective tissue metabolism. Protocols were approved by the institutional committee for the protection of human subjects (Local Ethics Committee from academic hospital CHU de Bordeaux) and under the declaration for conservation and preparation of human body elements for scientific research number DC 2008–412 (French ministry of higher education, research and innovation).

**Fibroblast isolation procedure.** Gum surgical wastes were collected during surgery from healthy non-smoking patients with no history of periodontitis ( $n = 4$ ). The epithelium was removed, and the remaining connective tissue was cut into small fragments, transferred and cultivated in cell culture flasks (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in DMEM completed with 20% foetal calf serum (FCS), 100 UI/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 2.5  $\mu$ g/ml amphotericin B (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The medium was changed every 3 days. After the first passage, HGFs were grown in DMEM and 10% FCS and used from passages 3 to 5.

**SCAP isolation procedure.** Freshly extracted third molars were stored in minimum essential medium alpha (alpha-MEM) supplemented with 20% FCS and penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 µg/ml) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Briefly, dental apical papillae were digested in a mixture of 3 mg/ml collagenase and 4 mg/ml dispase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for one hour at 37 °C. The resulting cell suspension was filtered and cultivated in culture flasks (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). The medium was changed every two days until the cells reached confluence. After the first passage, SCAPs were grown in alpha-MEM, 10% FCS and used from passages 3 to 7.

**Cell-laden hydrogel lattice preparation.** *Bioink preparation.* For the bioink preparation (i.e., cell-laden hydrogel), HGFs or SCAPs were mixed with 3% diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI and placed in a 2 ml glass syringe; 3% diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI was synthesised as previously reported. Briefly, either HGFs or SCAPs were trypsinised, counted, centrifuged and re-suspended in BmI to obtain a bioink concentration of 1.10<sup>6</sup> cells/ml. The BmI was previously heated to 39 °C to make it more liquid to ease cell re-suspension and obtain homogenous bioinks.

*Lattice 3D printing.* Three- to five-layer lattices were printed in 6-well plates with the bioinks as previously reported (one lattice per well). The obtained lattices (n = 10 HGF bioink; n = 10 SCAP bioink) were used for *in vitro* experiments.

HGF lattices and SCAP lattices were incubated in DMEM, 10% FCS, and 1% PenStrep and in alpha-MEM, 10% FCS, and 1% PenStrep, respectively. The medium was changed every three days.

**In vitro experiments.** *Live-dead staining.* A Live/Dead<sup>®</sup> assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was performed on lattices at Day 1, 7 and 14 according to the manufacturer's instructions. In living cells, the non-fluorescent substrate acetoxymethyl calcein (AMC) was cleaved into green fluorescent calcein by an intracellular esterase. Dead cells, whose membranes were compromised, allowed entry of the intercalating agent ethidium homodimer-1 (EDT-1), amplifying red fluorescence.

Samples were observed by confocal laser scanning microscopy (TCS SPE, CTR 6500, Leica, Wetzlar, Germany). Images were taken. The number of living and dead cells was counted from three images per sample. Cell viability was reported as a percentage with the following formula: the number of living cells/total number of cells.

*Alamar blue assay.* An Alamar Blue<sup>®</sup> assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was performed to assess cellular activity at Day 1, 7 and 14. Alamar Blue<sup>®</sup> reagent is a cellular health indicator that uses the reducing power of living cells to quantitatively measure the spread of multilineage cells.

At each time point, three HGF and three SCAP lattices were incubated with Alamar Blue<sup>®</sup> reagent (resazurin) at 10% in culture medium for 2,5 hours at 37 °C. BmI lattices (without cells) were used as controls. Media were transferred to a new plaque, and absorbance was measured at 590 nm using a spectrometer (2030 Multilabel Reader VICTOR X3; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) connected to WorkOut<sup>®</sup> EU software. The results were reported as the mean fluorescence ± standard deviation (SD) of three independent samples. After the test, bioink lattices and BmI lattices were washed twice, returned to medium and used for the following days. The medium was changed every three days.

**In vivo experiments.** *Animals.* Protocols were based on the principles of Laboratory Animal Care of the National Society for Medical Research and approved by the Animal Care and Experiment Committee of the University of Bordeaux, France (Ref. 201701051243776-V2 APAFIS#8442). Experiments were performed following European recommendations for laboratory animal care (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments). Four eight-week-old C57BL/6 female mice (Charles Rivers, France) were used for this study. Mice were anaesthetised with 4.5% isoflurane gas via an induction chamber and maintained throughout surgery with 2.5% isoflurane by using a facemask.

*Subcutaneous injection.* The surgical site was prepared by shaving, and the exposed skin was disinfected with betadine. On each of the four mice, two 500 µl BmI preparations were injected subcutaneously using a 1 ml syringe with an 18-gauge needle (Terumo Europe, Belgium). Each mouse received two bilateral injections.

*Magnetic resonance imaging.* Experiments were performed on a 7 T Bruker BioSpec system equipped with a gradient coil of 660 mT.m<sup>-1</sup> maximum strength and 110 µs rise time. A volume resonator operating in quadrature mode was used for excitation (75.4 mm inner diameter, 70 mm active length), and a proton phased array (RAPID Biomedical GmbH) was used for signal reception (4 elements of 30 mm long around an elliptical cylinder housing: 19 × 25.5 mm).

A water-selective balanced steady-state free precession (WS-bSSFP) sequence was applied to image mouse abdomens and then measure BmI volumes over time. The following parameters were used: field-of-view (FOV): 25 × 22 × 20 mm, spatial resolution: 195 × 172 × 156 µm, TE/TR = 2/4 ms, reception bandwidth (BW): 75 kHz, and flip angle: 30 me. The following parameters were used: field-of-view (FOV): 25 × 2. Acquisitions were performed on 1.5% isoflurane-anaesthetised mice on the day of the injection and on Days 3, 8, 11, 14, 17, 21 and 24 post-injection.

**Statistical analysis.** To handle reproducibility issues, experiments were performed in triplicate or more (n = 3). Rheological data were expressed as the mean ± SD. was used for all statistical analyses. Distribution normality was assessed with a Shapiro-Wilk test. Student's t-test (2-tailed) with Fisher variance testing was performed to determine differences between groups.

For lattice strand distance, a Shapiro-Wilk test was used to assess distribution normality. If the distribution was normal, then Levene variance testing was performed. Depending on the Levene result, differences between groups were determined either by an ANOVA test (2-tailed) or a Kruskal-Wallis test (2-tailed). If the distribution was not normal, Kruskal-Wallis testing (2-tailed) was automatically performed.

Three tools were used to obtain results: XLstat® (Addinsoft, Paris, France) software, AnaStats website (<http://www.anastats.fr/>) and Astatsa website (<https://astatsa.com/>). Significance was set at  $\alpha < 0.05$ .

For the Kruskal-Wallis test,  $H$  corresponded to the observed value, and  $c\alpha$  was the critical value; the test was significant when  $H > c\alpha$ . For ANOVA testing, a significant difference was set at  $p < 0.05$ , where  $p$  was the observed value.

## Results and Discussion

**Nucleotide lipid biomaterial ink formulation.** The selected bioconjugate molecule corresponds to an anionic thymidine-based NL bearing 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol phosphate as a lipid chain (Fig. 1A). Based on primary investigations, gel formation from this molecule in 0.9% sodium chloride aqueous solution was performed using the same protocol as previously described<sup>28,30,31</sup>. Identical formulation steps were applied in the case of culture medium DMEM.

Gel formation of diC<sub>16</sub>dT in 0.9% sodium chloride aqueous solution fully succeeded after heating (Fig. 1B 1) and 2)), but no gelation was observed in DMEM using the same protocol (Fig. 1B 3)). The sodium chloride content in DMEM (6.4 g/L) was insufficient to allow gelation. To successfully obtain a gel in the culture medium (Fig. 1B 4) and 5)), DMEM and 0.9% sodium chloride aqueous solution were mixed at an optimum ratio of 70/30% v/v (DMEM@+), giving a final NaCl concentration of 123.5 mM in the DMEM. The DMEM@+ osmolarity was measured at  $311.5 \pm 0.7$  mOsm/l, allowing cell culture experiments and potential implantation *in vivo*. The 3% diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI was observed by TEM imaging and showed a set of fibres with a thickness varying between 50 and 100 µm (Fig. 1C 1) and 2)) as previously observed in 0.9% NaCl<sup>28</sup>.

**Nucleotide lipid biomaterial ink characterisation.** *Rheological properties in culture medium.* All measurements were carried out within the linear viscoelastic regime (LVR) (Fig. 1D 1)) at 0.1% deformation. In comparison to the 3% (w/v) diC<sub>16</sub>dT hydrogel prepared with 0.9% sodium chloride solution, the 3% (w/v) diC<sub>16</sub>dT hydrogel formed in culture medium (diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI) weakened the BmI's viscoelastic properties significantly ( $p = 0.002$ ), as shown in Table 1, with a shear modulus  $G'$  of 0.3 kPa in culture medium in comparison to ~2 kPa in sodium chloride solution. When the BmI was extruded,  $G'$  and  $G''$  subsequently weakened for both conditions at 25 °C. Nevertheless, extrusion did not prevent the BmI from returning to its initial gel state and successfully completing the inversion test. When the temperature was increased to 37 °C,  $G'$  and  $G''$  were increased in DMEM@+, with values of  $675 \pm 4.17$  and  $340 \pm 2.30$  Pa before extrusion, respectively. Similar to that at 25 °C,  $G'$  and  $G''$  decreased after extrusion at 37 °C, with values of  $153 \pm 5$  and  $53 \pm 6$  Pa, respectively.

The BmI also formed at higher diC<sub>16</sub>dT concentrations, i.e., 4% (Fig. 1B. 5)). As expected, the moduli increased simultaneously with the diC<sub>16</sub>dT concentration (see Table 1); at 4% diC<sub>16</sub>dT,  $G'$  and  $G''$  increased to 2 kPa and 0.7 kPa, respectively, before extrusion and to 1.4 kPa and 0.5 kPa after extrusion at 25 °C. At physiological temperature, BmI's viscoelastic properties were reinforced before and after extrusion, as shown by the moduli  $G'$  and  $G''$  increasing beyond 2 kPa. Therefore, increasing the hydrogel strength could be useful to reinforce 3D-printed constructions. However, an increase in extracellular matrix stiffness can affect cell development and differentiation<sup>37–39</sup>. For example, stem cell differentiation either into neuron-like cells or into muscles is respectively modulated by stiffness values of the environment with low (0.1–1 kPa) and intermediate stiffness (8–17 kPa)<sup>40</sup>. For buccal mucosa HGF development, an equilibrium development was reached at a stiffness of 2 kPa<sup>41</sup>. Consequently, we decided to maintain the concentration at 3% diC<sub>16</sub>dT for the rest of our experiments.

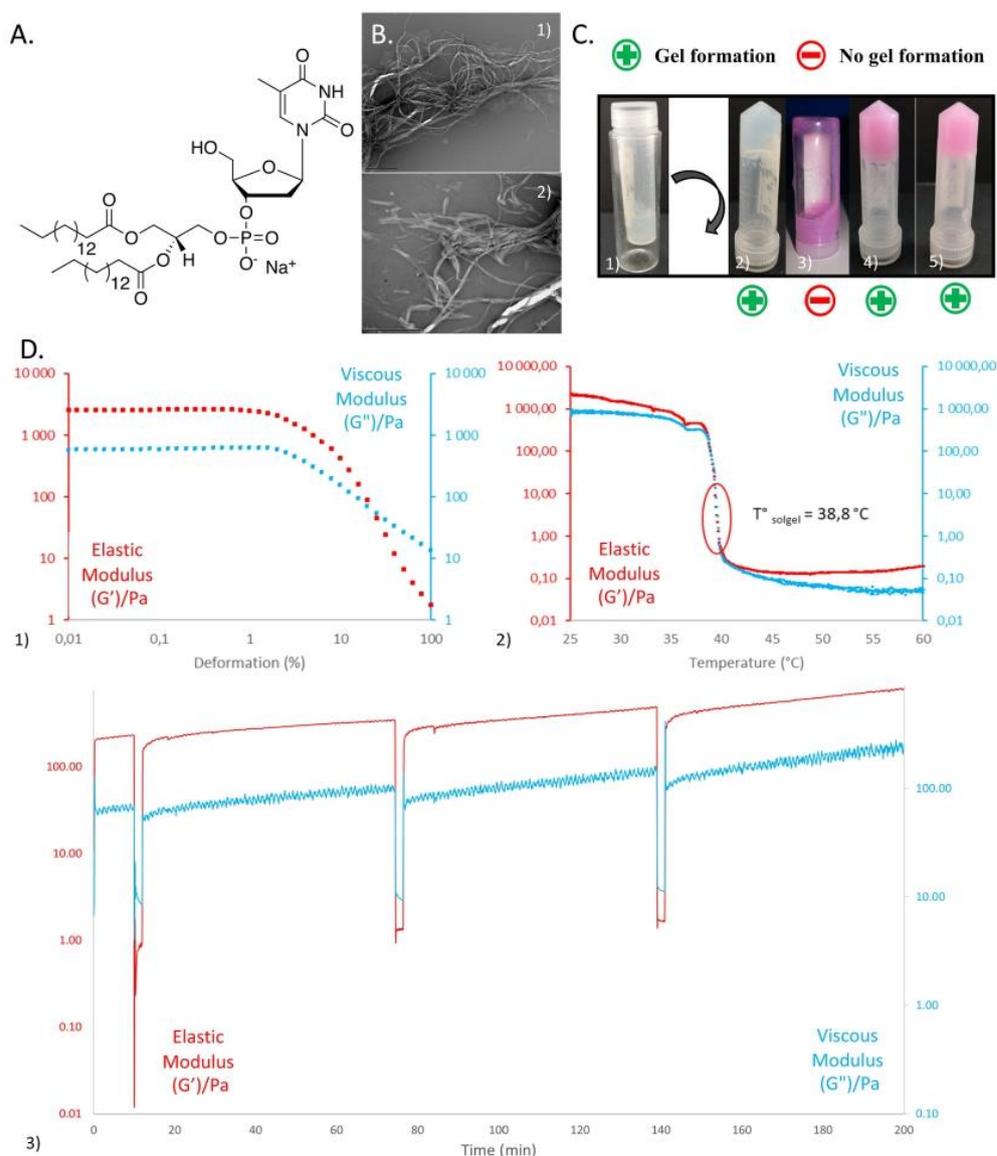
Similar to that in the literature<sup>28,30</sup>, the 3% diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI transition temperature ( $T_{sol-gel}$ ) is approximately 40 °C (Fig. 1D 2)). This  $T_{sol-gel}$  in culture medium DMEM@+ allowed the addition of living cells for bioprinting purposes.

For biomedical use, thixotropy<sup>42,43</sup> is a valuable tool allowing injectability and avoiding flap surgery for *in vivo* implantation (e.g., subcutaneous injection in mice<sup>28,30</sup>). This property makes crosslinker-free hydrogels interesting tools for bioprinting relative to natural or synthetic polymers, which often require an external polymerising agent. The diC<sub>16</sub>dT BmI exhibited thixotropic properties in 0.9% sodium chloride aqueous solution<sup>28,30</sup>. Our results showed that thixotropic properties were maintained in the culture medium DMEM@+ (Fig. 1D 3)) and at 37 °C. Moreover, the return to its initial gel state was almost immediate (1–2 minutes), confirming that 3% diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI is a good potential candidate for biofabrication and future implantation.

**3D extrusion-based printing.** Before using the Multiprint, BmI printability was evaluated by manual syringe pump extrusion. diC<sub>16</sub>dT was tested either in 0.9% sodium chloride aqueous solution or in DMEM@+. Both inks gained back a gel solid-like shape after extrusion.

After this first step, diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI was printed using the Multiprint into a lattice matrix (Fig. 2A and movie). The lattice is a commonly used matrix in EBB, as it shows perfect compatibility with cell proliferation<sup>5,44–46</sup>. It was shown that cell growth is enhanced by pores, allowing a greater exchange surface between cells and culture medium. A pause of 2 minutes was taken between the extrusion of each layer to allow enough time for the hydrogel reconstruction and prevent lattice collapse. The extrusion coefficient was increased to counterbalance the higher viscosity of the diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI compared to that of the diC<sub>16</sub>dT hydrogel formed in 0.9% sodium chloride aqueous solution.

The successful printability of diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI was related to its rheological properties<sup>18,47</sup>, including shear thinning capacity and thixotropic properties, as previously highlighted. Printed lattices maintained their shape during the printing step and furthermore showed some flexibility (Fig. 2B).

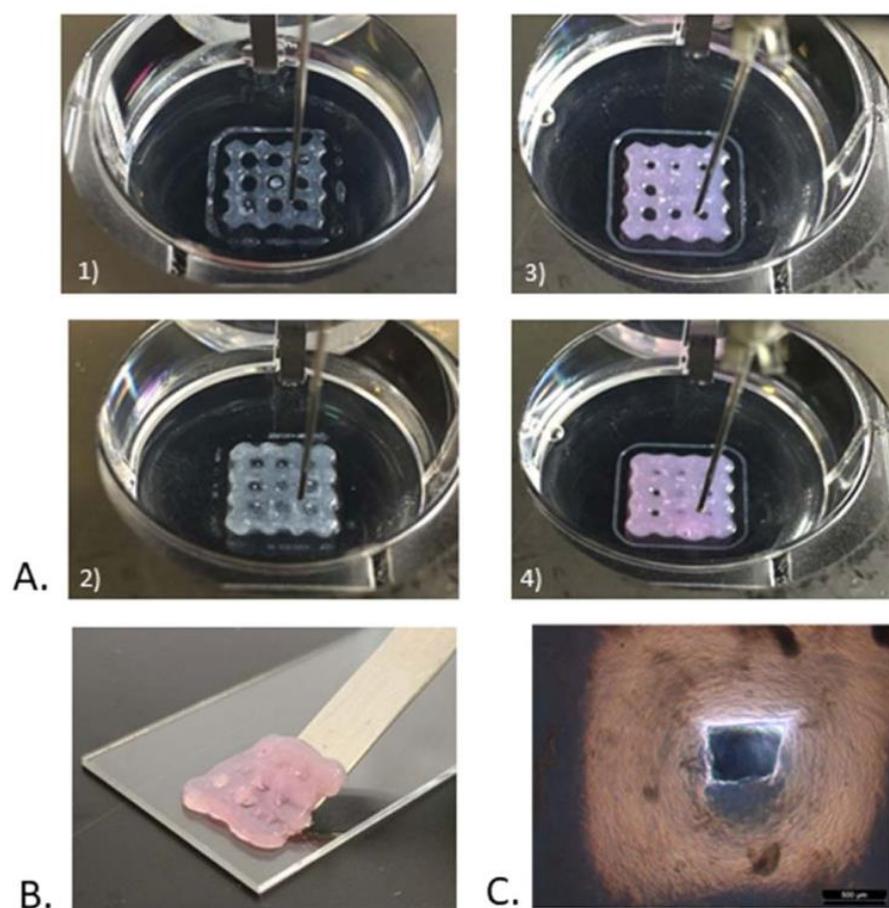


**Figure 1.** Biomolecular ink formulation and characterisation. **(A)** Chemical structure of low molecular weight hydrogelator thymidine head and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol phosphate lipid chain diC<sub>16</sub>dT nucleotide lipid. **(B)** Inversion test to evaluate hydrogel gelation: 1) diC<sub>16</sub>dT at 3% (w/v) in 0.9% NaCl aqueous solution before and after reversal, respectively; 2) diC<sub>16</sub>dT at 3% (w/v) in DMEM; 3) diC<sub>16</sub>dT at 3% (w/v) in DMEM@+; 4) diC<sub>16</sub>dT at 3% (w/v) in culture medium DMEM@+, 5) diC<sub>16</sub>dT at 4% (w/v) in DMEM@+. **(C)** TEM images of diC<sub>16</sub>dT hydrogel (3% (w/v)) in culture medium (DMEM 123.5 mM NaCl final concentration): 1) scale of 2 μm length; 2) scale of 1 μm length. **(D)** Rheological results of diC<sub>16</sub>dT at 3% (w/v) in culture medium (DMEM@+): 1) Linear viscoelastic regime at 25 °C, 2) Transition temperature between 25 °C and 60 °C, 3) Step-strain experiment at 25 °C at a fixed angular frequency (6.283 rad/s). The gel was swept from 0.1% to 15% and then back to 0.1% strain. Key: DMEM@+ (DMEM containing NaCl 123.5 mM final concentration).

Lattice characterisation was performed using microscopy imaging (Fig. 2C), which showed that the structures printed using diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI were replicable. Indeed, the distances between each vertical and horizontal strand were statistically similar from one lattice to another (Kruskal-Wallis:  $H 3,83 < c_{\alpha} 9,49$ ), with an average of  $2,98 \pm 0,14$  mm and a theoretical distance of 3 mm (see data in Supplementary Table S1). The volume distribution of the 9 pores measured for each lattice and porosity was similar from one construction to another (ANOVA:  $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis:  $H 4 < c_{\alpha} 9,49$ , respectively). The average pore volume was  $1,63 \pm 0,46$  mm<sup>3</sup> (theoretical volume 4,62 mm<sup>3</sup>), and the lattice total porosity (total pore volume/total lattice volume) was  $8,61 \pm 2,29\%$  (theoretical porosity of 36%) (see all data in Supplementary Table S2). Except for one pore, the dimensions and porosity were maintained throughout all printed structures, showing the reproducibility of construction

diC <sub>16</sub> dT 3%	Before extrusion		After extrusion	
Temperature	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
G' (Pa)	362 ± 176 (1945 ± 549)*	675 ± 417	302 ± 230 (576 ± 171)*	153 ± 5
G'' (Pa)	269 ± 144 (732 ± 200)*	340 ± 230	116 ± 29 (289 ± 105)*	53 ± 6
diC <sub>16</sub> dT 4%	Before extrusion		After extrusion	
Temperature	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
G' (Pa)	2033 ± 181	3009 ± 773	1463 ± 567	2039 ± 398
G'' (Pa)	742 ± 52	1356 ± 220	498 ± 177	640 ± 95

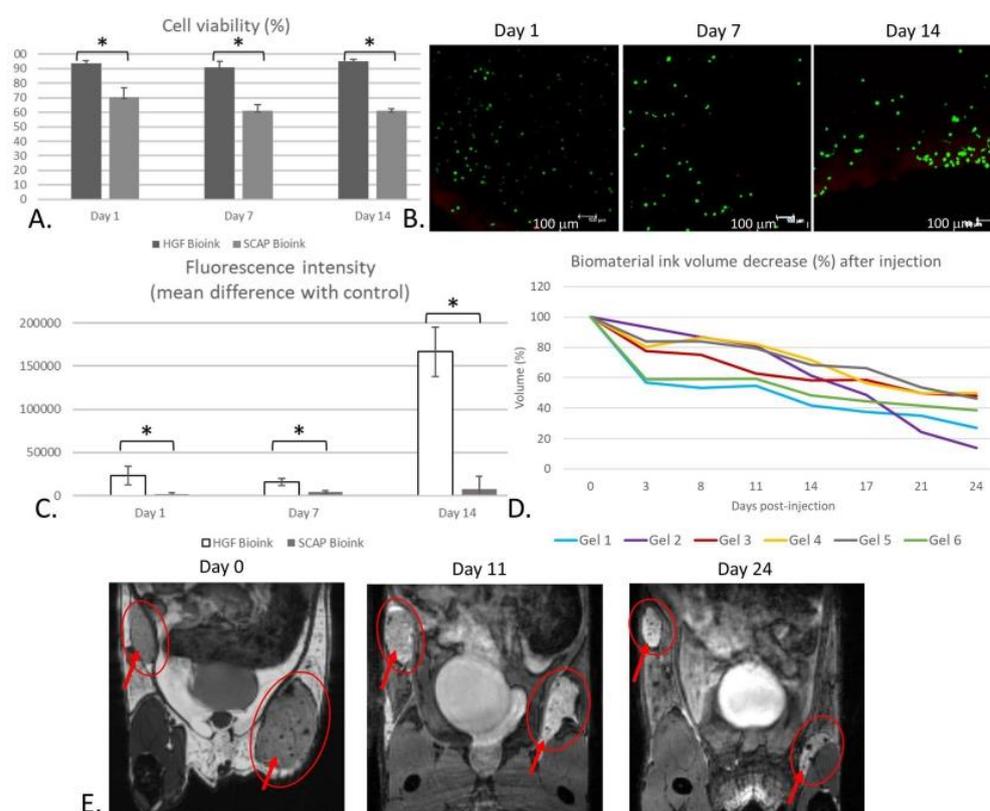
**Table 1.** Comparative shear moduli (G' and G'') of diC<sub>16</sub>dT 3%- and 4%-based biomaterial ink in 0.9% NaCl or culture medium (DMEM@+) at 25 °C and 37 °C. (\*) diC<sub>16</sub>dT 3% based biomaterial ink G' and G'' in 0.9% NaCl.



**Figure 2.** Biomolecular ink printability. (A) Bioprinted lattices of diC<sub>16</sub>dT hydrogel in 0.9% NaCl aqueous solution, 1) 1 printed layer 2) 5 printed layers; and in culture medium (DMEM@+) 3) 1 printed layer, 4) 5 printed layers. (B) Bioprinted lattice of diC<sub>16</sub>dT at 3% (w/v) in culture medium (DMEM@+) showing some flexibility. (C) Optical microscopy images of bioprinted lattice pores of diC<sub>16</sub>dT at 3% (w/v) in culture medium (DMEM@+). Magnification x2.5 (scale bars: 500 μm). Key: DMEM @+ (DMEM containing NaCl 123.5 mM final concentration).

performed with the diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI. These results appear favourable to the development and cellular growth for the manipulations incorporating cells within the BmI.

**Nucleotide lipid bioink formulation and *in vitro* cellular assays.** The incorporation of cells into the 3% diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI was easily performed by heating the hydrogel. Syringes were loaded with the



**Figure 3.** *In vitro* characterisation of bioprinted lattices and *in vivo* injection of diC<sub>16</sub>dT 3% DMEM@+ biomaterial ink. Evaluation of the cellular response of HGFs and SCAPs within lattices made by HGF and SCAP bioinks, respectively. (A) Viability percentage (\**p* < 0,05; *n* = 3). (B) Live/Dead staining of HGF proliferation in a lattice on days 1, 7 and 14. (C) Alamar Blue assay of lattices cultured for 1, 7 and 14 days (\**p* < 0,05, *n* = 3). Control was a lattice without cells. (D) Representation of injected diC<sub>16</sub>dT DMEM@+ biomaterial ink volume (reported in %) according to time. (E) Follow-up of two injections of diC<sub>16</sub>dT 3% biomaterial ink in a mouse at D0, D11 and D24. Key: DMEM@+ (DMEM containing NaCl 123.5 mM final concentration).

obtained bioink, and the latter quickly returned to its gel state. Bioink incorporating either HGFs or SCAPs was easily extruded and successfully bioprinted into lattices.

***In vitro* cell assays.** The viability of HGFs and SCAPs bioprinted in lattices is shown in Fig. 3A. Our results suggested that the printing process and hydrogel have low cytotoxic effects on HGFs but slightly more cytotoxicity on SCAPs. At Day 1, the SCAPs viability percentage was already lower than the HGF viability (70,5% versus 93,5%, respectively) (\**p* < 0,05; *n* = 3) (Fig. 3A). It is in accordance with previous studies showing that HGFs and SCAPs were resistant to shear stress and pressure during extrusion printing<sup>48–50</sup>. Moreover, SCAPs viability decreased while HGF viability remained high over time (Fig. 3A). These lower results concerning SCAPs could be explained by the fact that they are stem cells and are consequently more fragile than fibroblasts, complicating their ability to survive especially in the centre of lattices. Confocal microscopy observations with Live/Dead staining showed morphological changes (Fig. 3B). At Day 1, cells were round as a consequence of the recent cell encapsulation in the hydrogel (Fig. 3B). SCAPs and HGFs started to spread at Day 7, while some HGFs returned to their characteristic spindle shape (i.e., their normal shape in 2D culture) on Day 14 (Fig. 3B). The cell viability measures associated with cell observation enabled a clear understanding of this phenomenon, showing that the cells recovered as if they were cultured in flasks. All these results showed that cells, despite being totally encapsulated inside the gel and undergoing shear stress from bioprinting, were able to survive within the lattice for more than 21 days (see Supplementary Fig. S3). The Alamar Blue<sup>®</sup> assay, performed in triplicate for each time, showed a progressive increase in cellular activity (Fig. 3C). The HGF lattice fluorescence intensity when normalised to the control (i.e., lattice with the biomaterial ink only) displayed more than a three-fold increase at Day 14 when compared to Day 1 (Fig. 3C). The fluorescence of SCAP lattices was increased as well but at lower rates, which is in accordance with the decreased viability. Taken together, these results showed the cell compatibility of the diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI, showing that this material provided enough porosity for oxygen and nutrients to reach cells despite the lattice thickness but not sufficient for long time culture. A bioreactor could be used to mimic the *in vivo* condition and increase follow-up time. Another solution could be to implement capillaries inside the construct prior to implantation. However, the results were slightly less obvious for stem cells. All results were statistically significant

( $p < 0.05$ ). Progressive spreading and proliferation of cells within the gel could be due to modifications in viscoelastic properties after cell incorporation. These modifications were previously described for alginate, gelatine methacrylate and agarose hydrogels<sup>51–53</sup>. Indeed, long-term variations of construct properties were mainly due to cell proliferation and migration, leading to hydrogel matrix remodelling. Overall, the printing results are promising and will be improved by other studies, with varying ratios, growth factors, structural proteins or nutrients.

***In vivo nucleotide lipid biomaterial ink biodegradability.*** Previous histological studies have been performed in our lab and showed that diC<sub>16</sub>dT hydrogels formed in 0.9% sodium chloride aqueous solution demonstrated minimal inflammation and fibrosis<sup>28</sup>. To study the impact of bioprinting process on gel structure and the *in vivo* behaviour, we decided to perform a MRI follow up. Out of the eight diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI injections in mice, two could not be followed (non-subcutaneous injection) at D0. The WS-bSSFP MRI sequence<sup>54</sup> was used to follow up the remaining six samples. After subcutaneous injection, a 20 to 40% decrease in volume was observed in D3, followed by a gradual decrease until 50–85% of the initial volume at D24 (Fig. 3D,E). Statistical analysis performed on BmI percentage degradation reported a comparable degradation from one gel to another (Kruskal-Wallis:  $H_{5} < c_{\alpha} 11,0705$ ) (see Supplementary Tables S3 and S4). No diffusion in other tissues was observed. Moreover, no evidence of inflammation was detected in all mice during monitoring, showing *in vivo* tolerance. It was voluntarily decided to study injectable implantation instead of flap surgery to limit inflammation linked to the procedure and compared this experiment to previous results. As a first step for *in vivo* evaluation, this experiment supported the evidence that a diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ BmI is biodegradable and revealed the diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ formulation to be compatible for future graft implantation. Further studies will be performed to determine the *in vivo* behaviour of bioprinted cellularized lattices.

## Conclusion

We have reported a novel nucleotide lipid-based material featuring suitable mechanical and biological properties for different biofabrication applications, including injection and 3D bioprinting. To our knowledge, this is the first example of materials using a nucleotide lipid-based LMWG hydrogel allowing (i) bioprinting under physiological conditions with culture medium and cells as well as (ii) good *in vivo* tolerance when injected subcutaneously. Physicochemical investigations performed on diC<sub>16</sub>dT gels solubilised in DMEM enriched with NaCl (DMEM@+) revealed that this molecule was able to stabilise a gel compatible with the survival and proliferation of human gingival fibroblasts and stem cells from apical papilla. Thus, the rheological properties of the 3% hydrogel showed interesting features for EBB, such as a Tsol-gel superior to 37°C, allowing cell culture and thixotropy to provide a biomaterial free of external crosslinkers. Furthermore, diC<sub>16</sub>dT-DMEM@+ displayed *in vivo* compatibility and gradual biodegradation over time. In conclusion, the results highlighted the workability, printability and biocompatibility of nucleotide lipid-based hydrogels, as bioprinted cells exhibit viability and proliferation. This preliminary study was designed as a starting point for a larger project concerning tissue engineering-based regeneration of connective tissue. Further studies will be performed in order to specify the *in vivo* behaviour of bioprinted and cellularised lattices.

*In fine*, the use of lipid self-assemblies stabilised by a nucleotide moiety could represent a powerful strategy for bioink engineering, opening a new route to produce crosslinker-free scaffolds suitable for different biofabrication applications. In the long term, this concept could be applied to any connective tissue reconstruction by changing the type of cells.

Received: 19 February 2019; Accepted: 20 January 2020;

Published online: 18 February 2020

## References

- Murphy, S. V. & Atala, A. 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 773–785 (2014).
- Pati, F., Gantelius, J. & Svahn, H. A. 3D Bioprinting of Tissue/Organ Models. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 4650–4665 (2016).
- Moroni, L. *et al.* Biofabrication strategies for 3D *in vitro* models and regenerative medicine. *Nat. Rev. Mater.* **3**, 21–37 (2018).
- Ong, C. S. *et al.* 3D bioprinting using stem cells. *Pediatr. Res.* **83**, 223–231 (2018).
- Ozolat, I. T. & Hospodiuk, M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials* **76**, 321–343 (2016).
- Bertlein, S. *et al.* Thiol–Ene Clickable Gelatin: A Platform Bioink for Multiple 3D Biofabrication Technologies. *Adv. Mater.* **29**, 1–6 (2017).
- Starly, B. & Shirwaiker, R. *Chapter 3 - 3D Bioprinting Techniques. 3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (Elsevier Inc., (2015).
- Yeong, W.-Y., Chua, C.-K., Leong, K.-F. & Chandrasekaran, M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends Biotechnol.* **22**, 643–652 (2004).
- Groll, J. *et al.* A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication* (2019).
- Tibbitt, M. W. & Anseth, K. S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 655–663 (2009).
- Landers, R., Hübner, U., Schmelzeisen, R. & Mülhaupt, R. Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials* **23**, 4437–4447 (2002).
- Gopinathan, J. & Noh, I. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomater. Res.* 1–15 (2018).
- Sarker, M. D. *et al.* Bioprinting Bio-fabrication of peptide-modified alginate scaffolds: Printability, mechanical stability and neurite outgrowth assessments. *Bioprinting* **14**, e00045 (2019).
- Li, C. *et al.* Controllable fabrication of hydroxybutyl chitosan/oxidized chondroitin sulfate hydrogels by 3D bioprinting technique for cartilage tissue engineering. *Biomed. Mater.* (2019).
- Moncal, K. K., Ozolat, V., Datta, P., Heo, D. N. & Ozolat, I. T. Thermally-controlled extrusion-based bioprinting of collagen. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (2019).
- Choi, D. J. *et al.* Effect of cross-linking on the dimensional stability and biocompatibility of a tailored 3D-bioprinted gelatin scaffold. *Int. J. Biol. Macromol.* **135**, 659–667 (2019).
- Bidarra, S. J., Barrias, C. C. & Granja, P. L. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomater.* **10**, 1646–1662 (2014).

18. He, Y. *et al.* Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. *Sci. Rep.* 1–13, <https://doi.org/10.1038/srep29977> (2016).
19. Panwar, A. & Tan, L. P. Current Status of Bioinks for Micro-Extrusion-Based 3D Bioprinting. *Molecules* (2016).
20. Antoine, E. E., Vlachos, P. P. & Rylander, M. N. Review of Collagen I Hydrogels for Bioengineered Tissue Microenvironments: Characterization of Mechanics, Structure, and Transport. *Tissue Eng. Part B Rev.* **20**, 683–696 (2014).
21. Li, Z. *et al.* Tuning Alginate-Gelatin Bioink Properties by Varying Solvent and Their Impact on Stem Cell Behavior. *Sci. Rep.* **8**, 1–8 (2018).
22. Pati, F. *et al.* Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat. Commun.* **5**, 1–11 (2014).
23. Blaeser, A. *et al.* Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Adv. Healthc. Mater.* (2015).
24. Skardal, A. & Atala, A. Biomaterials for Integration with 3-D Bioprinting. *Ann. Biomed. Eng.* **43**, 730–746 (2015).
25. Kiyozumi, T. *et al.* Medium (DMEM/F12)-Containing Chitosan Hydrogel as Adhesive and Dressing in Autologous Skin Grafts and Accelerator in the Healing. *Process. J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **83**, 340–344 (2005).
26. Malda, J. *et al.* 25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication. *Adv. Mater.* 5011–5028, <https://doi.org/10.1002/adma.201302042> (2013).
27. Liu, K. *et al.* Coordination-triggered hierarchical folate/zinc supramolecular hydrogels leading to printable biomaterials. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 4530–4539 (2018).
28. Ramin, M. A. *et al.* Cation Tuning of Supramolecular Gel Properties: A New Paradigm for Sustained Drug Delivery. *Adv. Mater.* **29**, 2–7 (2017).
29. Latxague, L., Patwa, A., Amigues, E. & Barthélémy, P. Glycosyl-nucleolipids as new bioinspired amphiphiles. *Molecules* **18**, 12241–12263 (2013).
30. Ramin, M. A., Latxague, L., Sindhu, K. R., Chassande, O. & Barthelemy, P. Low molecular weight hydrogels derived from urea based-bolaamphiphiles as new injectable biomaterials. *Biomaterials* 1–19, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.08.034> (2017).
31. Latxague, L. *et al.* Control of Stem-Cell Behavior by Fine Tuning the Supramolecular Assemblies of Low-Molecular-Weight Gelators. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54**, 4517–4521 (2015).
32. Steed, J. W. Supramolecular gel chemistry: developments over the last decade. *Chem. Commun.* **47**, 1379–1383 (2011).
33. Du, X., Zhou, J., Shi, J. & Xu, B. Supramolecular Hydrogelators and Hydrogels: From Soft Matter to Molecular Biomaterials. *Chem. Rev.* **115**, 13165–13307 (2015).
34. Estroff, L. A. & Hamilton, A. D. Water Gelation by Small Organic Molecules Water Gelation by Small Organic Molecules. *Chem. Rev.* **104**, 1201–1218 (2004).
35. Hennink, W. E. & van Nostrum, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 223–236 (2012).
36. Desbat, B. *et al.* Unexpected bilayer formation in langmuir films of nucleolipids. *Langmuir* **28**, 6816–6825 (2012).
37. Hadjipanayi, E., Mudera, V. & Brown, R. A. Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness. *J. tissue Eng. Regen. Med.* (2009).
38. Gamal, A. Y., Al-Berry, N. N., Hassan, A. A., Rashed, L. A. & Iacono, V. J. *In vitro* evaluation of the human gingival fibroblast/gingival mesenchymal stem cell dynamics through perforated guided tissue membranes: cell migration, proliferation and membrane stiffness assay. *J. Periodontol. Res.* **52**, 628–635 (2017).
39. Discher, D. E., Janmey, P. & Wang, Y. L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (80-)*. **310**, 1139–1143 (2005).
40. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).
41. Goktas, S., Dmytryk, J. J. & McFetridge, P. S. Biomechanical Behavior of Oral Soft Tissues. *J. Periodontol.* **82**, 1178–1186 (2011).
42. Guvendiren, M., Lu, H. D. & Burdick, J. A. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. *Soft Matter* **8**, 260–272 (2012).
43. Jungst, T., Smolan, W., Schacht, K., Scheibel, T. & Groll, J. Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. *Chem. Rev.* **116**, 1496–1539 (2016).
44. Lindsay, C. D., Roth, J. G., LeSavage, B. L. & Heilshom, S. C. Bioprinting of stem cell expansion lattices. *Acta Biomater.*, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.014> (2019).
45. Jia, J. *et al.* Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomater.* **10**, 4323–4331 (2014).
46. Duan, B., Hockaday, L. A., Kang, K. H. & Butcher, J. T. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* **101 A**, 1255–1264 (2013).
47. Zhang, Z. *et al.* Evaluation of bioink printability for bioprinting applications. *Applied* **041304** (2018).
48. Lee, V. *et al.* Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. *Tissue Eng. Part C Methods* **20**, 473–484 (2014).
49. Wang, L. L. *et al.* 3D extrusion bioprinting of single- and double-network hydrogels containing dynamic covalent crosslinks. *J. Biomed. Mater. Res.* 1–35 (2018).
50. Athirasala, A. *et al.* A dentin-derived hydrogel bioink for 3D bioprinting of cell laden scaffolds for regenerative dentistry. *Biofabrication* (2018).
51. Hölzl, K. *et al.* Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication* **8**, 032002 (2016).
52. Mauck, R. L., Wang, C. C. B., Oswald, E. S., Ateshian, G. A. & Hung, C. T. The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading. *Osteoarthr. Cartil.* **11**, 879–890 (2003).
53. Chang, S. C. N. *et al.* Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants. *J. Biomed. Mater. Res.* **55**, 503–511 (2001).
54. Ribot, E. J. *et al.* Water Selective Imaging and bSSFP Banding Artifact Correction in Humans and Small Animals at 3T and 7T, Respectively. *PLoS One* 1–16, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139249> (2015).

## Acknowledgements

This work has been supported by the Bordeaux Consortium of Regenerative Medicine. We would like to thank Sébastien Benizri from the ChemBioPharm team for helping us to perform TEM imaging and Murielle Rémy from the Biotis team for her support in confocal laser scanning microscopy imaging.

## Author contributions

P.B.S.C.-M. and R.D. conceived the study, designed the experiments, and critically interpreted the data. B.D., R.S. and G.B. equally contributed to the work and performed physicochemical characterisation and biological assays under daily supervision of A.N. and T.K. E.R. led the *in vivo* imaging monitoring. The manuscript was written by B.D., G.B., R.S., E.R., R.D., P.B., and S.C.-M. All authors analysed and interpreted the data and critically read the manuscript.

**Competing interests**

The authors declare no competing interests.

**Additional information**

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59632-w>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to P.B.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

## Supplementary information

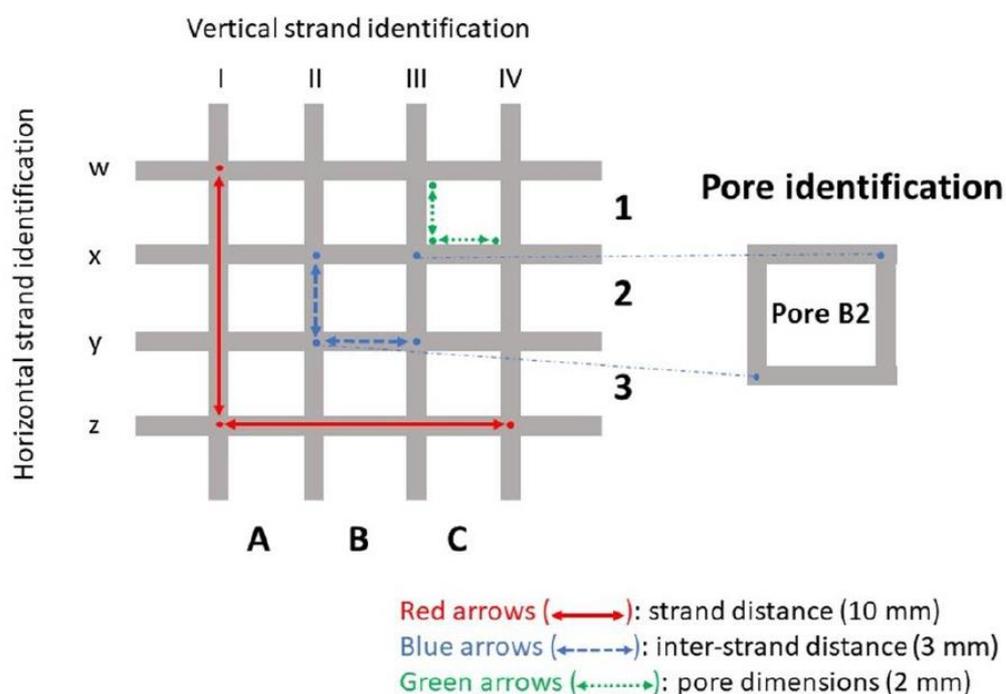
### Nucleotide lipid-based hydrogel as a new biomaterial ink for biofabrication

Bérangère Dessane†, Rawen Smirani†, Guillaume Bouguéon†, Tina Kauss, Emeline Ribot, Raphaël Devillard, Philippe Barthélémy\*, Adrien Naveau, Sylvie Crauste-Manciet

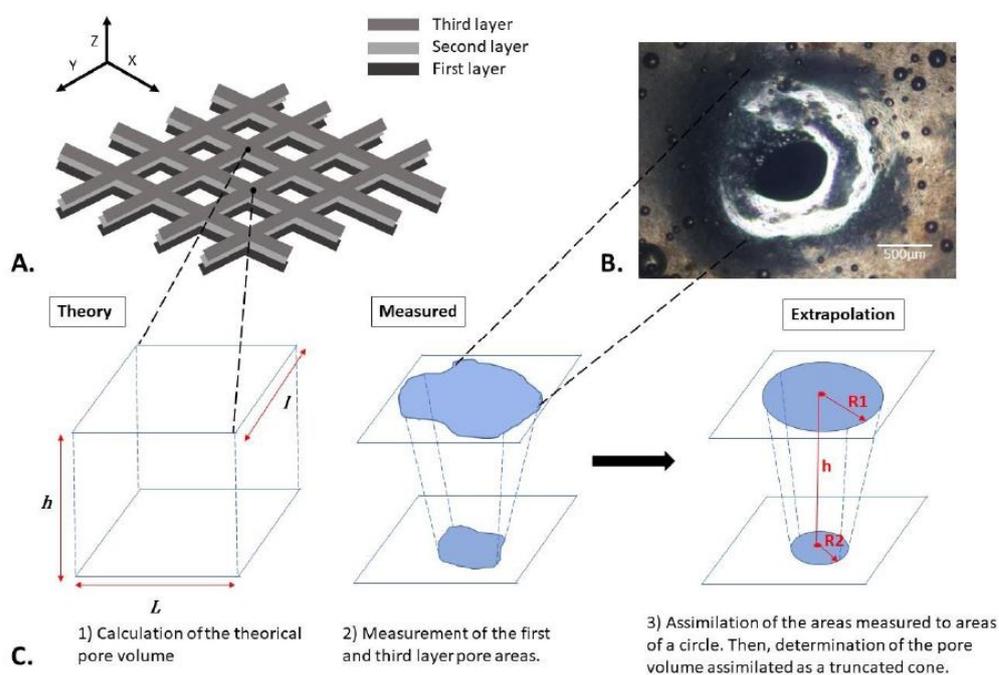
(†) B. Dessane, R. Smirani and G. Bouguéon have contributed equally to this work as first authors.

(\*) Corresponding author

### Lattice characterisation



**Supplementary Figure S1. Determination of the strand distance (red arrows), inter-strand distance (blue arrows) and pore dimension width and letter of lattices.** Schematic representation of the printed lattices and explanation on strand and pore identification. Vertical and horizontal strands are denoted by a Roman numeral (i.e., I; II; III; IV) and a lowercase letter (i.e., w; x; y; z), respectively. Pores are denoted by the association of a capital letter and an Arabic numeral (e.g., pore A.1; B.2; C.3...). Theoretical strand distances and pore dimensions are specified in brackets.



**Supplementary Figure S2. Pore volume determination.** **A.** Schematic representation of a three-layer printed lattice; **B.** Microscopic image of one pore of a three-layer lattice (magnification x2.5); **C.** Process used to determine the pore volume. 1) The theoretical pore volume is calculated using the computer-aided design parameters. 2) The area of the first and third layers of printed lattices is determined using Leica application software. 3) Then, these areas are assimilated to circle areas. The pore volume is calculated using the F2 formula. The pore theoretical volume is calculated using the F3 formula (see the Lattice characterization section in the Material and Methods for formulas).

**Supplementary Table S1.** Average distances between each vertical and horizontal strand for 5 lattices and statistical analysis. $\mu$  = average;  $\sigma$  = standard deviation;

Inter-strand measured		Lattice 1		Lattice 2		Lattice 3		Lattice 4		Lattice 5	
		$\mu$ (mm)	$\sigma$								
Vertical strand	I-II	2965	18	3036	20	3012	8	3034	24	3212	11
	II-III	2986	26	2763	0	2750	24	3038	13	2759	13
	III-IV	2941	19	3086	24	3096	25	2893	20	3200	18
Horizontal strand	W-X	2852	9	2797	11	2833	7	2843	25	2898	32
	X-Y	2969	9	3067	11	3022	17	2928	21	3052	69
	Y-Z	3315	19	3133	15	3201	11	2937	60	3015	41

Supplementary Table S2. Calculation of pore volume porosity and statistical analysis for 5 printed and theoretical lattices.

		Lattice 1	Lattice 2	Lattice 3	Lattice 4	Lattice 5	Theoretical lattice
<b><i>Pore Volumes (mm<sup>3</sup>)</i></b>							
<b>Pores</b>	<b>A1</b>	1.45	1.14	0.77	1.94	1.83	4.62
	<b>A2</b>	1.21	2.23	1.25	3.37	2.88	4.62
	<b>A3</b>	4.51	1.38	1.57	3.36	2.71	4.62
	<b>B1</b>	1.22	0.84	0.44	0.00	2.29	4.62
	<b>B2</b>	1.33	0.26	1.01	2.40	2.47	4.62
	<b>B3</b>	1.10	0.88	0.51	1.73	2.26	4.62
	<b>C1</b>	1.57	0.24	0.34	1.73	1.83	4.62
	<b>C2</b>	2.41	1.37	1.76	1.42	2.00	4.62
	<b>C3</b>	0.77	2.16	2.86	1.15	1.50	4.62
	<b>Total pore volume</b>	15.58	10.51	10.51	17.09	19.79	41.58
	<b>Average pore volume</b>	1.73	1.17	1.17	1.90	2.20	4.62
<b>Standard deviation</b>	1.14	0.72	0.81	1.06	0.45	0.00	
<b>Average lattice pore volume</b>		1.63					
<b>Standard deviation</b>		0.46					
<b><i>Lattice Height (mm)</i></b>							
<b>Height (mm)</b>		1.53	1.57	1.55	1.48	1.50	1.155
<b><i>Strand Lengths (mm)</i></b>							
<b>Strands</b>	<b>I</b>	10.35	10.19	10.02	10.60	10.34	10
	<b>IV</b>	10.63	10.32	10.40	10.62	10.53	10
	<b>w</b>	10.94	10.59	10.91	11.07	10.86	10
	<b>z</b>	10.65	10.89	10.86	11.17	10.83	10
<b><i>Lattice volume without pores (mm<sup>3</sup>)</i></b>							
<b>Volume (mm<sup>3</sup>)</b>		170.17	165.53	166.88	177.31	170.09	115.5
<b><i>Porosity %</i></b>							
<b>Porosity %</b>		9.16	6.35	6.30	9.64	11.63	36
<b>Average porosity %</b>		8.61					
<b>Standard deviation</b>		2.29					

**In vivo biodegradability**

**Supplementary Table S3.** Monitoring of diC<sub>16</sub>dT DMEM@ + biomaterial ink (Bml) volumes (expressed in mm<sup>3</sup>) injected in mice according to time.

un. = unmeasurable

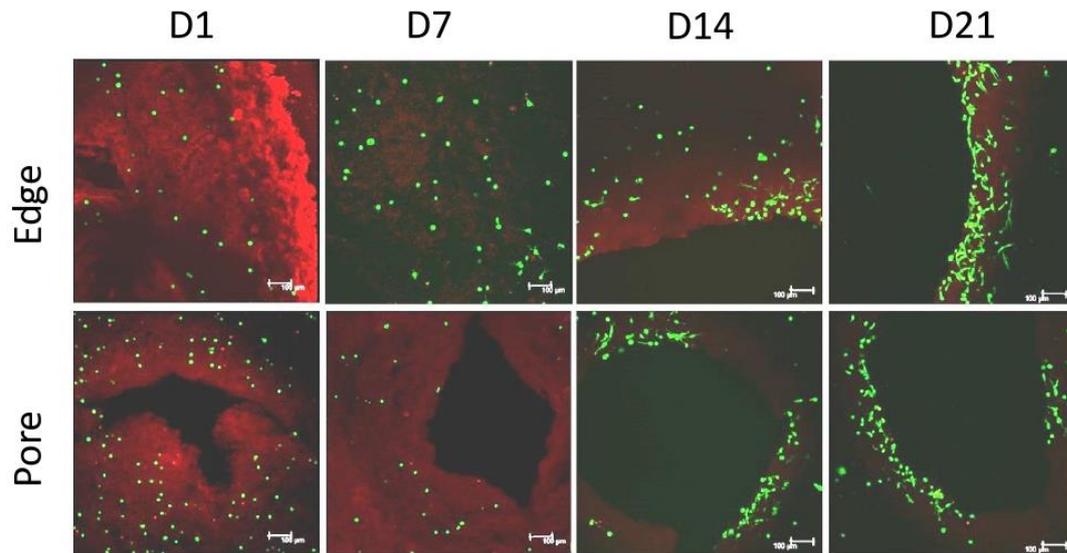
Time (days)	Gel volume (mm <sup>3</sup> )						Average	Standard deviation
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6		
0	226.70	149.15	154.13	124.48	121.41	206.21	163.68	43.37
3	128.89	un.	119.55	99.89	101.68	121.21	114.25	12.79
8	120.68	129.54	115.54	107.66	101.68	un.	115.02	10.90
11	124.04	120.99	97.01	102.11	96.43	122.37	110.49	13.30
14	94.58	91.41	89.54	88.92	82.93	100.06	91.24	5.77
17	84.53	72.72	90.12	70.21	80.45	91.89	81.65	8.91
21	79.51	36.33	76.47	61.81	65.16	un.	63.85	17.09
24	60.90	20.87	73.74	62.00	55.97	79.58	58.84	20.57

**Supplementary Table S4.** Monitoring of diC<sub>16</sub>dT DMEM@ + biomaterial ink (Bml) degradation (expressed in %) injected in mice according to time.

un. = unmeasurable

Time (days)	Percentage of Bml degradation (%)						Average	Standard deviation
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6		
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	43.15	un.	22.44	19.75	16.25	41.22	28.56	12.65
8	46.77	13.15	25.04	13.51	16.25	un.	22.94	14.16
11	45.28	18.88	37.06	17.97	20.58	40.66	30.07	12.28
14	58.28	38.71	41.91	28.57	31.69	51.47	41.77	11.42
17	62.71	51.24	41.53	43.59	33.74	55.44	48.04	10.46
21	64.93	75.64	50.39	50.34	46.33	un.	57.53	12.36
24	73.14	86.01	52.16	50.19	53.90	61.41	62.80	14.13

**Supplementary Figure S3.** In vitro characterisation of biprinted lattices of diC16dT 3% DMEM@+ biomaterial ink. Cellular response of HGFs within lattices made by HGF bioinks at different sample locations. Live/Dead staining of HGF proliferation in the lattice on days 1, 7, 14 and 21. Living cells appear in green, the red colour observed is due to the biomaterial ink autofluorescence.





## **Titre :** Formulation de nanosystèmes biocompatibles pour l'ingénierie tissulaire par impression 3D (bioprinting)

**Résumé :** La bioimpression 3D est une branche de l'ingénierie tissulaire actuellement en plein essor, cherchant à reproduire avec fidélité la microarchitecture complexe de tissus et organes. Malgré un large éventail de biomatériaux utilisés dans la formulation de bioencres, il s'avère essentiel de trouver une alternative aux biomatériaux naturels et synthétiques classiquement utilisés, permettant de mimer la matrice extracellulaire et de présenter des capacités d'impression de façon conjointe.

Le présent travail met en avant, pour la première fois, les capacités de la molécule bioinspirée de type nucléolipide diC<sub>16</sub>dT à permettre la formulation d'une encre de bioimpression par extrusion. L'encre, formulée dans du milieu de culture cellulaire présentait des propriétés rhéologiques lui permettant d'être imprimée de façon continue. Il a également été possible d'y incorporer des fibroblastes gingivaux tout en maintenant leur viabilité cellulaire au sein des bioconstructions. Cette encre offre également plusieurs possibilités d'adaptation, notamment en termes de concentration en diC<sub>16</sub>dT et de milieux de culture en vue de répondre aux exigences d'autres types cellulaires. Enfin, des travaux préliminaires ont permis l'incorporation de liposomes dans la formulation de l'encre sans affecter ses capacités d'impression. Ceci permettra d'envisager la délivrance de substances actives ou d'éléments nutritifs au sein des bioimpressions, fonctionnalité des liposomes qui, à notre connaissance n'avait jamais été mise en valeur auparavant.

**Mots clés :** Bioimpression par extrusion, Bioencre, Molécule hydrogélatrice de bas poids moléculaire, Hydrogel supramoléculaire, Nucléolipide, Liposome

---

## **Title:** Biocompatible nanosystems formulation for tissue engineering using 3D bioprinting

**Abstract:** 3D bioimprinting is an emerging field of tissue engineering, that aims at faithfully reproducing the complex microarchitecture of tissues and organs. Despite a wide range of biomaterials used in bioink formulation, it is essential to find an alternative to the natural and synthetic biomaterials conventionally used, mimicking extracellular matrix and presenting printing capabilities jointly.

The present work demonstrated for the first time, the ability of the bioinspired nucleolipid molecule diC<sub>16</sub>dT to formulate an extrusion bioprinting ink. The ink formulated in cell culture medium showed rheological properties allowing its continuous printability. It was also possible to incorporate gingival fibroblasts while maintaining the cell viability within bioconstructions. This ink also offered several adaptation possibilities, especially in terms of diC<sub>16</sub>dT concentration and cell culture medium to meet other cellular types requirements. Finally, the preliminary work showed the feasibility of the incorporation of liposomes into the ink formulation without affecting its printing capabilities. Thus, it would be possible to further consider the delivery of active substances or nutrients within the bioconstructions. This application has, to the best of our knowledge, not been developed yet for liposomes.

**Keywords :** Extrusion Bioprinting, Bioink, Low Molecular Weight Hydrogelators, Supramolecular Hydrogel, Nucleolipid, Liposome

---

**Unité de recherche :** Laboratoire ARNA, ChemBioPharm, INSERM U1212, UMR 5235 CNRS, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux