HAL open science

Micro-impression 3D multi-matériaux de micro-robots magnétiques pour la manipulation de cellules à distance

Roxane Petrot

To cite this version:

Roxane Petrot. Micro-impression 3D multi-matériaux de micro-robots magnétiques pour la manipulation de cellules à distance. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALT014 . tel-04116907

HAL Id: tel-04116907

https://theses.hal.science/tel-04116907v1

Submitted on 5 Jun 2023

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : EEATS - Electronique, Electrotechnique, Automatique, Traitement du Signal (EEATS)
Spécialité : NANO ELECTRONIQUE ET NANO TECHNOLOGIES
Unité de recherche : Institut Néel

Micro-impression 3D multi-matériaux de micro-robots magnétiques pour la manipulation de cellules à distance

3D multi-material micro-printing of magnetic micro-robots for remote manipulation of cells

Présentée par :

Roxane PÉTROT

Direction de thèse :

Orphée CUGAT Directeur de recherche CNRS	Directeur de thèse
Thibaut DEVILLERS Maître de conférences, Université Grenoble Alpes	Co-encadrant de thèse
Olivier STÉPHAN Maître de conférences, Université Grenoble Alpes	Co-encadrant de thèse

Rapporteurs :

Catherine VILLARD
Directrice de recherche CNRS, Université de Paris Cité
Marie FRÉNÉA-ROBIN
Maître de conférences, Université Lyon 1

Thèse soutenue publiquement le **9 janvier 2023**, devant le jury composé de :

Skandar BASROUR Professeur des universités, Université Grenoble Alpes	Président
Orphée CUGAT Directeur de recherche CNRS	Directeur de thèse
Catherine VILLARD Directrice de recherche CNRS, Université de Paris Cité	Rapportrice
Marie FRÉNÉA-ROBIN Maître de conférences, Université Lyon 1	Rapportrice
Akos BANYASZ Chargé de recherche CNRS, ENS Lyon	Examinateur
Denis BARBIER Docteur en sciences, PDG Microlight3D	Examinateur

Invités :

Thibaut Devillers
Maître de conférences, UGA
Olivier Stéphan
Maître de conférences, UGA
Caterina Tomba
Chargée de recherche CNRS, Université Lyon 1

Résumé

Les micro-robots magnétiques sont des structures 3D de taille inférieure au millimètre à actionnement magnétique, d'intérêt croissant pour des applications biologiques. Ici, nous nous intéressons au développement et à l'impression 3D de micro-robots magnétiques grâce à la polymérisation à deux photons pour la manipulation de cellules à distance.

Deux sujets principaux ont été étudiés au cours de cette thèse. Tout d'abord, on cherche à développer un substrat de culture cellulaire imitant la paroi intestinale afin d'étudier la réponse de cellules à des changements de courbure. Pour ce faire, on imprime une micro-structure hybride que l'on déforme par actionnement magnétique. L'hybridation de deux matériaux dans la structure même permet de tirer avantage de leur propriétés respectives : le squelette interne est en Ormocomp (résine polymère), il apporte une structure stable, l'enveloppe en gélatine-collagène est souple et permet la culture de cellules. Enfin, on accroche une bille de NdFeB permettant de déformer la structure dans un champ magnétique.

Par ailleurs, la méthode de fabrication originelle de nos micro-robots ne permet pas l'impression en grand nombre car les billes sont réparties aléatoirement sur le substrat. Pour l'améliorer, il faut pré-positionner les billes, pour pouvoir automatiser le processus de fabrication. On a donc fabriqué des pièges magnétiques permettant de placer les billes à des endroits choisis. L'impression sur ces pièges à billes métalliques est plus complexe que l'impression habituelle sur verre : en optimisant la puissance du laser et en ajoutant un traitement de surface sur les substrats, nous avons développé une méthode d'impression sur substrats opaques et réfléchissants.

Abstract

Magnetic microrobots are magnetically actuated sub-millimeter 3D structures of increasing interest for biological applications. Here, we are interested in the development and 3D microprinting of magnetic microrobots using two-photon polymerization for remote cell manipulation.

Two main topics have been studied during this thesis. First, we aim to develop a cell culture substrate mimicking the intestinal wall in order to study the response of cells to changes in curvature. To do so, we print a hybrid micro-structure which is deformed by magnetic actuation. The hybridization of two materials in the structure itself allows to take advantage of their respective properties : the internal skeleton is made of Ormocomp (polymer resin), it brings a stable structure, the envelope made of gelatin-collagen is flexible and allows the culture of cells. Finally, a NdFeB bead is attached to the skeleton to deform it in a magnetic field.

Moreover, the original manufacturing method of our micro-robots does not allow the printing in large numbers because the beads are randomly distributed on the substrate. To improve it, we need to pre-position the beads, in order to automate the manufacturing process. Therefore, magnetic traps have been made to place the beads at selected locations. Printing on these metal bead traps is more complex than the usual printing on glass : by optimizing the laser power and adding a surface treatment on the substrates, we have developed a method of printing on opaque and reflective substrates.

Remerciements

Cette thèse est le résultat de trois ans de travail et n'aurait été possible sans le soutien de nombreuses personnes, que je tiens à remercier. Nommer tout le monde est difficile, et il est possible que j'en oublie, mais je suis reconnaissante de toutes les personnes ayant touché ma thèse.

Tout d'abord, un grand merci à mes encadrants de thèse, Orphée, Thibaut et Olivier, qui m'ont encouragée et accompagnée depuis le début de cette aventure, et sans qui ce projet ne serait jamais né. Merci à Caterina Tomba, qui s'est intéressée à mon sujet début 2021, a proposé une collaboration et s'est retrouvée à joindre mon équipe encadrante. Merci également à Victor Vieille, qui m'a choisie comme stagiaire en M2 sur le même sujet et m'a encouragée à continuer en thèse, et a donc mis en route tout le reste de ces événements.

Merci à mes collègues de Néel pour les déjeuners et les cafés (sans café mais avec chocolat) passés ensemble, et pour avoir créé une ambiance chaleureuse tout le long de ma thèse : Erika, Isabelle, Fred, Nora, Irina, Gabriel, Cristina, Richard... Je voudrais également remercier Laetitia, à la fois pour son aide pour mes travaux d'impression, et pour avoir partagé son bureau ces trois dernières années et pour les innombrables discussions. Merci également aux doctorants et autres non-permanents du Liphy, qui m'ont intégrée dès mon stage.

Je tiens particulièrement à remercier ma famille pour leur soutien, non seulement durant ces trois ans mais depuis toujours. Un merci en plus pour ma mère qui a relu ce manuscrit, et a trouvé que ma thèse était chouette :) Merci également à Seb pour ses encouragements. Merci à mes amis, de Grenoble et d'ailleurs, pour avoir apporté du divertissement pendant ces années de thèse.

Je voudrais également remercier les membres de mon jury de thèse, pour leur évaluation de mon travail ainsi que leur questions pertinentes lors de la soutenance : Catherine Villard et Marie Frénéa-Robin (rapporteures), ainsi que Skandar Basrour, Akos Banyasz et Denis Barbier.

Enfin, merci à l'Institut Néel, au G2Elab et au LiPhy pour leur accueil, et à LANEF pour son financement.

Table des matières

Glossaire **ix**

Introduction générale **1**

1 État de l'art et théorie **3**

1.1 Micro-robots . . . 3

1.1.1 Techniques d'actionnement . . . 3

1.1.2 Micro-robots magnétiques . . . 4

1.2 Environnements cellulaires *in vitro* et *in vivo* . . . 8

1.2.1 Villosités intestinales . . . 8

1.2.2 Modèles *in vitro* . . . 9

1.3 Impression 3D par polymérisation à deux photons . . . 10

1.3.1 Substrat métallique (opaque et réfléchissant) . . . 11

1.3.2 Combinaison de plusieurs résines . . . 13

1.4 Magnétisme . . . 14

1.4.1 Aimants NdFeB . . . 14

1.4.2 Actionnement magnétique . . . 15

2 Matériaux et méthodes **19**

2.1 Matériaux . . . 19

2.1.1 Résine sol-gel . . . 20

2.1.2 Résine hydrogel . . . 21

2.1.3 Billes magnétiques . . . 22

2.1.4 Aimant permanent . . . 23

2.1.5 Substrats magnétiques TMP . . . 24

2.2 Méthodes . . . 24

2.2.1 Micro-impression 3D . . . 24

2.2.2 Aimantation des billes 33
2.2.3 Source de champ magnétique pour actionner les structures 34
2.2.4 Pré-positionnement des billes avec substrats TMP 35
2.2.5 Imagerie MEB 36
2.3 Logiciels 36
2.3.1 CAO 36
2.3.2 Simulations numériques 37
2.4 Conclusion 39

3 Structure hybride pour la stimulation mécanique de cellules 41
3.1 Concept 41
3.2 Conception et fabrication de la structure 43
3.2.1 Conception et modélisation du squelette 44
3.2.2 Fabrication et optimisation du modèle de squelette 49
3.2.3 Validation de l'hybridation Ormocomp-gélatine 55
3.2.4 Enveloppe en résine gélatine-collagène 56
3.2.5 Structure complète - Squelette + Enveloppe + Bille 60
3.3 Actionnement 66
3.3.1 Aimantation de la bille 67
3.3.2 Actionnement du squelette seul 68
3.3.3 Actionnement de la structure complète 70
3.4 Culture cellulaire 70
3.4.1 Méthode 70
3.4.2 Résultats sur squelette + enveloppe 72
3.5 Conclusion et perspectives 73

4 Méthode d'impression en série 75
4.1 Contexte et concept 75
4.2 Pièges à billes 76
4.2.1 Motifs du masque 76
4.2.2 Protocole de piégeage des billes 80
4.2.3 Tri granulométrique 82
4.2.4 Résultats piégeage des billes sur TMP 83
4.3 Impression sur substrat TMP 86

4.3.1 Modification du montage expérimental 87
4.3.2 Influence de l'objectif et mise au point 88
4.3.3 Revêtement sur le substrat 92
4.3.4 Influence de la technique de séchage 97
4.3.5 Paramètres d'impression : variation de la puissance 99
4.3.6 Impression d'objets plus complexes 102
4.3.7 Fabrication de structures magnétiques sur aimant TMP 105
4.4 Conclusion et perspectives 107

Conclusions et perspectives **109**

A Protocole de fabrication des structures hybrides Ormocomp-gélatine **113**

Glossaire

Ces termes seront explicités en détail dans le reste du texte, et sont fournis ici comme référence.

2PP Polymérisation à 2 photons, une méthode d'impression microscopique.

3D Tridimensionnel, ou trois dimensions, suivant les cas.

Contraintes de Von Mises Manière de calculer les contraintes dans une pièce. Permet de savoir, sous des sollicitations données, si une pièce se déforme plastiquement ou si elle reste dans le domaine élastique.

Ligand Atome ou molécule formant des liaisons covalentes avec d'autres atomes.

Lithos Logiciel de Microlight3D utilisé pour la microimpression 3D par 2PP.

MEB Microscopie électronique à balayage.

Morphogénèse ensemble des lois qui déterminent la forme, la structure des tissus, des organes et des organismes.

NdFeB Néodyme-Fer-Bore. Un type d'aimant permanent de forte aimantation.

Ormocomp Résine photosensible biocompatible ayant des propriétés comparables à du verre lorsque polymérisée.

PBS Tampon phosphate salin (phosphate-buffered saline).

Simpoly Logiciel de *slicing* de modèles 3D pour l'impression par 2PP.

TMP Thermo-magnetically patterned, s'applique à des substrats de Si-Ta-NdFeB-Ta aimantés selon un motif défini grâce à un laser et un masque.

Introduction générale

La micro-impression 3D par polymérisation à deux photons (2PP) se développe depuis une vingtaine d'années [1] et connaît un intérêt toujours soutenu. Cette technologie consiste à polymériser une résine photosensible très localement (volume voisin de 1 μm^3) avec un laser pulsé. Elle permet grâce au déplacement d'une platine (x,y,z) d'imprimer des structures 3D mesurant de quelques microns à quelques centaines de microns avec une résolution micrométrique, à partir de matériaux variés (résines photosensibles polymères, monomères, ou même à base de protéines). La durée d'impression va de quelques secondes pour des lignes simples à quelques heures pour des structures de plusieurs dizaines de microns. Ces propriétés permettent d'utiliser la micro-impression 3D dans de nombreux domaines, de l'optique [2] à la culture cellulaire [3, 4].

Un autre avantage de la micro-impression 3D par 2PP est la possibilité de concevoir les structures de façon à ce qu'elles puissent être actionnées, par exemple en incorporant un matériau magnétique. Ceci permet de fabriquer des micro-actionneurs contrôlables à distance d'une taille inférieure au millimètre. De tels micro-robots magnétiques peuvent être utilisés dans des environnements confinés comme le corps humain ou les puces micro-fluidiques grâce à leur actionnement à distance et leur taille réduite.

Plusieurs techniques de fabrication existent pour créer des micro-robots, mais la micro-impression 3D par 2PP permet de fabriquer des objets tridimensionnels complexes de l'ordre de grandeur de la dizaine de microns. Ces micro-robots sont utilisés pour diverses applications, par exemple comme micro-mixeurs pour des circuits microfluidiques [5], ou bien pour déplacer et trier des cellules [6].

Avant mon arrivée sur ce projet, et pendant mon stage de fin d'études, une méthode de fabrication de micro-robots magnétiques par micro-impression à deux photons a été développée durant la thèse de Victor Vieille [7], permettant de fabriquer des micro-structures liées à des billes magnétiques. L'objectif de ma thèse est de développer les travaux dans cette direction. Deux voies ont été poursuivies : le développement d'une micro-structure hybride actionnée magnétiquement pour la culture cellulaire dans un environnement dynamique, et l'amélioration de la méthode de fabrication pour permettre l'impression automatisée en grand nombre des micro-robots magnétiques.

La structure déformable pour la culture cellulaire est développée en collaboration avec Caterina Tomba de l'INL (Institut des Nanotechnologies de Lyon). L'objectif est de fabriquer une structure stable et déformable pouvant servir de substrat de culture cellulaire pour imiter les conditions dans lesquelles sont les cellules *in vivo*. On cherche en particulier à imiter les villosités intestinales, qui sont des replis de l'intestin grêle. En effet, la plupart des études sont aujourd'hui faites sur substrats plats et statiques, mais la forme et les mouvements du substrat ont des effets sur le comportement de ces cellules [8, 9]. Ainsi, disposer de substrats courbés et déformables aiderait à la compréhension

du comportement des cellules. Pour ce faire, nous développons une structure hybride composée d'un squelette stable en résine polymère, d'une enveloppe de gélatine-collagène souple pour permettre la culture cellulaire, et d'une bille magnétique pour appliquer un couple sur la structure globale et donc la déformer à distance.

Par ailleurs, on cherche à améliorer la méthode de fabrication des micro-robots magnétiques car la méthode actuelle est chronophage et demande une certaine habileté. En effet, les billes magnétiques étant réparties aléatoirement sur une lamelle de verre, imprimer des microrobots liés à ces billes demande de localiser les billes, voire de les déplacer précisément lorsque l'on veut fabriquer des structures à plusieurs billes. Ainsi, nous voulons développer une nouvelle méthode, qui consiste d'abord à piéger les billes sur un substrat magnétique [10] pour contrôler leur position, puis à imprimer les micro-structures sur ce substrat à côté des billes piégées. L'impression sur substrat métallique est complexe [11], la surface étant différente du verre à la fois chimiquement et optiquement, cela demande donc de repenser complètement le protocole de fabrication.

Cette thèse est composée de quatre chapitres :

Le premier présente les domaines de recherches auxquels nous nous intéressons pour ces travaux : les micro-robots, en particulier à actionnement magnétique, les substrats de culture qui imitent les conditions *in vivo*, la micro-impression 3D par polymérisation à deux photons, notamment l'impression sur substrat métallique et l'hybridation de résines, et les notions de magnétisme que nous utilisons pour actionner nos micro-robots.

Les matériaux, les techniques expérimentales et les logiciels utilisés pour concevoir et imprimer nos micro-robots magnétiques sont exposés dans le chapitre 2.

Le chapitre 3 présente le développement d'une structure hybride composée de deux résines et d'une bille magnétique, qui constitue une des deux majeures parties de ce travail de thèse. La conception, la fabrication et l'actionnement de cette structure seront détaillés dans le chapitre, ainsi que les premiers tests de culture cellulaire.

Le chapitre 4 s'intéresse au développement d'une méthode permettant l'impression de microrobots magnétiques en nombre grâce au pré-positionnement de billes magnétiques sur des substrats dont l'aimantation présente des motifs particuliers. La conception et la fabrication de ces pièges sera détaillée, ainsi que le développement d'une méthode d'impression sur substrats métalliques.

L'ensemble de ces éléments nous permettra enfin de conclure ces travaux de thèse et d'envisager des perspectives pour ces micro-structures magnétiques.

Chapitre 1

État de l'art et théorie

Ce premier chapitre présente les domaines auxquels ces travaux de thèse sont liés : les micro-robots, en particulier ceux à actionnement magnétique et leurs techniques de fabrication ; les milieux de culture cellulaire complexes *in vitro* imitant les conditions réelles, ainsi qu'une présentation des villosités intestinales ; l'impression par polymérisation à deux photons, notamment sur substrats opaques et réfléchissants, et utilisant plusieurs matériaux photosensibles pour une même structure ; et enfin le magnétisme, avec une présentation des aimants NdFeB et des phénomènes exploités pour l'actionnement magnétique.

1.1 Micro-robots

Les micro-robots s'apparentent aux micro-actionneurs et suscitent un intérêt croissant ces dernières années pour leur capacité à interagir avec un environnement à petite échelle, inférieure au millimètre [12, 13]. Mais qu'est-ce qu'un micro-robot ? Tout d'abord, le mot "micro" signifie ici inférieur au millimètre, et principalement entre quelques dizaines et quelques centaines de microns. Dans la littérature, certains petits actionneurs de l'ordre du millimètre sont parfois aussi nommés "micro-robots" : nous ne les considérerons pas ici. Le nom "robot" représente pour nous toute structure pouvant être actionnée, et a donc une signification assez différente de l'interprétation courante du mot.

1.1.1 Techniques d'actionnement

Les micro-robots peuvent être actionnés principalement de deux manières : à distance ou par contact. Pour l'actionnement par contact, les microsystèmes électromécaniques (MEMS) électrostatiques sont très utilisés [14] ; cependant, récemment les efforts se sont concentrés sur l'actionnement à distance, car il simplifie la fabrication et l'actionnement de structures à échelle réduite. De plus, il répond au besoin de micro-actionneurs pouvant se déplacer avec plusieurs degrés de liberté dans des environnements confinés in vitro ou in vivo, permettant par exemple la manipulation d'objets biologiques tels que des cellules, ou bien l'accès à des vaisseaux sanguins.

Les principales techniques d'actionnement à distance des micro-robots exploitent des phénomènes

acoustiques, optiques et magnétiques. Pour chacune de ces techniques, le micro-robot est conçu pour un type d'actionnement précis, et un appareil extérieur permet l'actionnement du robot (générateur de champ magnétique, laser, etc...). La première méthode, acoustique, consiste soit à utiliser des ultrasons pour créer un mouvement oscillatoire d'un des effecteurs du robot ou d'une bulle d'air piégée dans le robot à sa fréquence de résonance permettant de le déplacer [15, 16], soit à créer des champs acoustiques qui génèrent une force de traînée hydrodynamique entraînant les robots vers les points d'amplitude minimale et maximale (ventres et nœuds) de la pression acoustique dans un fluide [17]. La seconde, optique, peut utiliser deux phénomènes très différents : soit utiliser les gradients de température induits par la lumière dans un milieu pour déplacer les objets le long de ces gradients, soit piéger des objets aux points focaux de faisceaux laser (pinces optiques) [18, 19]. Enfin, les micro-robots magnétiques sont dotés de matériaux magnétiques qui réagissent à un champ magnétique extérieur [20, 21]. Il existe de nombreux types de micro-robots, pour différentes applications, dont le design peut être original [22], inspiré par la nature [23] voire même hybride avec une partie d'origine biologique et une partie artificielle [24].

1.1.2 Micro-robots magnétiques

Nous pilotons nos micro-robots à distance par voie magnétique. Les champs magnétiques n'interagissent pas avec les milieux magnétiquement inertes [1] tels que le verre, les plastiques, les gaz, les tissus biologiques etc., et peuvent donc pénétrer ces milieux, ce qui les rend particulièrement bien adaptés pour les applications biologiques. De plus, en manipulant le gradient ou la direction du champ magnétique, on induit des forces de translation ou des couples magnétiques (voir partie 1.4), permettant d'obtenir des mouvements, donc des fonctions, plus sophistiqués.

Un micro-robot magnétique est généralement composé d'une structure principale, pouvant être fabriquée avec différentes techniques de microfabrication, et de parties magnétiques, qui peuvent lui être intégrées ou accrochées de différentes manières. La figure 1.1 montre quatre exemples de micro-robots magnétiques, fabriqués avec différentes techniques, et utilisés à des fins variées.

1.1.2.1 Techniques de micro-fabrication

Pour fabriquer des structures à une échelle sub-millimétrique, on emploie des techniques spécifiques de micro-fabrication. Certaines des nombreuses techniques utilisées pour fabriquer des micro-robots sont illustrées figure 1.2. Ces techniques ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients, et sont destinées à fabriquer diverses structures à partir de matériaux divers et exécuter différentes fonctions.

Pour avoir d'assez grandes libertés de mouvement et de forme, certains micro-robots sont fabriqués par moulage ou par lithographie, techniques qui permettent de fabriquer des structures 2D. La lithographie classique (fig. 1.2.a) permet principalement de fabriquer des structures à deux dimensions, ou planaires, plus ou moins épaisses. Un masque est placé au dessus d'une résine photosensible, et une radiation lumineuse, souvent ultraviolette (UV) permet de polymériser la résine

1. Ces matériaux sont diamagnétiques et ont donc une réponse négative, extrêmement faible aux champs extérieurs [25].

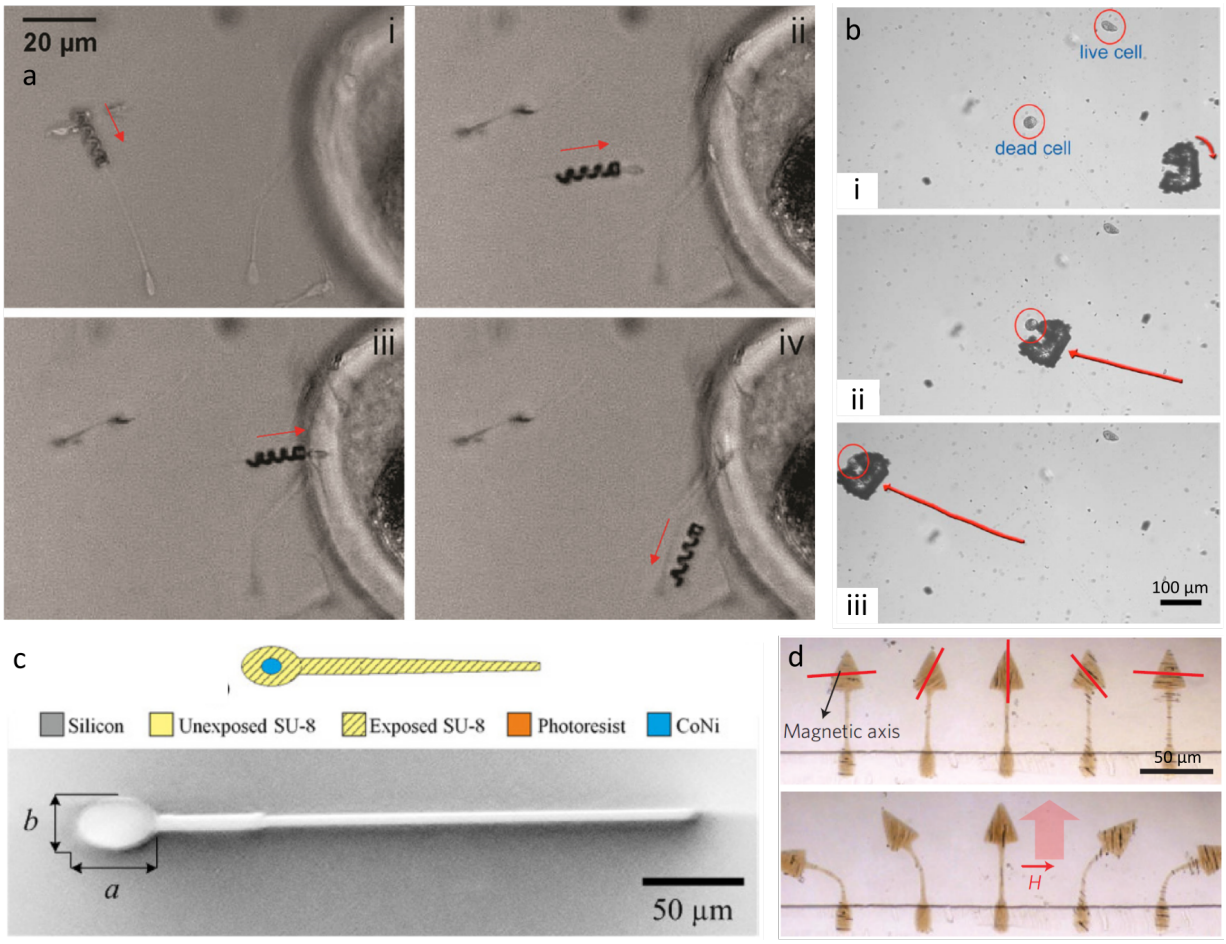


FIGURE 1.1 – Exemples de micro-robots magnétiques extraits de la littérature. a. Microhélices magnétiques transportant un spermatozoïde vers un ovocyte [26]. b. Micro-robot magnétique en U déplaçant une cellule [22]. c. Schéma et image MEB d'un MagnetoSperm [23]. d. Cinq actionneurs magnétiques en forme de flèches aimantées dans différentes directions se déformant en éventail dans un champ homogène [6].

à certains endroits déterminés. Par exemple, Khalil et al. [23] ont réalisé des spermatozoïdes artificiels magnétiques en utilisant cette méthode. La lithographie est également une base pour certaines autres méthodes, permettant par exemple de fabriquer des moules (fig. 1.2.b). Notamment, Zhang et Diller [27] ont fabriqué un micro-robot par moulage en intégrant des aimants et des parties plus fines, permettant de plier la structure en 3D. Cette méthode peut être utilisée avec des matériaux souples, ce qui est rare parmi les différentes méthodes de micro-fabrication. Cependant, les formes sont limitées à la 2D à cette échelle, la fabrication de moules 3D micrométrique étant très limitée.

La troisième méthode illustrée (fig. 1.2.c), l'électrodépôt avec masque, permet de fabriquer des micro-objets en faisant croître un métal dans un moule. Souvent, ces structures sont des tiges 1D [28], mais le moule peut être 2D. Les formes pouvant être fabriquées sont limités, mais cette technique permet la fabrication de plusieurs structures en parallèle. De plus, une certaine hétérogénéité peut être apportée en alternant les matériaux, et l'épaisseur peut être modifiée par gravure après l'électrodépôt, par exemple pour créer des charnières au niveau desquelles une micro-tige peut se plier [29].

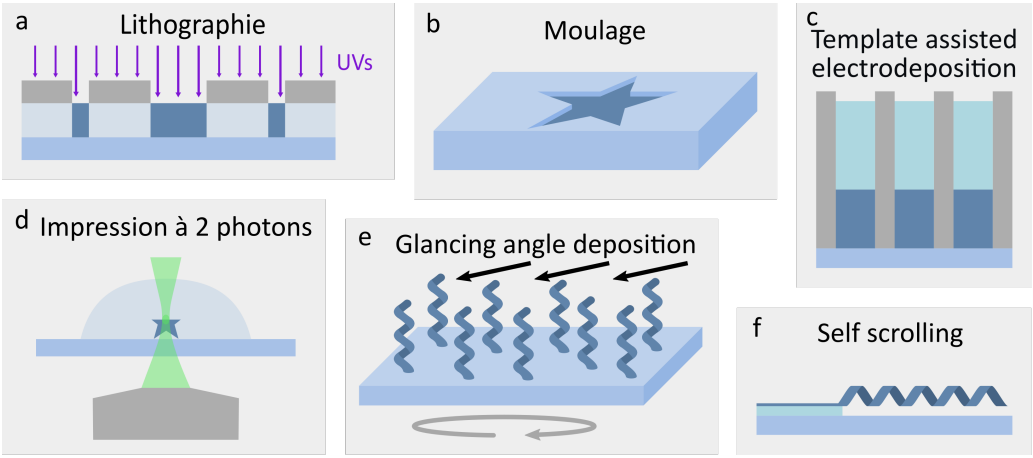


FIGURE 1.2 – Techniques de micro-fabrication pour fabriquer des micro-robots. a. Lithographie UV avec masque. La résine est polymérisée aux endroits exposés. b. Moulage. Le matériau est versé dans un moule puis durci. c. Électrodépôt de différents matériaux avec moule. d. Impression par polymérisation à deux photons d'une résine grâce à un laser. e. Dépôt physique par phase vapeur sur substrat tournant. f. Enroulement du matériau cible après gravure chimique d'une couche sacrificielle.

Enfin, différentes méthodes permettent de fabriquer des robots directement en 3D. L'image 1.2.d illustre la micro-impression à deux photons (2PP), que nous utilisons au LIPhy. Il s'agit d'une technologie plus versatile, mais qui requiert un temps de fabrication assez long, surtout pour fabriquer de nombreux objets, le temps d'impression pouvant atteindre quelques heures, voire une journée selon le nombre et la taille des objets. La 2PP permet l'impression de presque n'importe quelle forme à l'échelle de la dizaine de microns [30, 31]. Je détaille cette méthode de fabrication dans la partie 2.2.1.

Les deux dernières méthodes illustrées (fig. 1.2.d et e) sont anecdotiques et plus limitées quant aux options de forme. En effet, le *self scrolling*, soit l'enroulement sur soi-même permet uniquement de créer une hélice en forme de tire-bouchon [32]. Le dépôt par *Glancing angle*, dépôt à angle oblique, est habituellement utilisé pour faire des tiges simples, mais grâce à la rotation du substrat pendant le dépôt, il permet de créer le même types d'hélices [33]. De telles structures sont souvent utilisées en tant que micro-robots magnétiques car elles peuvent se déplacer sous application d'un champ tournant.

1.1.2.2 Incorporation du matériau magnétique

Différentes méthodes ont été développées pour incorporer des matériaux magnétiques, qui sont généralement opaques, aux micro-robots 3D . Il y a deux approches principales : déposer le matériau magnétique après fabrication de la structure sur celle-ci, ou bien incorporer le matériau magnétique dans la résine avant de la polymériser pour fabriquer la structure.

Les figures 1.3.a, c et d illustrent des exemples de dépôt de matériau magnétique après fabrication. Le premier, qui consiste à immerger des structures dans une solution colloïdale de particules magnétiques (Fe_3O_4 par exemple [24] [34]), est efficace quand la structure doit être intégralement

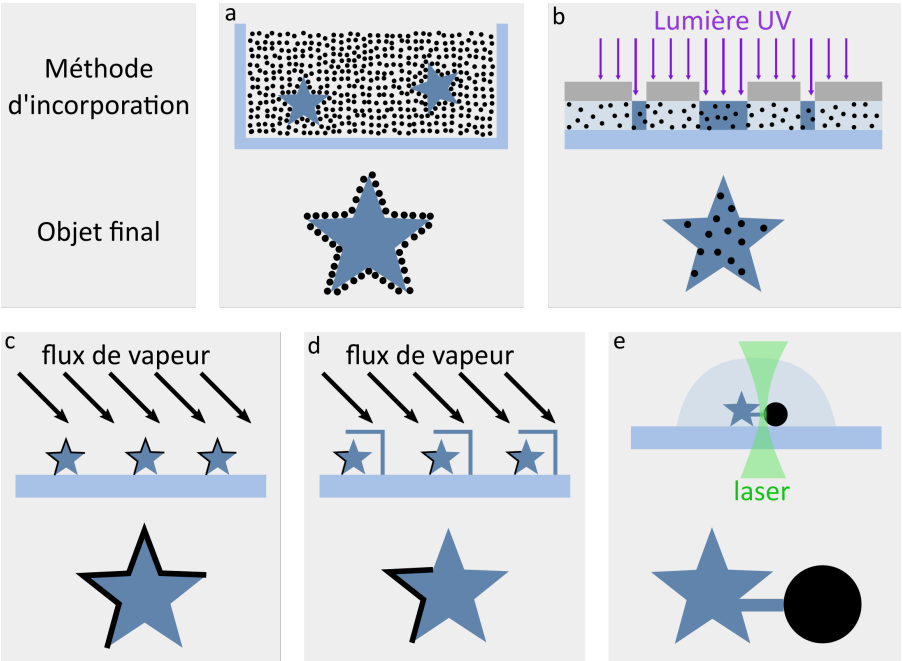


FIGURE 1.3 – Méthodes d'incorporation d'un matériau magnétique dans les microrobots.

couverte de manière homogène et est utile pour de la production en masse. Les figures c et d montrent un dépôt physique en phase gazeuse de matériau magnétique sur une structure déjà formée, qui est particulièrement utilisé pour des micro-robots en forme d'hélices [35] [36]. Ce dépôt est également efficace pour incorporer le matériau magnétique sur de nombreux objets, mais le dépôt est directionnel, et doit se faire sous vide, ce qui empêche l'utilisation d'hydrogels, qui contiennent beaucoup d'eau. Pour le dépôt avec masque (fig. 1.3.d), un masque est fabriqué en même temps que les micro-robots et permet de protéger du dépôt une partie de la structure du flux de matériau magnétique. La couche déposée sur les micro-robots, quelle que soit la méthode, est limitée en épaisseur et peut altérer les propriétés des structures, telles que leur flexibilité ou leur transparence.

La seconde approche pour ajouter un matériau magnétique à des micro-robots consiste à les fabriquer directement à partir de matériau plus ou moins magnétique. Pour cela, on mélange des nanoparticules magnétiques dans une résine avant de la polymériser, en assez faible proportion pour ne pas compromettre le processus de fabrication, en particulier pour les méthodes de photolithographie. Les micro-robots fabriqués avec cette méthode sont habituellement fabriqués par lithographie classique ou par 2PP [6]. Le matériau magnétique est réparti de manière relativement homogène dans l'objet durci, l'aimantation est généralement uniforme et les mouvements complexes sont ainsi difficiles à obtenir. De plus, la quantité de nanoparticules doit être assez faible car sinon la photopolymérisation est impossible, et la qualité de la structure peut être détériorée. En effet, si la quantité de nanoparticules magnétique est trop élevée, les UVs ou le laser peuvent être absorbés par les nanoparticules et créer des effets thermiques (bulles), ou empêcher la pénétration de la lumière.

La dernière méthode exposée figure 1.3.e est celle développée par mon équipe [7] et consiste à lier une structure et un objet magnétique : nous attachons une bille magnétique de quelques dizaines de microns de diamètre à un endroit précis de la structure imprimée par 2PP. J'explique cette technique en détail dans le chapitre 2, section 2.2.1.6. La bille aimantée est de l'ordre de

grandeur du micro-robot, et permet donc d'appliquer des couples et des forces de grande amplitude sans compromettre la structure principale du micro-robot.

1.2 Environnements cellulaires *in vitro* et *in vivo*

In vivo, les cellules évoluent dans des milieux tridimensionnels complexes qui présentent diverses caractéristiques topographiques, et ce à différentes échelles, du nanomètre au centimètre. Ces milieux ont une influence sur le développement des tissus [8]. Par exemple, de nombreux procédés lors de la morphogénèse sont dépendants de la forme et du mouvement des cellules du tissu épithélial [37, 38]. La culture cellulaire dans des milieux 3D dont la rigidité et la chimie sont proches des conditions *in vivo* (module de Young de quelques kPa à quelques MPa [39, 40], matériaux qui reproduisent la matrice extracellulaire) fournit aux cellules un environnement physiologiquement adapté, qui permet d'étudier les interactions entre les cellules et avec le milieu de manière plus proche à celle de l'*in vivo*. De plus, il a été démontré que le mouvement du substrat a une influence sur les cellules, pouvant entraîner la morphogénèse spontanée de villosités [41]. Ainsi, l'étude de cellules dans des environnements 3D courbés et/ou déformables est importante pour mieux mimer la topographie et les mouvements présents *in vivo* et comprendre la réponse cellulaire à ces propriétés physiques et mécaniques.

Pour étudier l'activité des cellules et les processus qui leur sont attachés, il y a trois approches principales : simulation numérique [42], étude *in vivo* [43] et enfin étude *in vitro*, à laquelle on se limitera ici. En effet, les simulations sont assez limitées, et les études *in vivo* sont couteuses et posent des problèmes éthiques, les modèles *in vitro* sont donc une bonne option de départ pour étudier ces cellules. On s'intéresse ici en particulier à l'intestin grêle, pour sa structure courbée à plusieurs échelles et ses mouvements essentiels pour son fonctionnement.

1.2.1 Villosités intestinales

Trois types de replis de l'intestin grêle agrandissent sa surface d'absorption, pour amplifier l'absorption des nutriments par le sang. Ce sont les valvules conniventes (ou plis de Kerkring), les villosités, et les microvillosités (fig. 1.4). Ces replis augmentent la surface des intestins d'un facteur 600, pour atteindre une surface moyenne de 32 m^2 chez l'homme [44]. Les villosités intestinales jouent donc un rôle critique dans les procédés de digestion et d'absorption.

Chez l'homme, les valvules mesurent environ 5 mm de long, les villosités entre 500 µm et 1,5 mm de long, et autour de 100 µm de diamètre, et les microvillosités environ 1 µm de long [46, 47]. Les villosités sont reliées aux vaisseaux sanguins, de sorte que le sang circulant emporte ensuite les nutriments. Elles ont une paroi fine, d'une seule cellule d'épaisseur, favorisant les échanges de l'intérieur de l'intestin vers le sang.

En contact avec diverses solutions, telles que du glucose, de la bile, ou une solution saline, les villosités vacillent dans toutes les directions, puis se contractent et s'étendent [48]. Dans la littérature, les mouvements des villosités sont décrits avec peu de précision [49] mais semblent avoir des périodes d'oscillation de l'ordre de la seconde à la dizaine de seconde. Les mouvements des villosi-

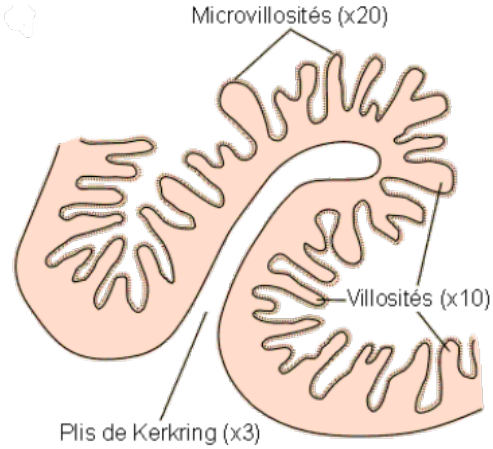


FIGURE 1.4 – Dispositifs d'augmentation de surface absorbante de l'intestin par plissement. Le chiffre correspond au facteur d'agrandissement de la surface [45].

tés favorisent la formation correcte des villosités de l'intestin et le maintien de ses fonctionnalités, dont l'absorption des nutriments par le corps [50]. Ces phénomènes sont encore très méconnus, par manque de moyens de les étudier. En effet, pour décomposer le rôle des différentes propriétés physiques de l'environnement cellulaire, il faut les outils pour les reproduire.

1.2.2 Modèles *in vitro*

Développer des modèles *in vitro* de certains organes, par exemple l'intestin, est complexe car ils comportent des structures courbées à plusieurs échelles, du nanomètre au centimètre, et sont dynamiques. En effet, répliquer ces conditions est difficile, mais permettrait de mieux comprendre le fonctionnement de ces organes.

Malgré ces difficultés, de tels milieux ont été développés pour imiter plusieurs organes et plus généralement étudier les cellules dans des environnements complexes [51, 52, 53]. La figure 3.1 montre quelques exemples de substrats de culture *in vitro* courbés et/ou déformables.

In vivo, la majorité des tissus sont courbés ; il y a donc un intérêt croissant autour de la sensibilité des cellules à la courbure [9, 58]. La première image 1.5.a montre un substrat sinusoïdal 3D permettant d'étudier le comportement et la migration de cellules sur un substrat courbé. La deuxième image montre des cellules cultivées sur un substrat enroulé, par Tomba et al. [55], permettant d'étudier la réaction de tissus à un changement rapide de courbure, montrant une réponse cellulaire active et transitoire pour garantir l'intégrité tissulaire sous déformation.

Les deux dernières images (fig. 1.5.c et d) montrent des milieux imitant des organes précis. La première (fig. 1.5.c) montre un micro-poumon, sur lequel des cellules sont cultivées, qui peut être déformé par des mouvements d'étirement d'un substrat plan. La seconde (fig. 1.5.d) imite des villosités, formées par moulage en collagène (i) et en diacrylate de polyéthylène glycol (PEG-DA)(ii) [57]. Ce modèle a une forme proche de la forme de villosités réelles, mais ne permet pas les échanges d'un côté à l'autre des cellules ou les déformations du substrat. Creff et al. ont également fabriqué des substrats imitant des villosités intestinales avec un hydrogel à base de PEG-DA en utilisant une imprimante 3D avec un laser UV fonctionnant par absorption linéaire (par opposition à la 2PP) [59].

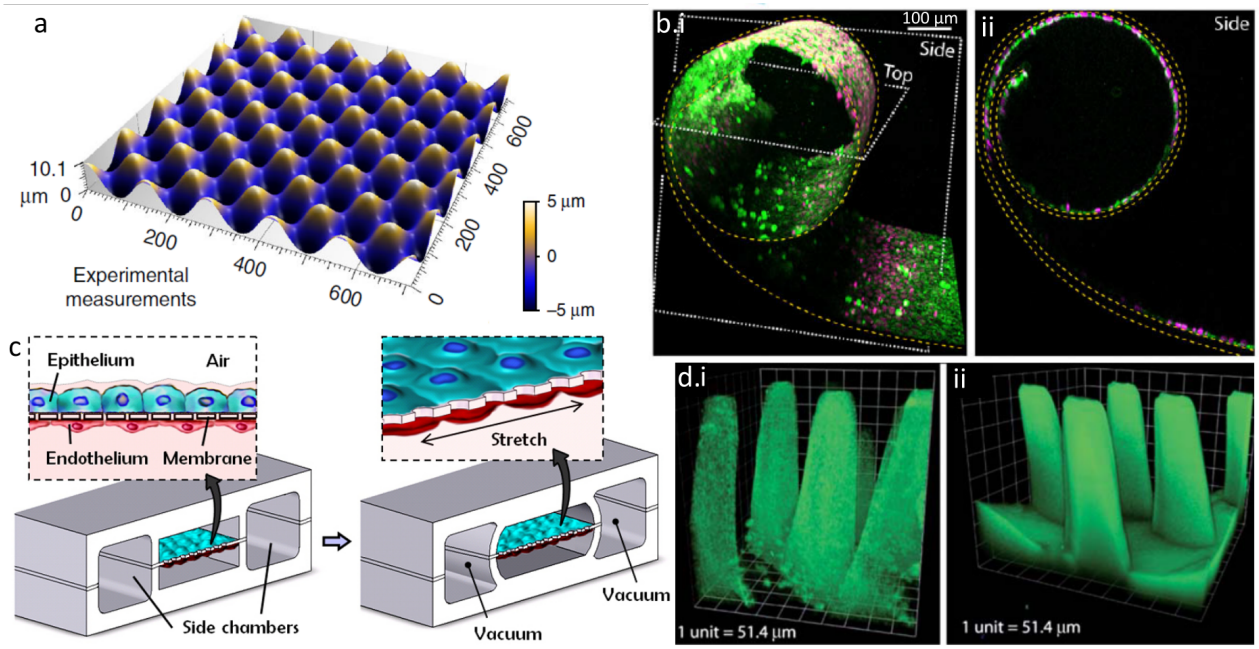


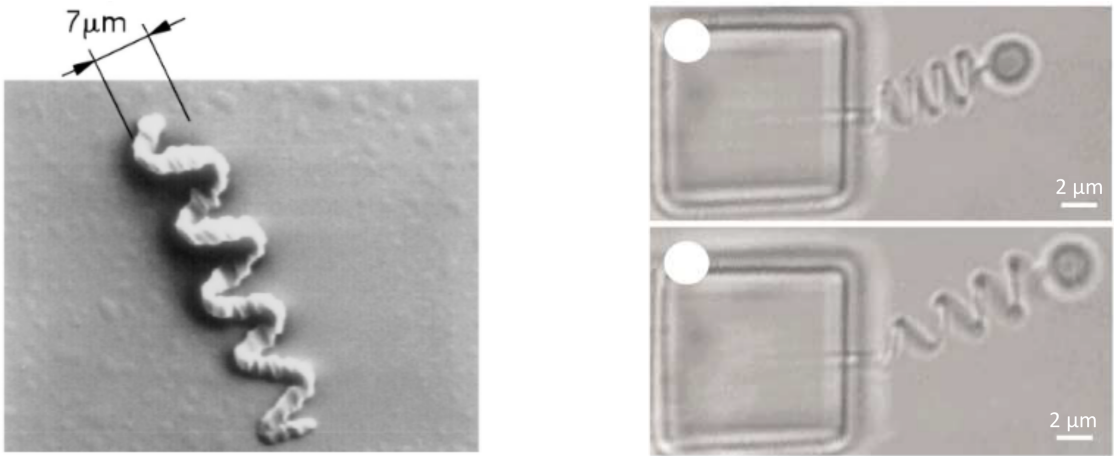
FIGURE 1.5 – Milieux de culture spécialisés. a. Topographies sinusoïdales lisses pour étudier la migration cellulaire [54]. b. Substrat enroulé entraînant une déformation cylindrique d'une monocouche de cellules épithéliales (microscope confocal, vert = membrane cellulaire, magenta = noyaux cellulaires) [55]. c. poumon sur puce, microsystème imitant la paroi du poumon humain et ses mouvements de respiration [56]. d. Structures 3D imitant des villosités fabriquées par moulage au microscope confocal, (i) en collagène, (ii) en PEG-DA [57].

Les modèles d'intestin, dont les villosités intestinales, sont nombreux, car cet organe est particulièrement difficile à imiter et son fonctionnement est encore mal compris, mais la plupart des modèles se concentrent sur un seul paramètre : par exemple la forme, la porosité, ou la déformation d'une membrane plane [52]. Combiner plusieurs de ces paramètres aiderait à comprendre le fonctionnement de la digestion et l'absorption de nutriments.

1.3 Impression 3D par polymérisation à deux photons

La lithographie à échelle micrométrique a longtemps été limitée aux objets en deux dimensions. En 1997, Maruo et al. utilisent l'absorption à deux photons pour polymériser une résine photosensible avec un laser commandé [1], et parviennent à imprimer en 3D réelle, qui n'est pas un empilement de structures 2D (fig.1.6a). Cette technologie s'est rapidement développée, en particulier vers une utilisation pour la fabrication de micromachines. Kawata et al. ont par exemple fabriqué un micro-oscillateur avec une pince optique en 2001 (fig. 1.6b) [60].

La 2PP est basée sur l'absorption à deux photons, qui est l'absorption simultanée de deux photons ou plus par une molécule, l'excitant dans un état de plus haute énergie. Elle est non-linéaire, étant proportionnelle au carré de l'intensité lumineuse, et se fait dans un volume très réduit, inférieur à 1 μm^2. Dans le cas de la 2PP, on excite une résine photosensible qui durcit, la plupart du temps



(a) Première structure 3D fabriquée par 2PP par Maruo et al. [1]

(b) Micro-oscillateur fabriqué par 2PP par Kawata et al. [60]

FIGURE 1.6 – Débuts de l'impression à 2 photons.

par polymérisation, lors de l'exposition à un laser. La petite taille de la partie polymérisée permet d'avoir une résolution voisine de 1 µm.

Initialement, les sources laser utilisées pour le 2PP étaient des femtolasers Ti-Saphir, systèmes onéreux et encombrants. Un travail a été fait sur les résines pour intégrer des photo-initiateurs différents, excités à des longueurs d'ondes plus faibles, permettant d'imprimer avec des micro-lasers beaucoup moins coûteux [61].

Aujourd'hui, la polymérisation à deux photons (2PP) permet de fabriquer des structures tridimensionnelles complexes de tailles comprises entre quelques microns et quelques centaines de microns, avec une résolution de quelques centaines de nanomètres au mieux. Les éléments clés de cette technologie sont une résine photosensible, un laser pulsé, une platine de positionnement précise, souvent piézoélectrique, et un ordinateur pour contrôler le tout. La technique est plus détaillée dans la partie 2.2.1.

La 2PP est un processus optique non linéaire basé sur l'absorption simultanée de deux photons dans une résine photosensible [62]. Les photo-initiateurs présents dans la résine se transforment en radicaux qui polymérisent localement la résine (photopolymérisation radicalaire).

Généralement, le substrat sur lequel sont imprimés les objets par 2PP est une lamelle de verre. Le verre se prête bien à cette utilisation car il est stable chimiquement et transparent, permettant au laser de passer à travers. Cependant, l'impression sur substrats opaques pourrait être utile à certaines applications biomédicales, par exemple pour fabriquer des structures poreuses sur des implants pour promouvoir la croissance cellulaire [63].

1.3.1 Substrat métallique (opaque et réfléchissant)

Peu d'équipes ont travaillé sur l'impression à deux photos sur substrats opaques, et encore moins sur substrats métalliques. En effet, l'impression sur ces derniers est particulièrement délicate car leur surface est réfléchissante. Des structures 2D ont été fabriquées avec succès sur substrats opaques

[64, 65] mais ce sont des structures simples en une couche sur le substrat. Pour des impressions en 3D sur surfaces opaques et métalliques, Rekštytė et al. ont fait un travail extensif [11, 66], en imprimant sur plusieurs métaux (Cr, Al, Fe, Ti, Au). L'impression sur métal présente des défis car le laser est réfléchi sur le substrat, ce qui nécessite un ajustement de la puissance de ce dernier.

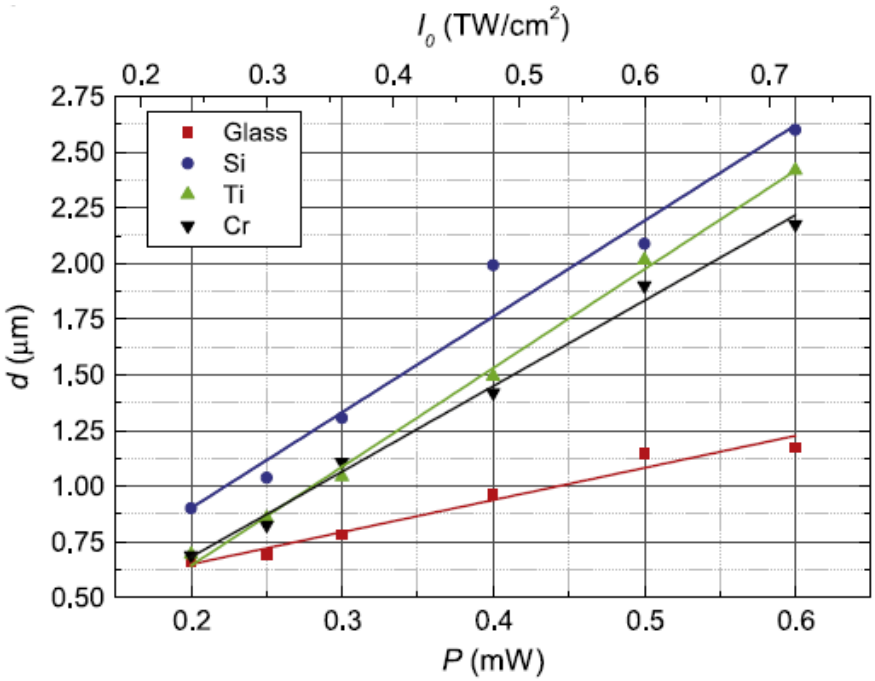


FIGURE 1.7 – Épaisseur de lignes imprimées sur différents matériaux en fonction de la puissance du laser [66].

En effet, la figure 1.7 montre que l'épaisseur d'une ligne imprimée par 2PP varie fortement suivant le matériau sur laquelle elle est imprimée. En particulier, on remarque que les lignes imprimées sur verre sont environ 2 fois plus étroites que sur les autres matériaux testés (SI, Ti, Cr). La même manipulation a été faites avec une couche d'or dans le même article [66], et la différence était plus faible. Il est également dit que pour des puissances plus élevées, la résine brûle sur les matériaux autres que le verre, à cause de l'absorption du laser par le métal entraînant un échauffement local du substrat et de la résine.

La figure 1.8 montre l'impression sur couche d'or par cette équipe, on y voit la différence de fabrication entre un substrat verre nu et recouvert d'or : les lignes sont plus épaisses sur l'or et on y constate un défaut de fabrication au niveau du pied des structures. Le défaut est tel que ces structures seraient parties au rinçage si elles n'étaient pas accrochées coté verre.

Le laser chauffe également le substrat métallique lors de la 2PP. Harnisch et al. ont étudié cet effet ainsi que son influence lors de l'impression sur métal [67]. L'augmentation en température varie suivant les métaux. Ce chauffage modifie la réflectivité du matériaux ainsi que les propriétés de la résine. L'impression sur métaux est donc bien plus compliquée que sur verre, de nombreux facteurs rentrant en compte.

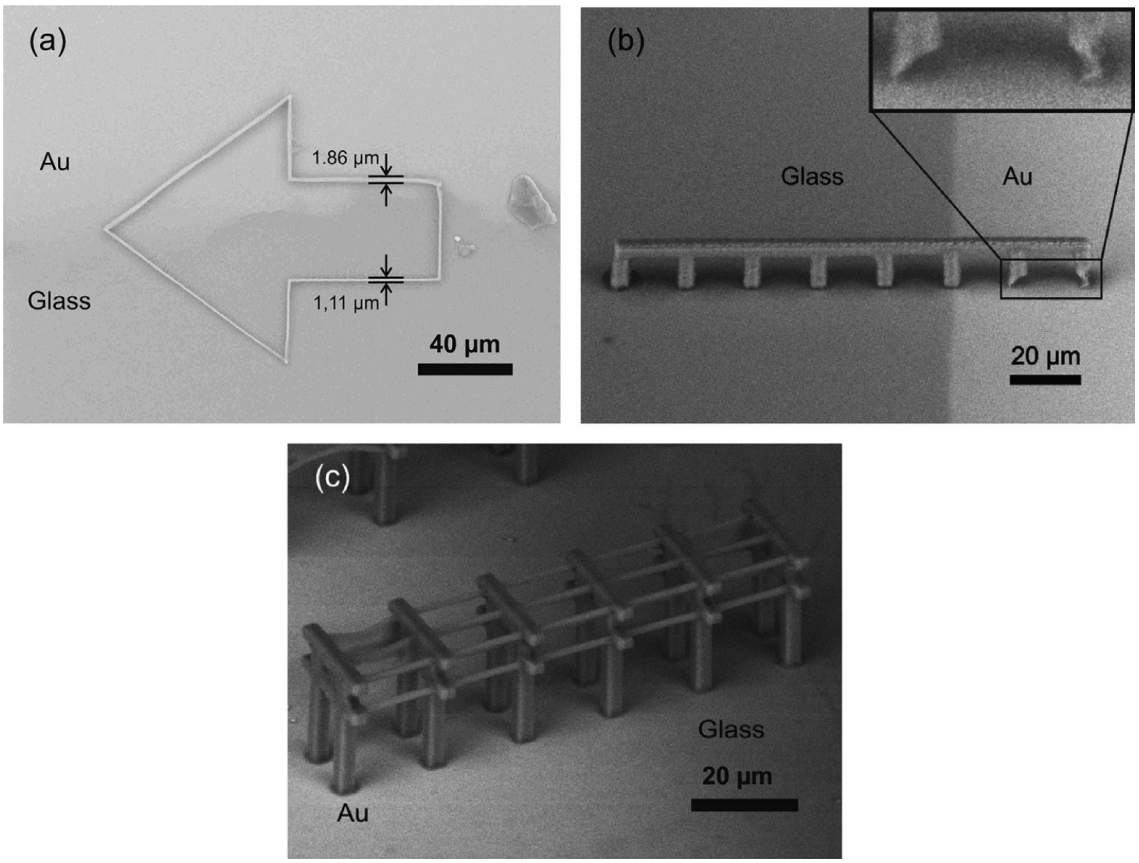


FIGURE 1.8 – Structures imprimées sur une lamelle de verre partiellement couverte d'or [66]. a. Flèche ; les parties imprimées sur le verre sont plus fines que celles sur l'or. b. Aqueduc ; la base des colonnes sur l'or n'est pas carrée. c. Lignes électriques ; Paramètres d'impression ajustés.

1.3.2 Combinaison de plusieurs résines

Pour nos travaux du chapitre 3, nous souhaitons utiliser plusieurs résines pour fabriquer une même structure 3D, en l'occurrence une résine polymère (Ormocomp, voir section 2.1.1) et une résine sous forme d'hydrogel à base de collagène et de gélatine (voir section 2.1.2). Fabriquer des structures hybrides permet d'exploiter les propriétés différentes de plusieurs matériaux. Très peu de travaux ont été faits sur ce type d'hybridation de matériaux en 2PP.

Dans la littérature, deux stratégies sont envisagées, qui se basent sur le même principe :

— imprimer avec le premier matériau, rincer la résine non durcie normalement puis déposer le deuxième matériau, imprimer puis rincer à nouveau. C'est la méthode employée par Hu et al. [68] et Engelhardt et al. [69, 70], dont les structures sont montrées figure 1.9.

— utiliser un système micro-fluidique pour pomper des résines photosensibles et des solvants successivement vers l'échantillon. Ceci permet d'imprimer avec plusieurs résines en plusieurs étapes sans déplacer l'échantillon. Mayer et al. [71] ont développé un tel système.

Engelhardt et al. utilisent d'abord une résine polymère afin de créer un squelette stable pour construire un échafaudage 3D en albumine de sérum bovin (BSA), qui est plus fragile, dans le but de l'utiliser pour de la culture cellulaire. Ils ont aussi utilisé de la gélatine methacrylamide (GelMAAm) en remplacement du BSA.

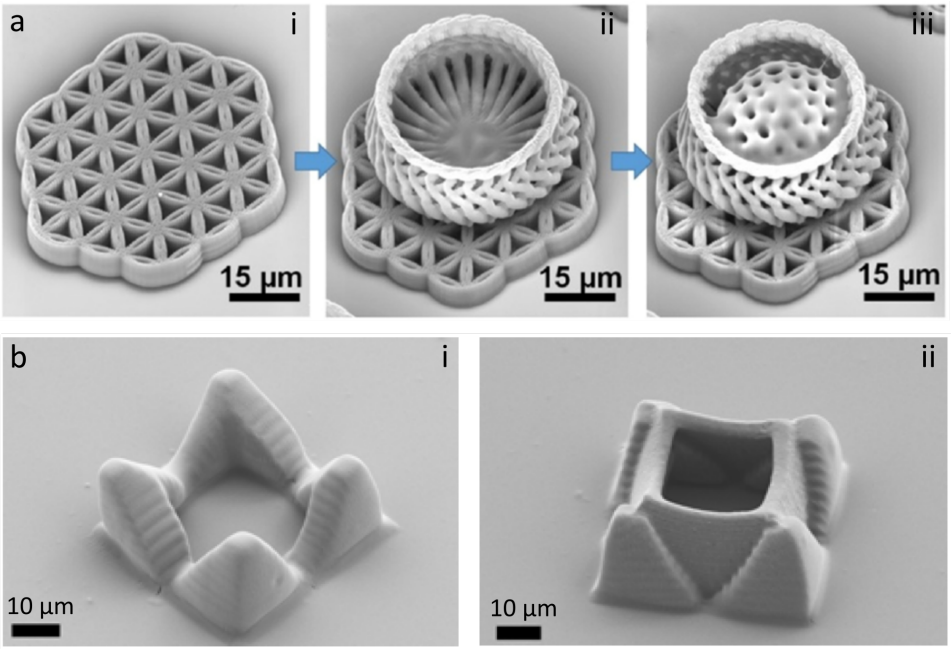


FIGURE 1.9 – Images MEB de structures hybrides. a. à base de matériaux monomères par Hu et al. [68]. i. base en TCDMDA ii. avec panier en PETA. iii. et balle en PEGDA. b. Polymère et BSA. [69] i. Squelette en polymère. ii. avec cube en BSA.

Imprimer en 2PP avec plusieurs résines est très nouveau, mais quelques équipes ont démontré la faisabilité. Ça n'a encore jamais été fait pour fabriquer des micro-robots.

La micro-impression 3D à 2 photons est une technique de micro-fabrication en plein essor, qui continue à se développer depuis une vingtaine d'années. L'impression sur substrats métalliques et l'hybridation de résine sont très peu approfondies, mais sont d'un intérêt particulier pour cette thèse.

1.4 Magnétisme

Pour actionner nos micro-robots, on utilise les interactions magnétiques à distance : des billes de NdFeB sont accrochées aux structures, puis les micro-robots sont placés dans un champ magnétique, qui peut être généré par un aimant massif ou par des électroaimants. Ici, je présente les aimants NdFeB ainsi que des concepts de base de magnétisme, en particulier les forces et couples générés sur un aimant dans un champ magnétique, utiles à la compréhension du reste de cette thèse.

1.4.1 Aimants NdFeB

Les différents aimants utilisés pour ces travaux, que ce soit les billes incorporées dans les micro-robots, les substrats pour positionner les billes ou les aimants macroscopiques pour actionner les structures (présentés dans la partie 2.1) sont composés d'un alliage néodyme - fer - bore. Le matériau magnétique $Nd_2Fe_{14}B$, découvert en 1984 [72, 73], présente les meilleures performances (aimantation rémanente et coercivité) en tant qu'aimant permanent à température ambiante.

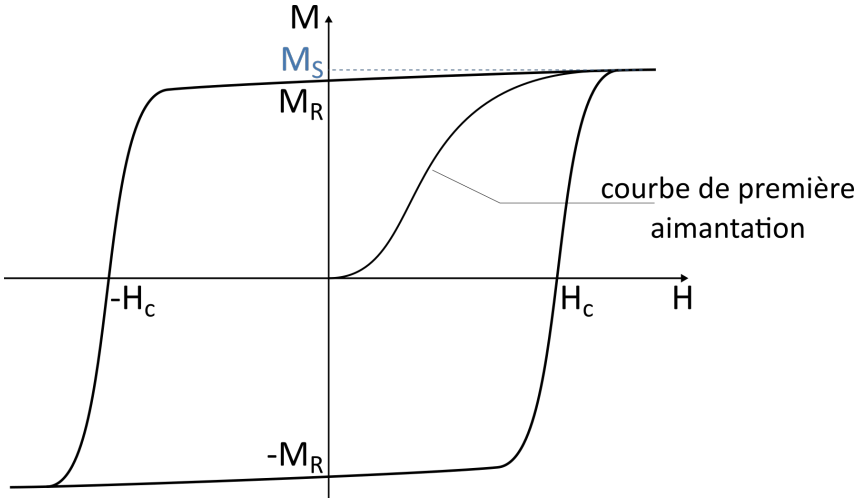


FIGURE 1.10 – Cycle d'hystérésis d'un matériau magnétique dur. En abscisse : champ appliqué au matériau ; en ordonnée : aimantation. Pour un aimant NdFeB, $\mu_0 M_R \approx 1,4\ T$ et $1\ T < \mu_0 H_c < 2\ T$.

Les propriétés d'un matériau magnétique sont déterminées en mesurant l'évolution de son aimantation M en fonction d'un champ appliqué H, ce qui permet de tracer son cycle d'hystérésis (fig. 1.10). M_S est la valeur d'aimantation à saturation, M_R l'aimantation rémanente quand le champ appliqué est nul, H_c la coercivité, soit la résistance à la désaimantation.

À température ambiante (300 K), la rémanence des alliages NdFeB courants vaut jusqu'à 1,4 T et la coercivité 1 à 2 T [74]. Cette coercivité baisse significativement quand la température augmente, pouvant atteindre 50 mT à 200°C pour un aimant qui a une coercivité de 1,7 T à température ambiante. On utilisera cette propriété pour fabriquer nos pièges à billes en retournant localement l'aimantation en champ faible (partie 4.2.4).

La forte rémanence des aimants NdFeB les rend particulièrement adaptés à nos applications, puisqu'elle permet de générer des champ forts.

1.4.2 Actionnement magnétique

Nos micro-robots sont actionnés magnétiquement, grâce aux billes accrochées aux structures et à un champ magnétique extérieur. Quand un aimant est soumis à un champ magnétique, il subit un couple $\vec{\tau}$ et une force $\vec{F}$:

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \wedge \vec{B} \tag{1.1}$$

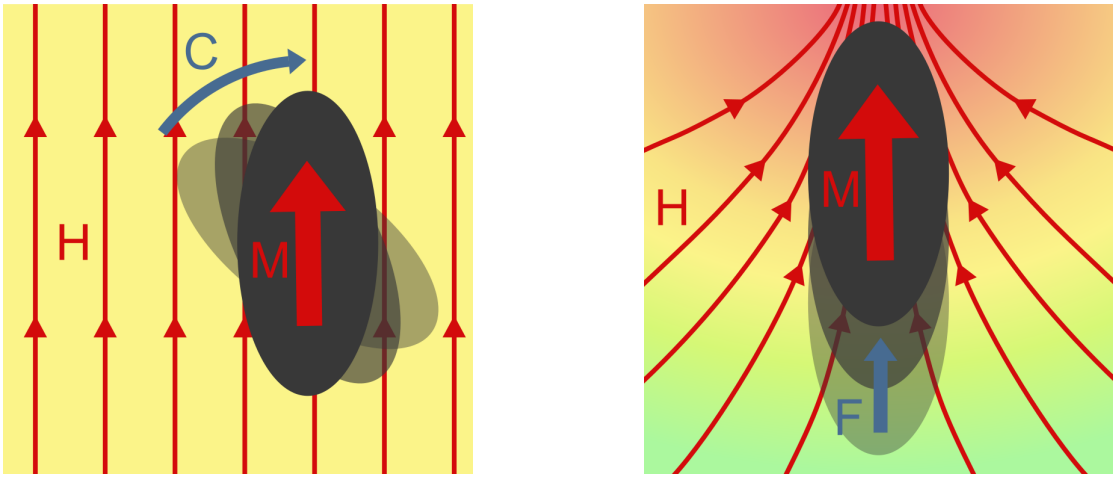
$$\vec{F} = \nabla(\vec{\mu} \cdot \vec{B}) \tag{1.2}$$

avec B l'induction magnétique et μ le moment magnétique. L'induction B et le champ H sont liés dans le vide par $B = \mu_0 H$, avec μ_0 la perméabilité magnétique du vide.

Ces efforts qui s'appliquent sur l'aimant sont le moteur de l'actionnement de l'objet. L'équation 1.1 dit que dans un champ extérieur, un aimant va en permanence chercher à s'aligner au champ

(fig. 1.11a). Ainsi, un champ non aligné avec l'aimantation de l'aimant va induire un couple sur l'aimant, permettant d'actionner une structure à laquelle il est lié. Plus l'angle entre l'aimantation de l'aimant et le champ magnétique est élevé, plus le couple est fort, le maximum étant quand l'angle entre l'aimantation et le champ est de 90°.

En revanche, pour appliquer une force à un aimant, un champ homogène ne suffit pas et il faut lui appliquer un gradient de champ. La force appliquée sur l'aimant est proportionnelle au gradient du champ magnétique, entraînant son déplacement dans la direction de la force, donc du gradient (fig. 1.11b).



(a) Alignement dans le champ : couple. (b) Translation suivant le gradient : force .

FIGURE 1.11 – Mouvements d'un aimant suivant le champ et le gradient magnétiques.

Il est important de connaître le couple $\vec{\tau}$ subi par la bille magnétique et transmis au reste de la structure pour pouvoir faire des calculs théoriques et des simulations. Pour ce faire, il faut d'abord calculer le moment magnétique de la bille $\vec{\mu}$, qui est lié à l'aimantation de la bille M par $M = \frac{d\vec{\mu}}{dV}$. Le moment magnétique dépend ainsi du volume de la bille V. Les billes NdFeB que nous utilisons (voir partie 2.1.3) ont une aimantation rémanente maximale de 752 mT et un volume de $V = \frac{4}{3}\pi(15.10^{-6})^3 \approx 1,4.10^{-14}\ m^3$ pour une bille de rayon 15 µm. Pour une aimantation selon Ox, on a :

$$\vec{\mu} = M \times V \times \vec{x} = 840.10^{-11}.\vec{x}\ N.m.T^{-1} \tag{1.3}$$

L'unité standard du moment magnétique est le $A.m^2$, mais j'utilise ici $N.m.T^{-1}$ pour insister sur la relation entre B et le couple et faciliter le calcul de ce dernier. Le couple dépend également de l'induction magnétique $\vec{B}$ et de l'orientation de la bille par rapport à celle du champ magnétique. Faisons un rapide calcul pour avoir un ordre de grandeur des couples maximums produits dans notre cas. Pour ce calcul, l'aimantation de la bille est perpendiculaire au champ. Ainsi, on a :

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \wedge \vec{B} = MV\vec{x} \wedge B\vec{y} = MVB\vec{z} \tag{1.4}$$

On applique à nos micro-robots des champs extérieurs compris entre 10 et 100 mT, pour ce calcul on prendra $B = 50mT$. On a donc :

$$\tau = 42.10^{-11}\ N.m = 420\ \mu N.\mu m \tag{1.5}$$

Ainsi, on choisira des valeurs de quelques centaines de µN.µm pour les simulations. Nous choisissons de parler de µN.µm car cette unité est plus parlante à nos échelles.

On appliquera ces bases élémentaires de magnétostatique dans les 3 autres chapitres, pour décrire les aimants utilisés ainsi que pour déplacer les billes et actionner les structures.

Chapitre 2

Matériaux et méthodes

L'objet de ce chapitre est de présenter la démarche expérimentale établie afin de répondre à la problématique exposée dans l'introduction. Ainsi, je détaillerai les différents matériaux, techniques expérimentales et logiciels employés lors du design et de la fabrication des micro-robots magnétiques. Ce chapitre décrit à la fois des équipements et matériaux commerciaux, et d'autres développés dans nos laboratoires.

2.1 Matériaux

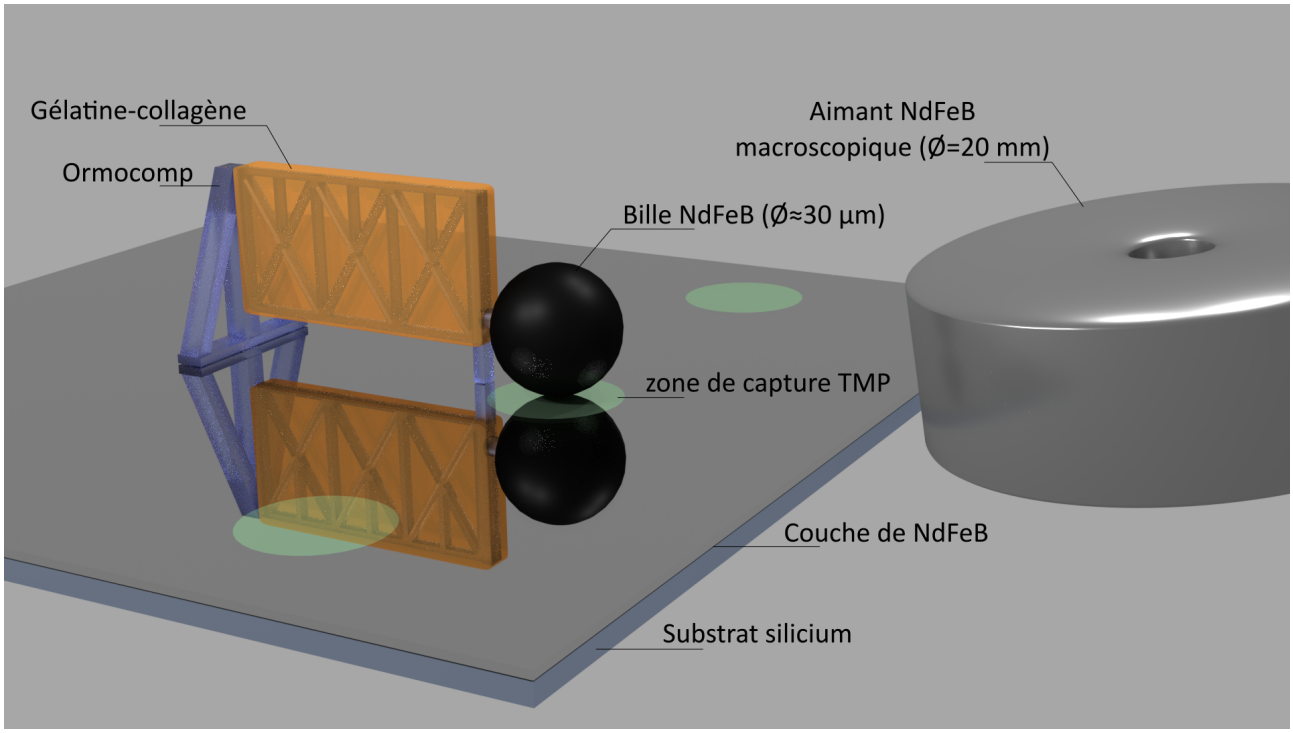


FIGURE 2.1 – Présentation des matériaux utilisés dans ce travail. NB : l'aimant macroscopique est placé à 2 cm de distance.

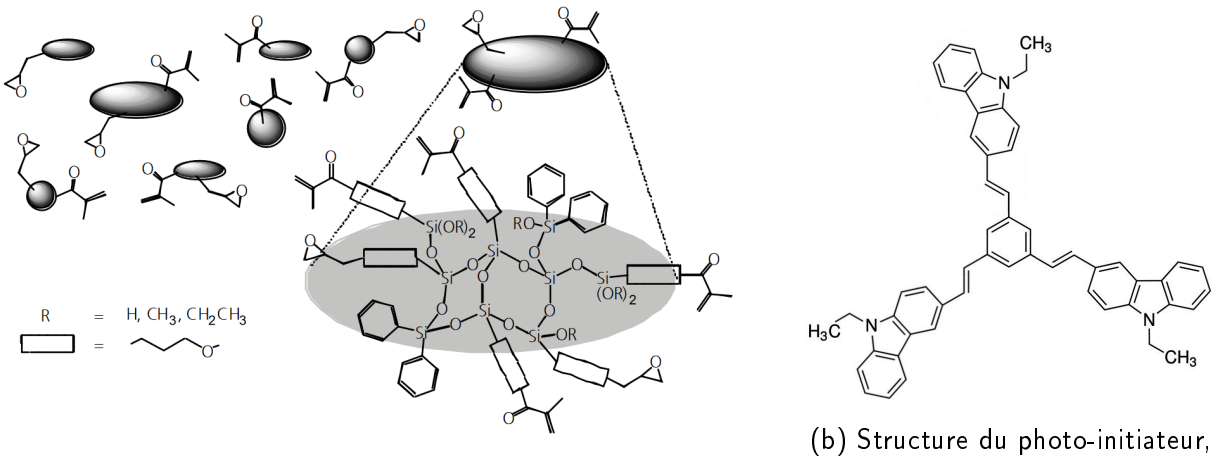
Pour fabriquer les microstructures magnétiques hybrides 3D, j'ai utilisé de nombreux matériaux, tels que des résines photosensibles, de la gélatine méthacrylate, et des billes magnétiques (fig. 2.1). Dans cette section, je décris ces matériaux, ainsi que leur protocole de fabrication le cas échéant.

2.1.1 Résine sol-gel

Pour fabriquer des micro-structures grâce à la polymérisation à deux photons, on utilise des résines photosensibles. La résine que j'ai le plus utilisée est à base d'Ormocomp [75], une résine commerciale. L'Ormocomp est un polymère hybride inorganique-organique, fabriqué par procédé sol-gel. Il est constitué de nanoparticules de silice (diamètre de 3 nm) dont la surface est greffée par des groupements photopolymérisants et plastifiants (fig. 2.2a). Il ressemble à du verre lorsqu'il est durci, tant par ses propriétés physico-chimiques que par son apparence. Après durcissement, il a une excellente transparence, de bonnes propriétés mécaniques et a une bonne fidélité de réplication. Il est également biocompatible, et peut donc être utilisé pour de nombreuses applications en biologie. Ces qualités sont utiles pour la fabrication de micro-robots, ce pourquoi nous travaillons avec l'Ormocomp.

La résine utilisée pour ces travaux est préparée selon le protocole suivant :

— Dans un flacon de 5 mL, dissoudre 6 mg de photo-initiateur 1,3,5-tris(2-(9-ethylcabazyl-3)ethylene)benzene dans 1 mL de dichlorométhane. Pour aider à la dissolution, le flacon est mis dans un bain à ultrasons pendant quelques secondes.
— Ajouter 1 g d'Ormocomp ;
— Couvrir le flacon de papier aluminium pour protéger la résine des UVs ;
— Insérer un agitateur magnétique dans le flacon, et agiter la solution pendant 1h avec le flacon fermé ;
— Ouvrir le flacon et attendre jusqu'à évaporation du dichlorométhane (environ 4 heures).



(a) Structure chimique de l'ORMOCER, sur lequel est basé l'Ormocomp.

(b) Structure du photo-initiateur, 1,3,5-tris(2-(9-ethylcabazyl-3)ethylene)benzene

FIGURE 2.2 – Structure chimique des composants de la résine.

Un photo-initiateur est ajouté à l'Ormocomp commercial pour permettre la polymérisation de la

résine à une puissance de laser plus faible. En effet, à puissances trop élevées, il y a apparition de bulles au point focal du laser, celui-ci chauffant localement la résine au dessus de son point d'ébullition. La structure délocalisée du photo-initiateur (alternance de simples et doubles liaisons, figure 2.2b) lui confère une bonne section efficace d'absorption, augmentant la probabilité de photopolymérisation lors de l'exposition laser. De plus, sa taille élevée limite la diffusion des radicaux formés lors de l'exposition laser, donc la taille du point polymérisé.

L'étape de dissolution du photo-initiateur dans le dichlorométhane permet au premier d'être uniformément dispersé dans l'Ormocomp, qui est très visqueux. La résine finale est ainsi un liquide visqueux transparent incolore.

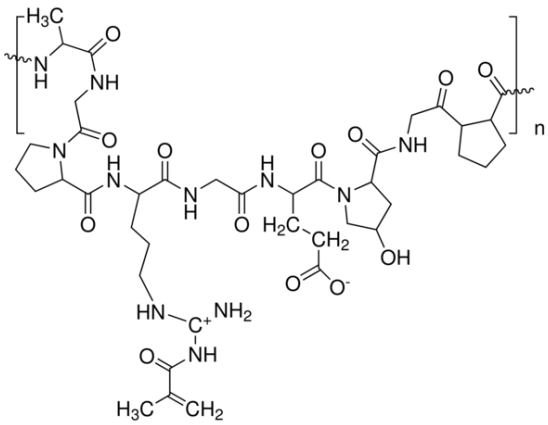
Pour le reste de ce manuscrit, quand je ferai référence à la résine Ormocomp, je parlerai de cette formulation.

2.1.2 Résine hydrogel

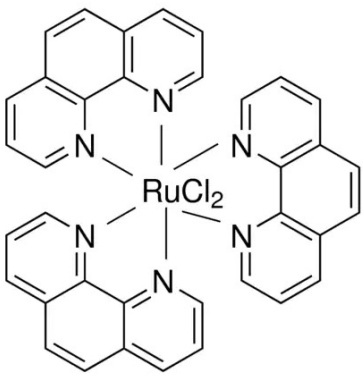
La seconde résine que j'ai utilisée est un hydrogel à base de gélatine et de collagène, et composé de 80 % d'eau, développé au LiPhy [76]. Un hydrogel est un système réticulé de longues chaînes moléculaires diluées dans l'eau, ne présentant aucun écoulement lorsqu'il est à l'état stable. Au niveau macroscopique, c'est un solide.

La gélatine que nous utilisons est extraite de peau de bovins et le collagène de queue de rats. Cet hydrogel est donc biocompatible. Il permet d'imiter des tissus biologiques tant par ses propriétés mécaniques que chimiques. Pour le préparer, j'ai suivi le protocole suivant :

— Dans un flacon, dissoudre 10 mg de dichlorotris(1,10-phenantroline)ruthenium(II) hydrate dans 1 mL d'eau déminéralisée.
— Ajouter 200 mg de gélatine (Gelatin methacryloyl, Sigma–Aldrich) et 30 mg de collagène (collagen from rat tail, Sigma–Aldrich).
— Insérer un agitateur magnétique et chauffer en mélangeant jusqu'à homogénéisation (4h environ).



(a) Structure chimique de la gélatine methacrylate.



(b) Structure du photo-initiateur, complexe de ruthénium.

FIGURE 2.3 – Structure chimique des composants de la résine.

Les groupes méthacrylate de la gélatine (fig. 2.3a) sont photopolymérisables et permettent d'incorporer les fibres de collagène pendant la réaction de polymérisation initiée par le ruthénium lors de l'exposition laser. Dans l'état excité, on génère des radicaux au niveau des ligands azote du ruthénium (fig. 2.3b) qui peuvent arracher des protons sur les groupements amine de la gélatine, ou bien directement réagir avec les groupements méthacrylate. La désexcitation du complexe passant par l'état triplet, on peut aussi penser qu'il génère au point focal de l'oxygène singulet O=O, lui aussi capable de réticuler la gélatine.

L'hydrogel obtenu est solide à température ambiante et devient liquide aux alentours de 35 - 40°C. Il est de couleur orange car il contient du ruthénium, mais demeure transparent. Pour faciliter l'impression, l'agitateur magnétique doit rester dans le flacon, permettant de chauffer uniformément l'hydrogel pour obtenir une solution. Les structures fabriquées avec cet hydrogel ne peuvent être séchées ou lyophilisées du fait de la grande proportion d'eau qu'elles contiennent, et doivent être gardées dans l'eau après rinçage.

Pendant le reste de ce manuscrit, les mentions « gélatine » et « gélatine-collagène » font référence à cet hydrogel.

2.1.3 Billes magnétiques

Les billes d'aimant NdFeB que nous utilisons sont à l'origine une poudre magnétique commerciale obtenue par atomisation, destinée à la fabrication d'aimants liés. La plupart des particules sont parfaitement sphériques, mais ont des diamètres variant largement, entre 5 µm et 60 µm environ. Certaines particules sont cassées mais à un pourcentage assez faible et cela n'impacte pas notre travail. Pour nos applications, nous avons trié les billes selon leur taille (voir partie 4.2.3) car nous souhaitons utiliser des billes de diamètres compris entre 20 et 50 µm suivant la force magnétique souhaitée pour les différentes structures.

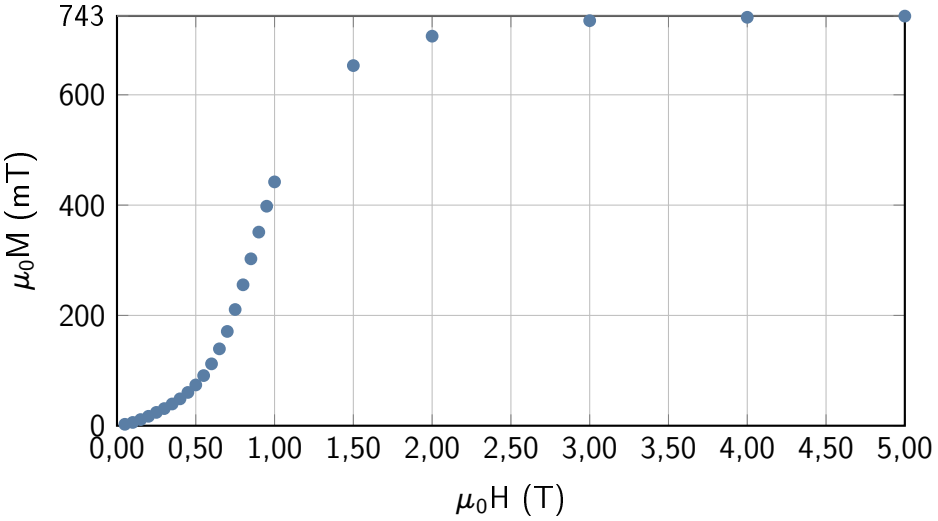


FIGURE 2.4 – Courbe de première aimantation des billes magnétiques.

L'aimantation rémanente maximale de ces billes est 730-760 mT d'après le constructeur [77]. La courbe de première aimantation des billes (fig. 2.4) permet de mesurer une aimantation à sa-

turation de 743 mT, ce qui correspond bien à ces valeurs. Grâce à ce graphique, on peut estimer l'aimantation des billes après qu'elles aient été aimantées dans différents champs plus faibles (ce qui est notre situation expérimentale dans certains cas). On fait l'hypothèse forte que les billes gardent l'aimantation maximale atteinte pour un champ donné.

2.1.4 Aimant permanent

Pour plusieurs applications décrites dans la partie suivante (aimantation des billes partie 2.2.2.1 et actionnement des structures partie 2.2.3.1), j'utilise un aimant massif NdFeB macroscopique pour activer les micro-robots. Les aimants NdFeB ont une rémanence importante et permettent donc de générer des champs élevés, ce qui est intéressant pour nos applications.

L'aimant que j'utilise est un cylindre de hauteur 1 cm et de diamètre 2 cm, avec un trou axial de 4 mm de diamètre. Son aimantation est d'environ 1,2 T. Connaître le champ émis par cet aimant est utile pour au moins avoir un ordre de grandeur du champ appliqué sur les billes. On nomme l'avant et l'arrière de l'aimant ses pôles magnétiques. Cet aimant a été choisi pour ses propriétés magnétiques ainsi que pour sa forme : le trou permet d'insérer une axe pour faire tourner l'aimant pour produire un champ tournant.

Dans Comsol Multiphysics 5.6, j'ai simulé cet aimant avec les valeurs ci-dessus, et ai obtenu les résultats présentés figure 2.5.

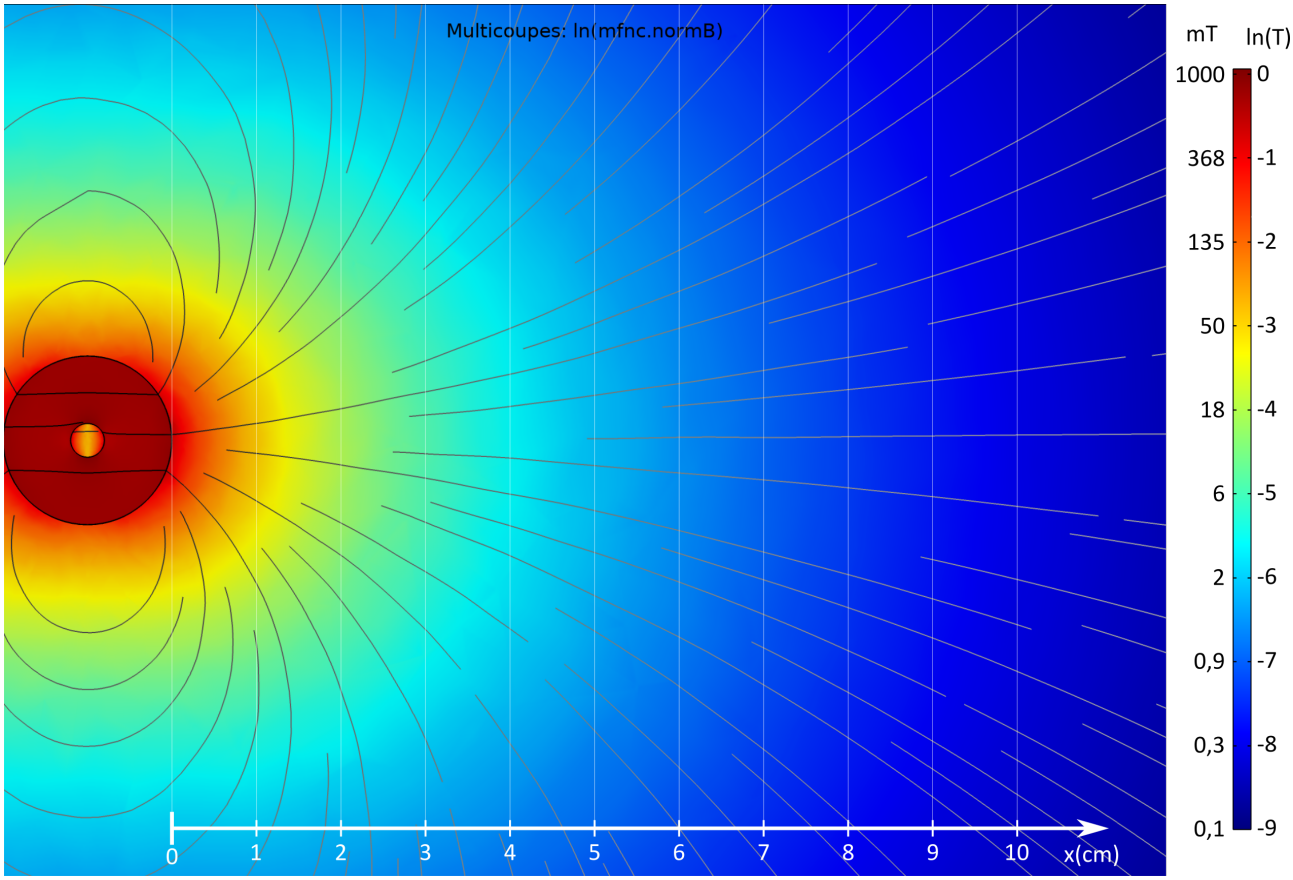


FIGURE 2.5 – Simulation du champ de l'aimant en 3D (vue de dessus).

Cette figure illustre la distribution caractéristique du champ à une certaine distance autour d'un aimant ponctuel. Sa valeur varie suivant l'orientation par rapport à l'axe de l'aimant, étant 2 fois plus faible sur les cotés de l'aimant qu'en face de celui-ci, à distance égale. Ainsi, si on fait tourner l'aimant près d'un échantillon, la valeur du champ total au niveau des structures, et donc son effet, varie du simple au double. Cependant, cette variation est assez faible pour pouvoir faire des tests préliminaires d'actionnement.

Pour actionner les billes faiblement aimantées à distance, il faut un champ supérieur à 10 mT d'après des tests préliminaires : il faut donc que les échantillons soient à moins de 3 cm de la surface de l'aimant. Cette distance est tout à fait envisageable pour pouvoir actionner des micro-robots magnétiques en les observant au microscope.

Cet aimant est également utilisé pour aimanter partiellement les billes (voir section 2.2.2.1), en l'approchant au contact de la lamelle sur laquelle est construit l'échantillon. Les lamelles de verre ont une épaisseur entre 0,13 mm et 0,17 mm, donc d'après la figure 2.5 les billes sont dans un champ d'environ 500 mT (ce qui leur confère une aimantation de l'ordre de 75 mT d'après la figure 2.4).

2.1.5 Substrats magnétiques TMP

Pour le chapitre 4, des substrats magnétiques sont utilisés dans le but d'améliorer le protocole de fabrication d'objets avec billes magnétiques. Ils sont appelés aimants TMP, ou Thermo-Magnetically Patterned micromagnets. Ces substrats consistent en un wafer de silicium de 100 mm de diamètre sur lequel un film de 4 µm d'épaisseur de NdFeB est déposé, entre deux couches de tantale de 100 nm, qui empêchent la diffusion dans le Si et l'oxydation du NdFeB. Après recuit de cristallisation, le film final a une coercivité de 1,9 T à 300 K, et une aimantation rémanente de 1,4 T pour des films anisotropes [10]. Ces films sont ensuite magnétiquement saturés dans un sens puis réaimantés localement dans l'autre sens pour donner un motif magnétique au film de NdFeB. On utilise ces substrats comme "pièges à billes", le but étant de placer précisément les billes avant l'impression. Cette méthode est expliquée partie 2.2.4.

2.2 Méthodes

2.2.1 Micro-impression 3D

La micro-impression 3D est une technique permettant de fabriquer des objets de dimension micrométrique, qui ne nécessite pas de conditions spéciales telles qu'une salle blanche ou l'utilisation de produits dangereux. Elle est basée sur l'absorption à 2 photons, et est donc parfois appelée polymérisation à deux photons (2PP).

2.2.1.1 Principe

Lorsqu'un laser est focalisé dans une résine photosensible transparente, au point focal, la densité de photons du laser est assez élevée pour que l'absorption à deux photons se produise. Cette dernière est l'absorption simultanée de deux ou plusieurs photons par une seule molécule, qui passe alors de l'état fondamental à un état excité. Cette absorption à deux photons est non-linéaire, étant proportionnelle au carré de l'intensité lumineuse. La 2PP exploite cette nature non-linéaire, permettant de polymériser seulement un petit volume ($<1\mu m^3$) au point focal du laser, et non tout le volume illuminé par la source lumineuse comme en photo-polymérisation classique (insolation à 1 photon). Dans le cas de la 2PP, les photo-initiateurs présents dans la résine sont activés par cette absorption, ce qui solidifie la résine. Ce mécanisme diffère suivant la résine utilisée. Dans le cas de l'Ormocomp, c'est un processus similaire à une photopolymérisation radicalaire (bien qu'ici on accroche des nanoparticules de silice entre elles), et dans le cas de la gélatine une réticulation.

En polymérisant la résine dans un volume réduit et précis point par point, on peut ainsi fabriquer des structures solides dans une goutte de résine liquide. Pour ce faire, on déplace progressivement le point focal du laser relativement à l'échantillon dans l'espace (x, y, z), ce qui permet d'imprimer des structures 3D de toutes formes.

Après solidification, la résine change légèrement d'indice de réfraction, permettant d'observer directement les objets au microscope optique. Ce changement est léger cependant, et influe très peu le reste de la construction.

Le processus global consiste à déposer une goute de résine sur une lamelle de verre, à imprimer dedans grâce au laser, puis à rincer l'objet pour enlever les produits non solidifiés.

2.2.1.2 Montage

Le montage utilisé lors de ma thèse est compris d'un laser pulsé vert à 532 nm, d'un cube piézoélectrique se déplaçant jusqu'à 100 µm dans les 3 directions x, y et z, d'une platine grande course (12 cm selon Ox, 11 cm selon Oy), et d'un microscope optique inversé (fig 2.6), créé par Microlight3D (https://www.microlight3d.com). Il y a également au Liphy un montage avec une platine piézoélectrique de 300 µm, un peu moins précise. Pour mes impressions, j'utilise principalement un objectif x100 à immersion d'huile, d'ouverture numérique 1,25, et parfois un objectif x40/0,65 à air.

Pour imprimer avec ces imprimantes 3D à 2PP, le substrat utilisé traditionnellement pour les échantillon est une lamelle de verre (nous utilisons des lamelles de 24x24 mm épaisses de 0,13 à 0,17 mm). Sa transparence permet au laser de passer au travers pour imprimer dans la goutte de résine déposée sur la lamelle de verre. Par ailleurs, celle-ci ayant une surface lisse et adhérente pour la plupart des résines, elle est particulièrement adaptée au 2PP.

Le cube piézoélectrique 3D est l'actionneur principal pendant l'impression. Il permet le déplacement de l'échantillon avec une résolution très élevée, théoriquement de l'ordre de 10 nanomètres, la facteur limitant étant alors la taille du point polymérisé. Ainsi, la résolution de l'imprimante est environ de 0,2 µm. La platine grande course a une résolution inférieure au micron, permettant la réplication des structures en un seul lancement, ainsi que le déplacement au sein de l'échantillon.

Le laser émet des impulsions de quelques millisecondes, d'une puissance de quelques milliwatts,

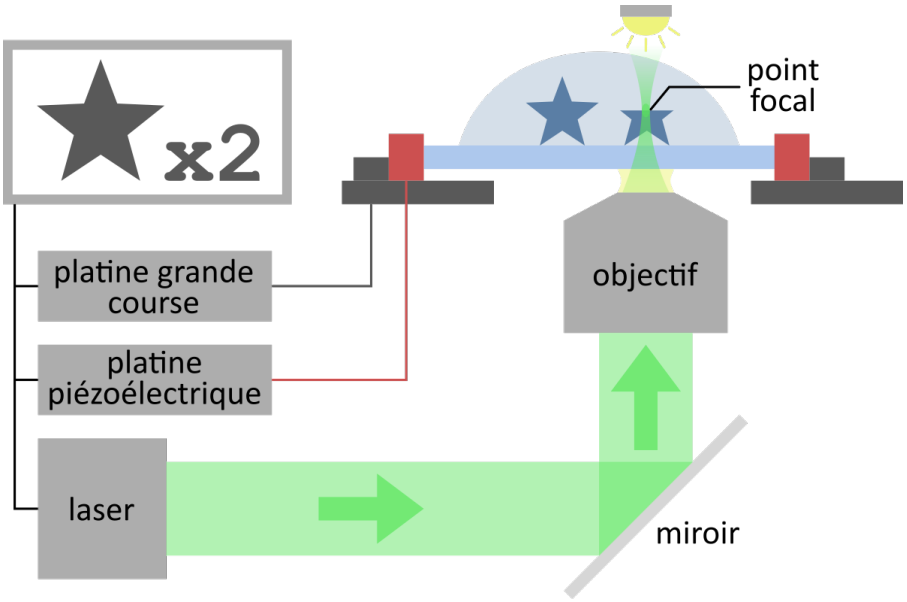


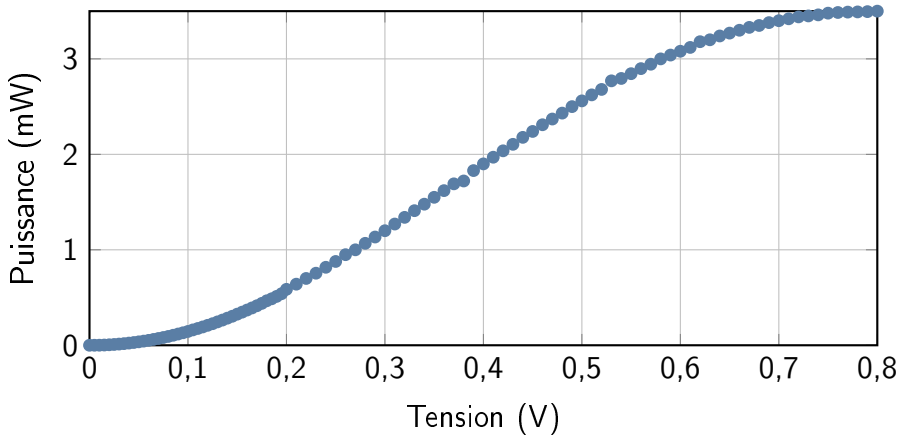
FIGURE 2.6 – Schéma du montage d'impression 3D (Microlight3D).

voire dixièmes de milliwatts. La consigne envoyée au laser est une tension, et la relation entre celle-ci et la puissance émise est présentée figure 2.7. Ces valeurs ont été mesurées directement sur le montage, en plaçant un détecteur au niveau de la pupille d'entrée de l'objectif. Le laser illumine une tache de diamètre légèrement supérieur à la pupille d'entrée de l'objectif pour assurer qu'elle soit entièrement couverte, donc la valeur de puissance mesurée est légèrement supérieure à la valeur au niveau du point focal du laser.

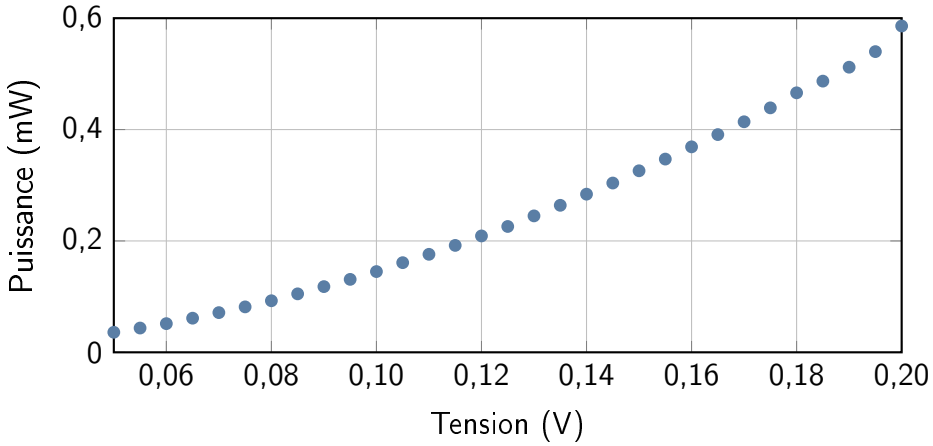
Contrairement à une imprimante 3D classique, la structure n'est pas imprimée de manière continue (filaire par exemple), mais en utilisant une série de points, ou voxels. Un voxel est l'équivalent d'un pixel en 3D. Dans notre cas, avec les paramètres d'impression classiques (Objectif x100, Ormocomp, laser : 0,14 V/0,28 mW, 2 ms), le voxel à une forme ellipsoïdale d'environ 300 à 400 nm selon x et y et 1 µm selon z (fig. 2.8.a.). Cette taille dépend de l'ouverture numérique de l'objectif utilisé : plus celle-ci est élevée, plus le voxel sera comprimé verticalement [62]. Ainsi, avec un objectif x100/1,25, le voxel est plus petit en z qu'avec l'objectif x40/0,65 (voxel de 700 nm par 4-5 µm), ce qui amène à une meilleure résolution après fabrication pour le premier, avec le même fichier d'impression 3D.

2.2.1.3 Fichiers d'impression

Deux logiciels sont nécessaires pour imprimer avec ce montage. Le premier, Simpoly, permet de convertir un fichier .stl (qui décrit un objet 3D par sa surface externe, plus de détails dans la partie 2.3.1) en fichier .tsk, ou "tâche", qui est le format utilisé par le second logiciel, Lithos. Celui-ci se charge de l'impression même, et pilote donc les différents éléments du montage (platines, shutter et puissance du laser). Dans ces deux logiciels, de nombreux paramètres sont modifiables. Il est également possible d'utiliser Simpoly pour des impressions simples, ce qui est pratique pour des tests préliminaires rapides. Lithos permet d'imprimer plusieurs objets avec le cube piézoélectrique et de faire des réplications de l'impression de base avec la platine grande course, en définissant les



(a) Puissance en fonction de la tension, sur la plage entière de valeurs possibles.



(b) Zoom sur les tensions utilisées pour les impressions.

FIGURE 2.7 – Puissance du laser en fonction de la tension de commande.

coordonnées de chaque objet à imprimer, ainsi que les paramètres d'impression associés. Ainsi, il est facile de faire une grille balayant différents paramètres pour voir leur influence sans changer les autres variables.

Le passage en fichier imprimable .tsk convertit l'objet en suite de points, qui seront ensuite polymérisés. Cette conversion est également appelée *slicing*. Le paramètre principal est la taille du voxel prise en compte par le logiciel, ainsi que le recouvrement entre deux voxels. Le recouvrement modifie la distance entre chaque point imprimé, latéralement et verticalement. Les voxels doivent se chevaucher pour offrir une solidité suffisante à la structure. En effet, si le recouvrement est de 0%, les voxels se touchent à peine, et la structure n'a pas d'intégrité structurelle (fig. 2.8.b.). Avec un objectif x100, on utilise habituellement un recouvrement d'au moins 50%, et jusqu'à 90% pour un voxel défini avec une dimension latérale de 300 nm et verticale de 1 µm. Par défaut, seule la surface du modèle 3D est *slicée*, donc imprimée.

À plus petite échelle, pour améliorer la stabilité des objets, on peut les remplir. Le remplissage de la structure globale peut être un *scaffold* (ou échafaudage) qui crée des lignes dans les 3 directions, ou bien des lignes seulement dans le plan (x,y). Par ailleurs, on peut aussi choisir de recouvrir

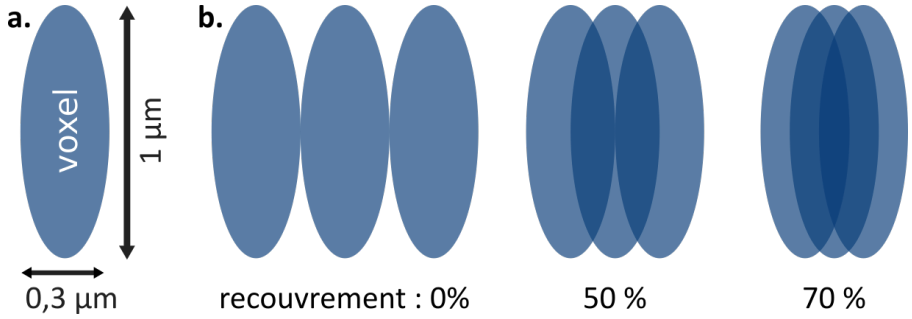


FIGURE 2.8 – Schéma représentant des voxels.
a. Voxel typique. b. Différentes valeurs de recouvrement entre les voxels.

la structure de *hatching* sur les surfaces les plus horizontales (recouvrement de la structure par des lignes suivant le relief jusqu'à un angle choisi). Enfin, l'option *Merge trajectories* permet de fusionner les différentes trajectoires calculées pour optimiser la fabrication, et *Adaptative Layer Thickness* réduit l'épaisseur des couches lorsqu'il y a des courbes et détails plus précis. Pour chaque nouvel objet, il faut trouver les paramètres de *slicing* optimaux, pour limiter le temps d'impression mais quand même avoir un objet de bonne qualité. Pour un temps d'exposition de 2 ms, il faut environ une heure pour imprimer un objet composé d'un million de voxels.

Les paramètres que j'utilise par défaut avant de les ajuster sont une taille de voxel de 0,3 µm par 1 µm, et un recouvrement de 70 % pour les deux dimensions. J'active aussi *Merge trajectories* et mets le *hatching* à 5°, avec un *scaffold* espacé de 1 µm.

Pour montrer l'influence des paramètres de *slicing*, j'ai imprimé deux types d'objets : un cylindre et un cube évidés, tous deux de 10 µm dans les 3 directions et une paroi épaisse de 1 µm, avec les mêmes paramètres de laser, mais 5 *slicings* différents. Pour tous, j'ai choisi une taille de voxel de 0,3 µm latéralement et 1 µm verticalement. J'ai désactivé *Adaptative Layer Thickness* et *Merge trajectories*. Pour certains d'entre eux, j'ai activé le *hatching* à 5°, avec des lignes selon x, ou bien rempli l'intérieur de lignes horizontales espacées de 0,5 µm, avec 1 µm entre les couches (*Fill*). Tous les objets ont été imprimés dans les mêmes conditions : objectif x100 à huile, Ormocomp, puissance laser 0,28 mW (tension de commande 0,14 V) et temps d'exposition 2 ms.

N°	Recouvrement	*Fill*	*Hatching*	Nbre de points cube	Nbre de points cylindre
1	50%	Non	Non	10288	9635
2	50%	Oui	Oui	19009	19644
3	80%	Non	Non	60396	50600
4	80%	Oui	Non	72210	64262
5	80%	Oui	Oui	93728	88124

TABLE 2.1 – Paramètres utilisés pour les tests de slicing (fig. 2.9).

Les différents paramètres de slicing utilisés pour ces tests sont montrés dans le tableau 2.1. On remarque que le nombre de points augmente énormément quand le recouvrement entre les voxels est plus grand, étant multiplié par 6 pour la structure simple sans remplissage ou hatching. Un nombre de points plus grand signifie un temps d'impression plus élevé.

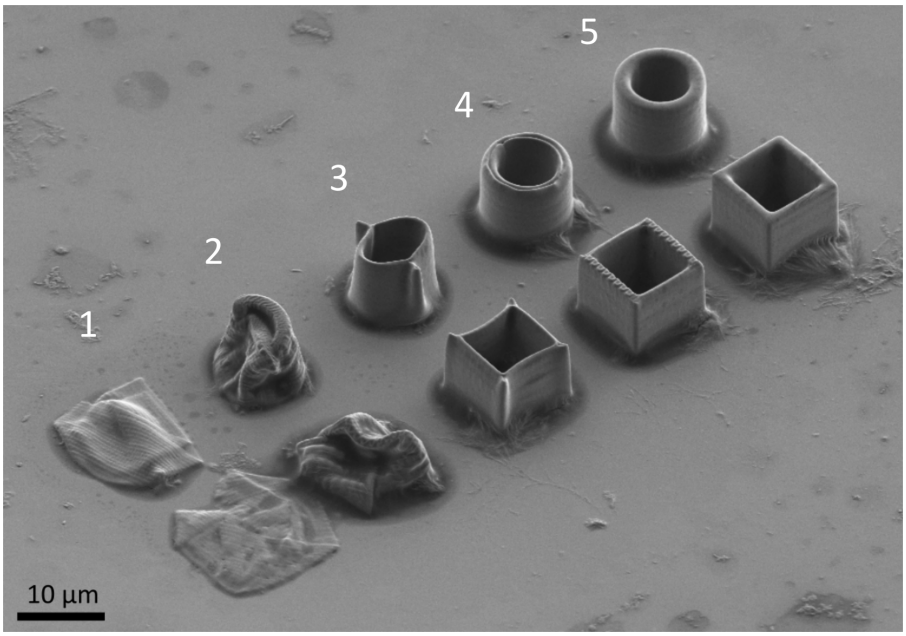


FIGURE 2.9 – Image MEB d'objets avec différents paramètres de slicing, décrits dans la table 2.1.

Une fois imprimés et rincés (fig. 2.9), les objets imprimés avec un recouvrement de 50% se sont écroulés, mais l'addition d'une structure interne a aidé au maintien de la forme. Avec un recouvrement de 80%, les 6 structures sont debout, mais les 2 qui n'ont pas de remplissage sont très déformées. On remarque aussi que sur les 2 structures qui n'ont pas de *hatching* (4), le haut n'est pas lisse, bien que leur forme soit fidèle au fichier original. En effet, on aperçoit la structure interne du cube, et une sorte de tranchée en haut du cylindre. Le hatching permet de pallier ce problème. Les 2 structures finales sont presque parfaites, ayant des murs lisses, et sans trous ni déformations. Les débris présents autour des structures sont des impuretés présentes sur la lamelle.

2.2.1.4 Protocoles d'impression classique

Selon la résine utilisée, le protocole de fabrication des objets peut varier légèrement.

a Ormocomp

Pour imprimer des objets avec l'imprimante 3D à deux photons et une résine Ormocomp, le protocole est le suivant :

- Créer un fichier .stl avec un logiciel de dessin 3D (voir section 2.3.1) ;
- Slicer l'objet avec Simpoly ;
- Définir la tension de commande et le temps d'exposition du laser, ainsi que le nombre de réplications et leurs coordonnées, dans un fichier .xls auquel Lithos se référence ;
- Fixer une lamelle de verre au porte-échantillon et le placer sur le montage ;
- Déposer une goutte de résine au centre de la lamelle ;
- Dans Lithos, déplacer le piézo à 20 µm en z ;
- Faire la mise au point du laser à l'interface verre-résine ;

— Entrer un offset de -1 µm en z, pour débuter l'impression dans le verre et ainsi s'assurer de son adhérence ;
— Lancer l'impression ;
— Rincer dans un bain d'acétone pendant 10 minutes pour enlever la résine non polymérisée ;
— Sécher sous un cristallisoir retourné avec une faible quantité d'acétone pour avoir une atmosphère riche en acétone et ralentir son évaporation.

Les objets imprimés peuvent être de toutes formes, comme par exemple ces fourmis (fig. 2.10), imprimées en suivant le protocole ci-dessus.

FIGURE 2.10 – Image MEB de fourmis imprimées en suivant le protocole classique.

Pour l'Ormocomp, par défaut, et si je ne précise pas, le temps d'exposition du laser utilisé est de 2 ms. La puissance, et donc la tension de commande variant largement entre les échantillons, celle-ci sera précisée. La tension de commande la plus utilisée est de 0,14 V, soit une puissance de 0,28 mW.

Les étapes de rinçage et de séchage peuvent être remplacées par un séchage supercritique. Ce procédé consiste à éviter la transition du solvant de l'état liquide à l'état gazeux en montant la pression et la température pour passer au delà du point critique. Ceci a l'avantage d'exercer moins de forces sur les structures lors du séchage, et donc peut empêcher certaines structures de s'effondrer ou de se décoller du substrat. Dans notre cas, nous utilisons un appareil Tousimis 931, avec 20 mL d'acétone comme solvant et du dioxyde de carbone comme fluide supercritique. Le séchage supercritique donne des structures de bonne qualité, mais pas forcément meilleure que le rinçage/séchage classique. De plus, il utilise de grandes quantités de CO_2, une bouteille de 50 L ne permettant qu'une dizaine de séchages.

b Gélatine-collagène

Pour imprimer dans la résine à base de gélatine et de collagène, l'impression même est assez similaire au protocole utilisé pour l'Ormocomp, mais l'étape de rinçage est modifiée, et une étape de préparation de l'hydrogel est nécessaire.

Ainsi, voici le protocole normal pour imprimer dans de la gélatine :

— Placer le flacon de gélatine dans un bain-marie sur une plaque chauffant à 60°C, pour faire fondre l'hydrogel ;
— Après quelques minutes, activer l'agitation magnétique, et laisser pendant au moins 15 minutes ;
— Avec une micro-pipette, déposer une goutte de 30 à 60 µL sur une lamelle de verre. Cette étape doit être rapide pour empêcher la gélification de la gélatine dans l'embout de la pipette ;
— Mettre la lamelle à 4°C pendant au moins une heure pour que la goutte solidifie ;
— L'impression est la même que pour l'Ormocomp ;
— Placer l'échantillon dans un bain de PBS (Phosphate-buffered saline) 1x, d'environ 12 mL, pour une dizaine de minutes ;
— Placer le tout sur une plaque chauffante à 60°C pendant 40 minutes, jusqu'à ce que la goutte soit totalement dissoute pour rincer les structures.

Le volume de la goutte varie légèrement d'un essai à l'autre. En effet, dès que l'hydrogel est dans la pipette, il commence à refroidir et se dépose donc différemment suivant le temps passé à pipetter la gélatine.

Ce protocole est celui suivi dans l'équipe du LiPhy, et je l'ajusterai pour mes besoins dans le chapitre 3.

2.2.1.5 Réseaux de tests

Pour valider mes résultats, j'imprime des réseaux d'objets tests. Ces objets ont évolué au cours de ma thèse, mais la majorité sont des cubes de petite taille. Chaque ligne possède 3 réplications de l'objet, imprimées avec les mêmes paramètres de laser. La tension de commande du laser est modifiée entre chaque ligne, avec des pas variant entre 0,005 V et 0,02 V la plupart du temps (entre 0,01 mW et 0,05 mW, non linéairement). J'ai décidé d'utiliser 3 réplications car c'est le minimum pour valider l'impression d'un objet. En effet, si j'en imprime un ou deux, et qu'un seul objet est mal imprimé, je ne peux pas savoir si le protocole est efficace. Avec 3 réplications, si un objet est mal imprimé et deux sont bien imprimés, la mauvaise impression doit être due à une autre facteur, tel que des contaminations sur la plaque par exemple (poussières).

2.2.1.6 Attacher les billes magnétiques

Un des composants principaux de nos micro-robots magnétiques est la bille aimantée, et pour les intégrer à la structure, une méthode a été conçue avant mon arrivée (fig. 2.11).

Pour fabriquer le lien entre la structure et la bille magnétique, on focalise le laser à mi-hauteur de la bille. Cette distance est trouvée en ajustant la mise au point avec le laser placé au centre de la

bille. Le laser converge en deux points : le premier au niveau de l'interface verre/résine, et un second à mi-hauteur de la bille. Ensuite, un lien est imprimé de la structure vers la bille (fig. 2.11). Lorsque le laser rentre en contact avec la bille, des bulles peuvent apparaître car le laser chauffe localement la bille. Si le lien est plus haut que le milieu de la bille, la fin du trait ne peut être fabriqué car la bille cache le laser. Si on se place plus bas, des bulles se forment au niveau de la bille, ce qui empêche la création du lien.

Le lien peut-être soit fait avec un fichier .tsk, soit à main levée, en activant le laser et en déplaçant la platine. Cette seconde option à l'avantage d'être plus souple, car si la bille est mal placée, il est facile de la déplacer, et permet également de faire plusieurs traits en évitant les bulles.

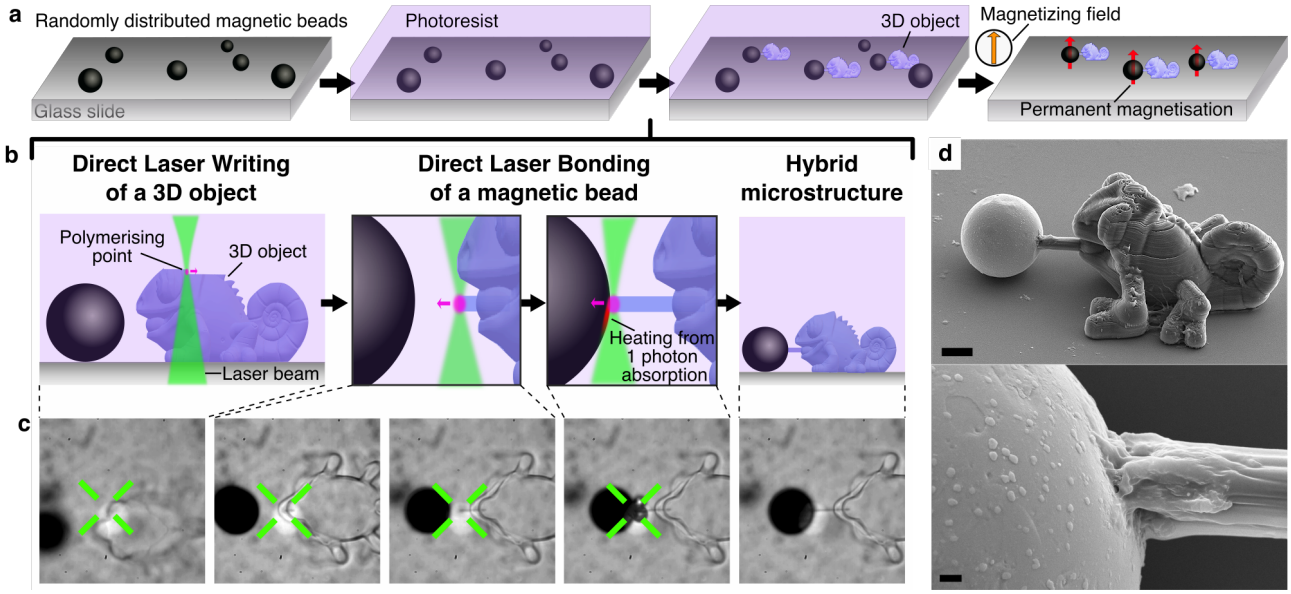


FIGURE 2.11 – Fabrication d'un caméléon et accrochage de la bille. a. Processus de fabrication. b. Précisions sur la fabrication du lien. c. Fabrication du lien au microscope optique. d. Images MEB de l'objet fini et zoom sur la liaison lien/bille.

Le protocole le plus basique pour fabriquer des objets à une seule bille est le suivant :
- Saupoudrer les billes sur la lamelle.
- Déposer une goutte de résine sur les billes.
- Trouver une endroit où les billes sont bien réparties par rapport aux objets à fabriquer.
- Imprimer l'objet normalement à coté d'une bille.
- Lier la bille à la structure.
- Rincer et sécher.

Pour des objets à plusieurs billes, la fabrication est plus compliquée car elle nécessite le déplacement des billes pour les placer précisément à l'endroit adapté sur la structure. Pour pouvoir bouger ces billes, deux solutions s'offrent à nous : les pousser avec un instrument non magnétique (aiguille en tungstène le plus souvent, épaisse de 40 µm à son extrémité), ou bien utiliser les propriétés magnétiques des billes.

La première n'est pas très précise car la viscosité de la résine fait que l'aiguille a encore une influence quand on la retire de la goutte. Cependant, elle est utile si les billes forment de gros amas qu'il faut déplacer loin des structures, ou bien en première étape de déplacement. La seconde consiste

à aimanter faiblement les billes après le dépôt de la goutte d'Ormocomp, puis les faire rouler grâce à un champ magnétique tournant ou translater grâce au gradient du champ (voir partie 2.2.3.1). Ceci permet également de contrôler l'orientation de l'aimantation de chaque bille indépendamment. Ces champs sont générés par un aimant permanent dans notre cas. Cette méthode a l'avantage de pouvoir être très précise, mais est aussi assez lente et difficile à contrôler. Elle permet également d'avoir des orientations magnétiques différentes d'une bille à l'autre.

2.2.2 Aimantation des billes

Les billes n'étant pas initialement aimantées, il faut les aimanter pour pouvoir exploiter leurs propriétés magnétiques. Quand un aimant non aimanté est soumis à un champ magnétique suffisamment élevé, cet aimant garde une aimantation rémanente. Dans notre cas, on veut pouvoir exercer des forces magnétiques les plus élevées possibles, il faut donc maximiser cette rémanence, idéalement jusqu'à saturation. Pour aimanter les billes, deux méthodes ont été utilisées, qui ont chacune leurs avantages. Il est impossible d'aimanter fortement les billes avant l'impression car elles formeraient des amas.

2.2.2.1 Aimant permanent NdFeB

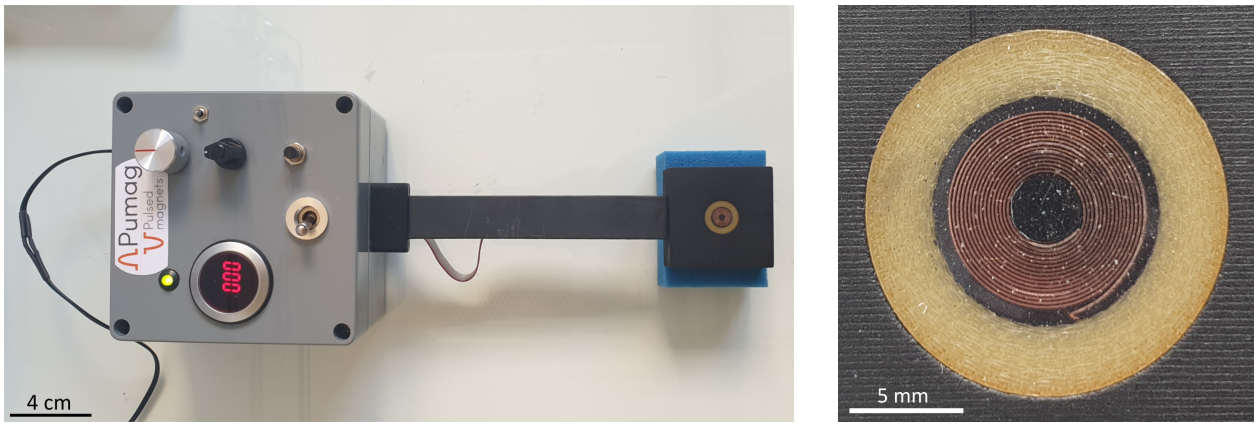
La première méthode est également la plus simple. Elle consiste à approcher un aimant permanent NdFeB des échantillons, en dessous de la lamelle de verre, jusqu'à ce que l'aimant touche la lamelle. Ainsi, l'aimant peut-être au plus proche des billes sans les arracher de l'échantillon. Le grand avantage de cette méthode est sa simplicité, ne nécessitant qu'un aimant cylindrique de 2 cm de diamètre et 1 cm d'épaisseur, la manipulation ne prenant que quelques secondes.

Au niveau des échantillons, cet aimant génère un champ d'environ 500 mT. D'après la courbe 2.4, pour ce champ, l'aimantation rémanente est autour de 75 mT. Cette valeur est faible comparée à la rémanence maximale des billes, qui est d'environ 750 mT. On est donc loin d'exploiter les potentialités de nos billes magnétiques en les aimantant avec un aimant permanent.

2.2.2.2 Générateur de champ magnétique pulsé

Pour pouvoir atteindre cette aimantation potentielle, nous utilisons un générateur de champ pulsé. Celui-ci peut générer des champs jusqu'à 10 T au centre de la bobine, pour une durée très courte, de l'ordre de la dizaine de microsecondes. Pour préserver la durée de vie de l'appareil, il faut éviter de l'utiliser au delà de tensions d'entrée de 500 V, ce qui équivaut à un champ de 5 T. Pour nos billes, un champ de 4 T, voire 3 T permet déjà presque d'atteindre la saturation (fig. 2.4), donc nous nous en tiendrons à ces valeurs.

Ce générateur de champ pulsé (fig. 2.12) est constitué de plusieurs parties. La bobine produit dans sa zone centrale un champ parallèle à son axe, maximal au niveau de sa surface, et décroissant rapidement. Ainsi, à 1 mm de la bobine, le champ n'est plus qu'à 70 % de sa valeur maximale. Il faut donc approcher les échantillons, idéalement à moins d'un millimètre de la bobine, et appliquer un champ de 4 T, qui devrait tomber entre 3 et 4 T au niveau des structures, permettant d'aimanter les billes au maximum de leur capacité.



(a) Vue d'ensemble. (b) Zoom sur la bobine.

FIGURE 2.12 – Générateur de champ magnétique pulsé.

2.2.3 Source de champ magnétique pour actionner les structures

Pour actionner nos structures, il faut les soumettre à un champ magnétique ayant plusieurs propriétés :

— homogénéité sur une surface de quelques millimètres carrés, pour activer le robot de la même façon quel que soit son emplacement
— contrôle de la direction et de l'amplitude du champ magnétique, pour appliquer un couple ou un gradient dans toutes les directions et avec différentes intensités. Pour nos structures, il faut un champ de plusieurs dizaines de milliteslas
— contrôle temporel du champ magnétique, par exemple pour faire osciller un objet.

Afin de générer ce champ, nous avons testé plusieurs techniques, parmi lesquelles un simple aimant permanent et des électroaimants.

2.2.3.1 Aimant permanent

Encore une fois, la méthode la plus simple consiste à utiliser un aimant permanent. D'après la figure 2.5, celui-ci génère un champ d'environ 15 mT à 3 cm de sa surface. Si les billes sont aimantées rapidement avec l'aimant permanent à 75 mT (voir partie 2.2.2.1), il faut un champ extérieur de 10 mT minimum pour les actionner. Ainsi, si on approche l'aimant des structures, on peut les faire bouger. Si l'aimant est assez proche, les structures sont attirées par le gradient du champ et se translatent. Si on fait tourner l'aimant sur lui-même, le champ tourne également ce qui exerce un couple sur la bille magnétique, et peut faire rouler la micro-structure si elle n'est pas accrochée au substrat, ou bien la faire tourner autour de son point d'ancrage.

Cette méthode est très simple à mettre en place, mais demande une bonne dextérité et de la pratique pour provoquer des mouvements précis et variés. De plus, il est difficile de connaître réellement le champ exercé, l'aimant étant actionné à la main, et la distance entre l'aimant et l'échantillon difficile à mesurer. Ainsi, cette méthode est utilisée pour réaliser des tests préliminaires.

2.2.3.2 Electroaimants en 3D

Le "cube" est un ensemble de huit électroaimants disposés aux sommets d'un cube imaginaire, pointés vers son centre (fig. 2.13). Ces électroaimants sont composés d'un noyau magnétique doux entouré d'une bobine de cuivre. Ils peuvent générer un champ magnétique jusqu'à 100 mT, contrôlé à la fois en amplitude et en direction, et homogène sur notre volume de travail (quelques mm^3).

C'est une bonne solution pour actionner nos structures de façon contrôlée, précise et efficace, et c'est la méthode utilisée pour les structures finales.

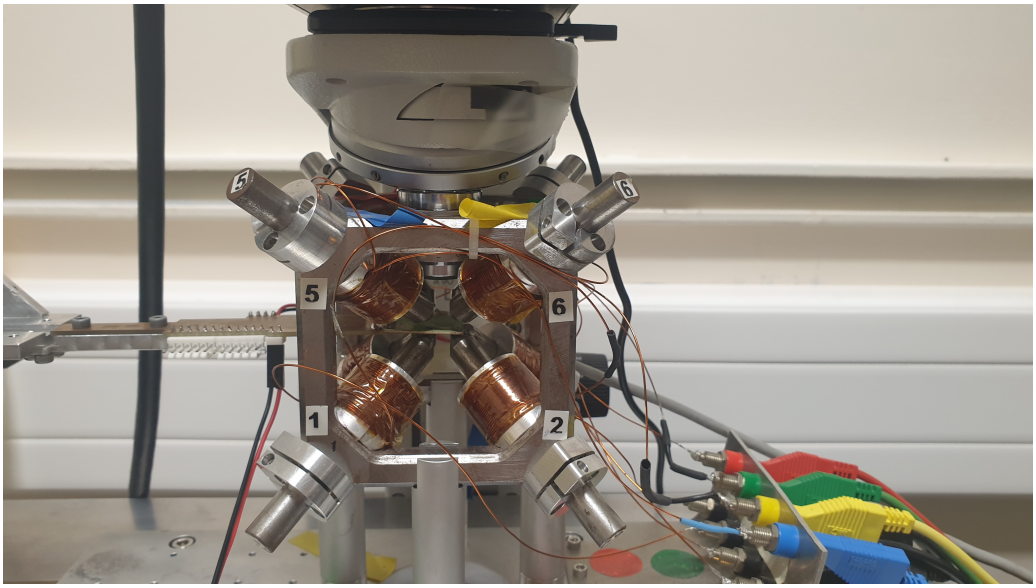


FIGURE 2.13 – Générateur de champ avec 8 électroaimants.

2.2.4 Pré-positionnement des billes avec substrats TMP

Dans le chapitre 4, j'utilise des substrats magnétiques aimantés localement selon un motif pour placer les billes magnétiques à des endroits pré-déterminés. Pour fabriquer ces substrats TMP (Thermo-Magnetically Patterned), on utilise les substrats décrits partie 2.1.5.

Le but est de retourner localement l'aimantation du film de NdFeB, selon un motif prédéfini. Pour ce faire, on applique un masque sur le substrat (en bleu sur la figure 2.14). Celui-ci peut être fabriqué soit par lithographie et gravure d'une couche métallique de chrome sur des substrats de quartz [10], ce qui permet de le réutiliser, soit directement sur le substrat magnétique, par lithographie de résine. Le substrat est ensuite placé sur un aimant permanent émettant un champ de 0,5 T de direction opposée à l'aimantation du film. Le film est ensuite chauffé localement à travers ce masque, grâce à un laser pulsé KrF à 248 nm pendant 25 ns pour affaiblir sa coercivité sous l'effet de la température. Ainsi, l'aimantation du film s'aligne avec le champ extérieur, aux endroits chauffés, se retournant donc localement e créant un motif magnétique. N'importe quel motif peut être utilisé, avec une résolution minimale de l'ordre du micron.

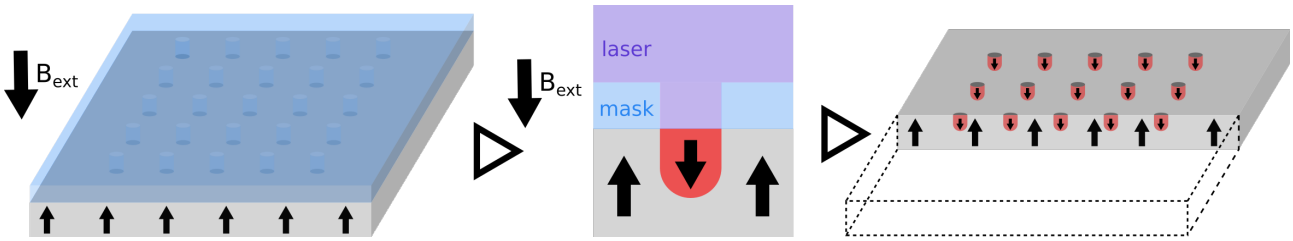


FIGURE 2.14 – Fabrication des aimants TMP.

2.2.5 Imagerie MEB

Un microscope électronique à balayage (MEB) est utilisé pour caractériser les structures. Toutes les images MEB de ce manuscrit ont été acquises avec un MEB Zeiss Ultra plus à l'Institut Néel. La microscopie électronique à balayage utilise un faisceau d'électrons pour construire une image de la surface d'objets. Ce faisceau doit interagir avec la surface du matériau pour pouvoir créer une image, cette surface doit donc être conductrice. Avec la résine polymère que nous utilisons, cette interaction produit des images floues et avec beaucoup d'artefacts, car les structures sont isolantes, entraînant une accumulation des charges dans le matériau. Pour pallier ce problème, on dépose une couche d'or de 15 nm d'épaisseur sur les échantillons. Les images sont produites avec une tension d'accélération de 3 kV, et avec le détecteur SE2 (détection des électrons secondaires).

2.3 Logiciels

Durant mon doctorat, j'ai utilisé de multiples logiciels, d'abord pour créer les fichiers des structures à imprimer, et également pour faire des simulations des structures en action et des champs magnétiques générés par certains matériaux magnétiques.

2.3.1 CAO

Tous les modèles 3D utilisés lors de cette thèse ont été faits avec deux logiciels, FreeCAD 0.16 et Blender 2.78c. J'ai utilisé FreeCAD pour les modèles plus simples, composés de segments droits extrudés, et Blender pour les autres.

L'avantage de FreeCAD est la possibilité de créer des objets à partir de croquis 2D cotés, et de changer facilement les dimensions après avoir fini le modèle. Blender, lui, permet de créer facilement des objets de toutes formes, mais n'est pas initialement destiné à être utilisé pour faire de la CAO.

Quel que soit le logiciel utilisé, le modèle 3D est exporté au format .stl pour l'exploiter ensuite. Le format .stl est le format de fichier utilisé pour la plupart des impressions 3D, dont la 2PP. Il décrit la surface externe d'un objet en trois dimensions par des triangles. Ce format peut également être utilisé pour importer des modèles 3D dans la plupart des logiciels de simulation.

J'ai également utilisé Blender pour réaliser des rendus 3D des structures pour les figures de ce manuscrit.

2.3.2 Simulations numériques

Pour faire des simulations des différentes structures et phénomènes étudiés lors de ma thèse, j'ai utilisé les logiciels Comsol et Ansys . Ces deux logiciels utilisent la méthode des éléments finis (FEM), mais ont chacun des atouts pour différents types de simulations : c'est pourquoi j'ai fait les simulations de mécanique pure avec Ansys, et celles de magnétisme avec Comsol.

La méthode des éléments finis consiste à résoudre numériquement des équations différentielles partielles sur des éléments discrets. Pour ce faire, le système est divisé en plus petites parties, les éléments finis, grâce à un maillage de la géométrie. La méthode des éléments finis ne permet qu'une approche de la solution exacte d'un problème, par convergence des solutions (qui peut nonobstant être très bonne).

Les propriétés des matériaux utilisés sont visibles dans le tableau 2.2.

	Densité	Module d'Young	Coef de poisson
Ormocomp	1.18	$1.3.10^9$	0.3
NdFeB	7.5	200.10^9	0.29

TABLE 2.2 – Propriétés mécaniques des matériaux utilisés pour les simulations. Les modules sont exprimés en Pa. [75]

2.3.2.1 Comsol Multiphysics

Les simulations de phénomènes magnétiques ont été faites avec Comsol Multiphysics 5.6.

a Configuration des simulations

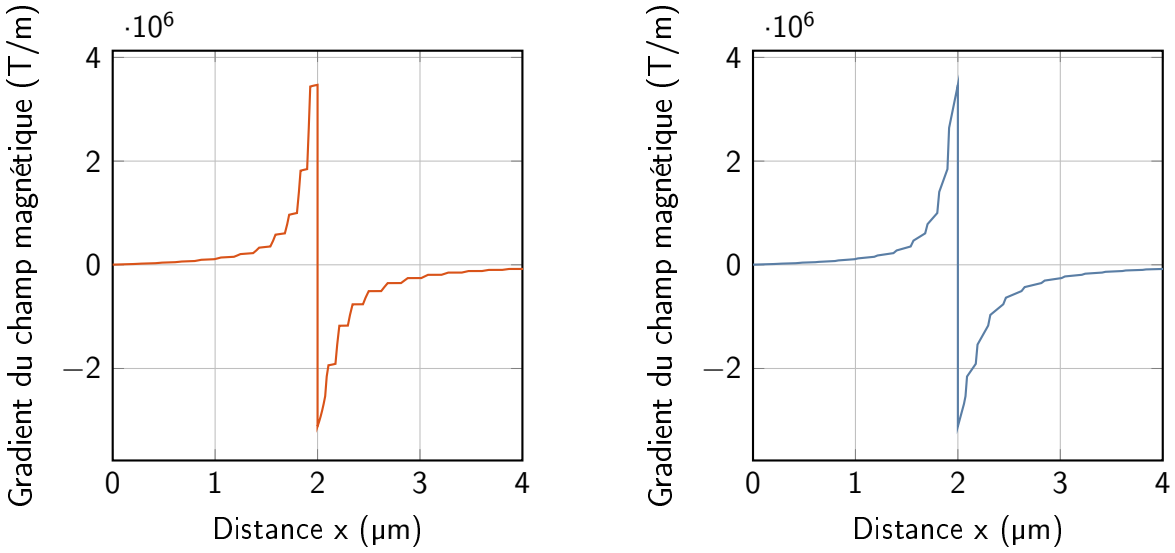
Sur Comsol, il faut d'abord créer une géométrie, soit en important un fichier de modèle 3D, soit directement sur le logiciel pour des formes simples. Pour la plupart de mes simulations, j'importe la structure principale et j'ajoute une sphère de rayon 15 µm pour représenter la bille et un petit cylindre pour le lien entre la sphère et la structure principale. Ensuite, il faut définir les matériaux des différentes parties de la géométrie, selon le tableau 2.2.

J'ai fait deux types de simulations, des simulations de mécanique, pour lesquelles j'ai utilisé la physique *Mécanique du solide (solid)* et d'autres de magnétisme, avec la physique *Champ magnétiques, courants nuls (mfnc)*. Toutes les simulations sont faites dans un état stationnaire.

b Traitement des données Comsol

Comsol fonctionnant par éléments finis, il calcule une valeur pour chaque triangle du maillage. Pour des fonctions simples, les graphiques produits sont ainsi composés de plusieurs parties linéaires, ce qui donne des graphiques assez lisses quand le maillage est suffisamment fin. Mais pour des fonctions dérivées, comme le gradient d'un champ, le graphique résultant est en "marches d'escalier".

Pour pallier ce problème, les données des graphiques produits par Comsol sont exportées pour être traitées avec Python, dans le but de lisser les courbes. Le résultat n'est pas parfait mais est bien plus réaliste que les données brutes produites par Comsol.



(a) Champ magnétique selon x pour différents rayons de pièges.

(b) Gradient du champ magnétique selon x pour rayons diamètres de pièges.

FIGURE 2.15 – Comparaison entre un graphique brut et une courbe lissée.

2.3.2.2 Ansys Workbench

Pour les simulations purement mécaniques à grandes déformations, j'ai utilisé Ansys Workbench 2022 R2 . J'ai choisi ce logiciel car il permet d'appliquer simplement un moment à un objet, pouvant donc imiter le couple magnétique sur nos billes, et il peut également simuler des grandes déformations par itérations. En effet, il ne peut pas calculer en une seule étape de très grandes déformations, mais si le calcul est découpé en étapes avec des charges plus faibles s'additionnant au fur et à mesure, de telles simulations sont possibles.

La mise en place d'une simulation sur Ansys est assez similaire à Comsol, cependant différents logiciels internes sont utilisés pour différentes étapes. Pour la modélisation, j'ai d'abord utilisé SpaceClaim pour importer mon modèle et ajouter une bille, puis DesignModeler pour mettre le modèle complet à l'échelle micrométrique. Ensuite, il faut attribuer des matériaux aux différentes parties de la structure, ajouter les charges et appuis, et générer le maillage.

Pour simuler de grandes déformations, il faut activer le calcul par itérations (par opposition au calcul direct), celui-ci permettant de simuler des charges élevées par étapes. Il faut ensuite déterminer ces différentes étapes en choisissant les charges pour chaque itération. J'ai d'abord testé une seule étape avec différentes charges, et j'ai choisi pour les itérations une des valeurs les plus élevées dont la simulation convergeait. Dans notre cas, le pas utilisé entre chaque itération est de 100 µN.µm.

2.4 Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux différents matériaux, méthodes et logiciels utilisés pour ces travaux de thèse. Le protocole de fabrication des matériaux photosensibles (Ormocomp et gélatine-collagène) a été décrit, ainsi que la méthode de micro-impression 3D par 2PP. Par ailleurs, les différents matériaux magnétiques (micro-billes, aimant macroscopique, substrats TMP) on été détaillés, ainsi que des méthodes d'aimantation et d'actionnement magnétique. Enfin, nous nous sommes penchés sur les logiciels utilisés pour la conception et la simulation des structures.

Chapitre 3

Structure hybride pour la stimulation mécanique de cellules

La 2PP utilise des matériaux biocompatibles, ce qui la rend idéale pour l'étude de phénomènes biologiques qui nécessitent des environnements structurés. Les micro-robots magnétiques peuvent être actionnés à distance et donc offrent la possibilité déplacer ou déformer des objets en contact avec des cellules par exemple. Ainsi, en collaboration avec Caterina Tomba de l'INL, nous avons développé des structures hybrides Ormocomp-collagène pouvant servir de substrat de culture cellulaire déformable, pour imiter la paroi intestinale avec ses villosités et ses mouvements.

Tout d'abord, j'exposerai le contexte ainsi que le design que nous avons développé, qui a les propriétés recherchées pour servir de substrat de culture déformable. Ensuite, nous approfondirons la conception et la fabrication de la structure, en étudiant le squelette interne à la structure, puis l'enveloppe le recouvrant. Subséquemment, nous nous pencherons sur l'actionnement de cette structure, et pour finir on s'intéressera à la culture cellulaire sur différentes structures en gélatine.

3.1 Concept

Pour étudier le rôle des différentes propriétés physico-chimiques et mécaniques de l'environnement cellulaire, il est important de développer des outils *in vitro* permettant de déformer et changer la courbure d'un ensemble de cellules, comme elles le seraient *in vivo*. En effet, de nombreuses cellules du corps humain évoluent dans un environnement courbé et dynamique, et leur comportement dépend de cet environnement, tant sa forme que ses variations et mouvements.

Les villosités intestinales sont des structures des tissus épithéliaux de l'intestin grêle, qui permettent d'augmenter la surface de la paroi intestinale et donc sa capacité d'absorption des nutriments. Ces villosités ont une taille de l'ordre de la centaine de microns, et une forme de cylindres arrondis (fig. 3.1). Elles sont un bon exemple de substrat de culture à répliquer pour étudier comment les cellules réagissent à des changements de courbure, grâce à leur forme courbée et leurs mouvements caractéristiques associés aux fonctions de l'intestin.

Actuellement, l'étude de ces villosités est difficile : *in vitro*, elle nécessite un substrat non planaire.

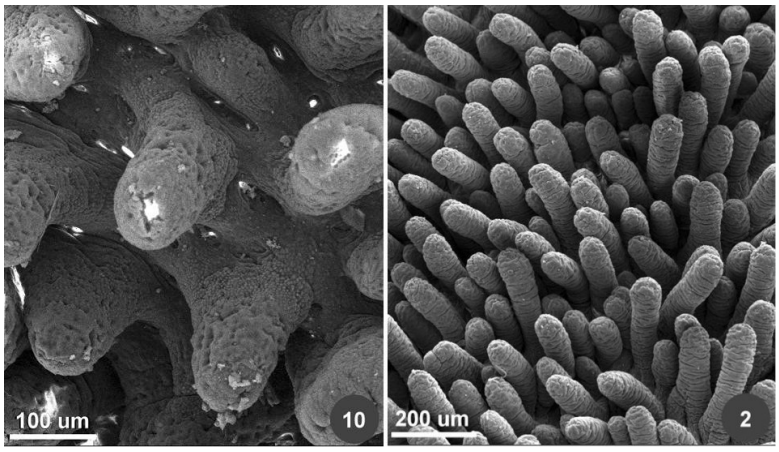


FIGURE 3.1 – Villosités de porc vues au MEB [78].

Grâce à la 2PP, on peut imprimer des structures de taille et de forme similaires aux villosités, ce qui permettrait l'étude des cellules dans un environnement proche des conditions réelles. De plus, on peut lier des billes magnétiques aux structures, permettant de les actionner et de les déformer. L'idée est de construire une structure de base, puis de cultiver des cellules dessus, qui devraient donc prendre la forme imposée par le substrat structuré, et ensuite de déformer ce substrat pour étudier la réponse de ces cellules à ce stimulus mécanique.

Les villosités ont une forme de longs cylindres arrondis, de diamètre autour de 100 µm et longs de 500 µm à 1,5 mm. Elles bougent avec des fréquences proches d'un hertz, en oscillant mais également en se contractant. La structure que l'on veut fabriquer pour les imiter doit donc être de taille et de forme similaire, et pouvoir se déformer, au moins en flexion pour répliquer les oscillations. La construire en un matériau biocompatible tel que le collagène et la gélatine permet d'offrir un bon substrat de culture aux cellules.

On cherche donc à fabriquer une structure biocompatible sur laquelle faire pousser les cellules, qui reproduise la forme des villosités et actionnable pour simuler les déformations *in vivo*. Notre première idée de design est modélisée en 3D figure 3.2. Il s'agit d'un squelette composé d'un long treillis en Ormocomp, et de piliers en gélatine accrochés à ce squelette. Une extrémité du treillis est accrochée par sa base à la surface de la lamelle, l'autre est libre. Une bille magnétique est accrochée au bout libre de la structure, permettant de la déformer en flexion pour faire bouger les villosités artificielles.

Pour travailler à échelle réelle, avec des piliers en gélatine mesurant plusieurs centaines de microns, il faut utiliser le montage avec le grand cube piézoélectrique de 300 µm. De plus, le squelette doit être imprimé en plusieurs fois, pour placer plusieurs piliers. Les deux montages sont cependant très similaires, donc pour valider le principe, je peux travailler avec celui ayant un plus petit cube piézoélectrique (100 µm), et les résultats sont transférables à l'autre montage.

Le design montré figure 3.2 avec piliers est très complexe : les cylindres horizontaux sont maintenus seulement d'un coté et ont une forme difficile à imprimer en 3D (car arrondie et horizontale sans soutiens). L'impression des cylindres serait plus simple s'ils étaient verticaux, mais on a choisi cette configuration horizontale pour pouvoir déformer plus simplement le substrat (effet de la gravité constant) et pouvoir observer la déformation simplement au microscope optique. Nous avons donc

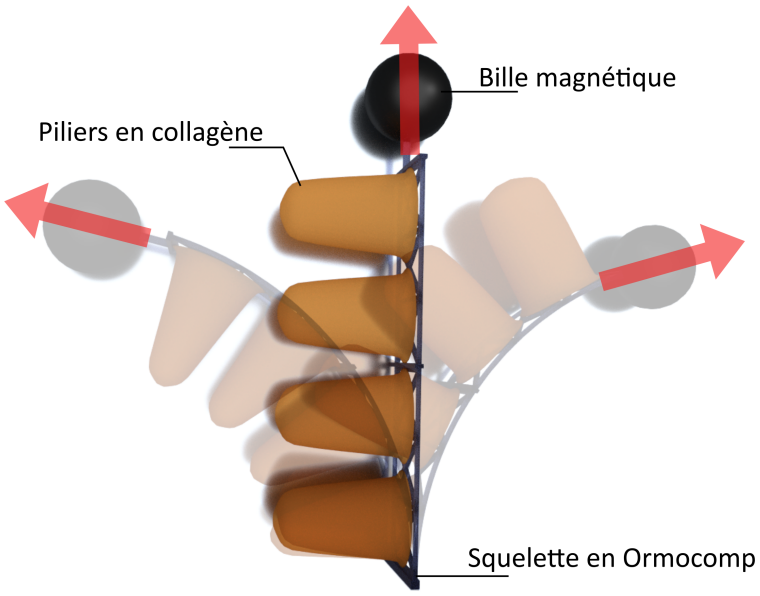


FIGURE 3.2 – Modélisation 3D du premier concept et de sa déformation. Un squelette en Ormocomp sert de base sur laquelle des "piliers" en gélatine sont imprimés. La structure peut être actionnée grâce à la bille magnétique soumise à un champ magnétique externe.

décidé de commencer les expérimentations en imprimant un pavé rectangulaire en gélatine autour du squelette à la place des cylindres horizontaux.

Nous avons choisi de fabriquer cette structure de façon hybride en Ormocomp et en gélatine pour prendre avantage des propriétés des deux matériaux. En effet, la gélatine-collagène est idéale pour la culture cellulaire, mais est également très molle (module de Young d'une centaine de kPa [79]), ce qui rend difficile la fabrication de structures complexes et/ou semi-rigides. Ainsi, nous voulons utiliser une structure interne en Ormocomp, qui est bien plus solide, mais reste assez flexible quand il est fin (moins de 5 µm environ). De plus, l'Ormocomp adhère mieux aux billes magnétiques que la gélatine. L'impression de ces deux matériaux sur une même structure est une approche novatrice.

3.2 Conception et fabrication de la structure

La structure hybride est constituée de trois parties, le squelette en Ormocomp, l'enveloppe en gélatine-collagène et la bille magnétique. Les deux parties imprimées de la structure, le squelette et l'enveloppe sont très différentes, ainsi chacune sera étudiée séparément. On s'intéressera ensuite à l'hybridation des deux matériaux Ormocomp et gélatine-collagène. Enfin, les deux étapes de fabrication seront combinées dans la dernière partie. La méthode de fabrication du lien pour l'ajout de la bille magnétique est maîtrisée [7], ainsi nous n'en discuterons que brièvement dans cette partie.

3.2.1 Conception et modélisation du squelette

Le squelette est la partie interne de la structure hybride, fabriquée en Ormocomp. Il a d'abord fallu choisir sa forme, puis travailler sur son impression. On va d'abord se concentrer sur la conception de ce squelette, en comparant deux designs analytiquement et par simulation à éléments finis.

On cherche à faire une structure de grande taille par rapport à la course de la platine piézoélectrique (100 µm dans les 3 directions), ainsi, afin de s'approcher de la taille et de la forme des villosités, les dimensions du squelette choisies pour l'expérimentation sont autour de 100 µm en longueur et 50 µm de hauteur.

3.2.1.1 Design général

Le squelette est là en tant qu'armature, et doit donc répondre à quelques spécificités :
- solidité et stabilité, pour supporter le rinçage de l'Ormocomp et le dépôt de la goutte de gélatine
- flexibilité, pour permettre la déformation de la structure complète
- rapidité de fabrication, pour pouvoir imprimer plusieurs structures en une journée.

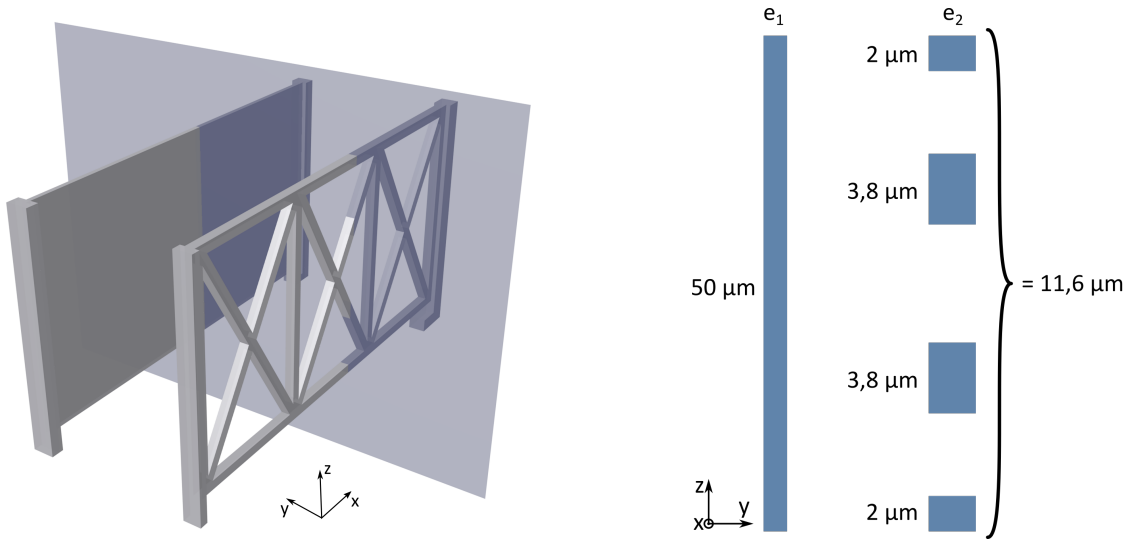
La première idée de design pour ce squelette est une simple plaque fine verticale (fig. 3.3a, à gauche), mais ce n'est pas optimal : il faut que la plaque soit très fine par rapport à sa longueur pour être déformée grandement, mais il est difficile d'imprimer des épaisseurs inférieures à 1 µm, surtout sur une grande surface. On va donc considérer et comparer deux designs de squelette, le premier étant une plaque pleine. Le second design envisagé est un treillis, composé de trois X sur la longueur totale de 100 µm (fig. 3.3a, à droite). On cherche à comparer deux choses principalement : la rapidité de fabrication, approximé au volume des pièces, et la flexibilité des squelettes, ce qui peut être calculé grâce à la déformation maximale pour une certaine force appliquée.

Comme ceci n'est qu'une estimation, on suit les hypothèses de la théorie des poutres, donc on suppose des petites déformations, et des approximations sont faites. Les grandeurs relatives au concept de squelette plein auront l'indice 1, et celles relatives au treillis l'indice 2.

La déformation maximale d'une poutre encastrée vaut $\delta_{max} = \frac{FL^3}{3EI}$, avec F la force appliquée au bout de la poutre, L sa longueur, E le module de Young du matériau et I le moment quadratique de la section (fig. 3.3b).

On remarque que le seul paramètre qui varie entre nos deux designs est le moment quadratique I, qui dépend de la section de la poutre. Ainsi, il faut comparer le moment quadratique pour la plaque fine et pour le treillis, par rapport à leur épaisseur. Par simplification, on considère que sur toute sa longueur, la section du treillis est composée de 4 parties comme la section d'un X. On ignore donc les deux tiges verticales ainsi que le centre des X.

Par définition, le moment quadratique d'une poutre à section rectangulaire vaut $I = \frac{bh^3}{12}$, avec b la largeur de la section (perpendiculaire au mouvement) et h sa hauteur (dans le plan du mouvement). Ainsi, h correspond à l'épaisseur des squelettes, et b à la plus grande longueur des sections (fig. 3.3b). Comme on cherche à comparer l'épaisseur des deux concepts de squelettes pour un même moment quadratique $I_1 = I_2$, on peut dire, avec e_1 et e_2 les épaisseurs des deux sections :



(a) Modèles 3D des squelettes, le plan bleu représentant une coupe quelconque.

(b) Sections des squelettes. Le premier est la section d'une plaque pleine et le second d'un treillis.

FIGURE 3.3 – Sections verticales des deux concepts de squelettes en Ormocomp.

$$I_1 = I_2 \implies \frac{50 * e_1^3}{12} = \frac{11,6 * e_2^3}{12} \implies \sqrt[3]{\frac{50}{11,6}} * e_1 = e_2 \implies e_2 = 1,63 e_1 \tag{3.1}$$

Ceci signifie que pour une même déformation, l'épaisseur du second design peut être 1,63 fois plus grande que celle de la plaque simple. Une épaisseur plus grande permet une qualité d'impression supérieure, ce qui est préférable.

Le second paramètre à étudier est la durée de fabrication, qui dépend du volume total. La longueur étant la même, la seule différence est la surface de la section. On a :

$$\begin{aligned} S_1 = 50\, e_1 \; et \; S_2 = 11,6 * e_2 = 18,9\, e_1 \\ \implies \frac{S_1}{S_2} = 2,65 \end{aligned} \tag{3.2}$$

Ainsi, pour une même déformation, le volume à imprimer pour la plaque fine est 2,65 fois plus grand que le volume du treillis : l'impression du treillis est donc bien plus rapide que celle de la plaque, si on considère que la durée d'impression et le volume sont linéaires. Par exemple, si l'impression d'un treillis dure une heure, une plaque pleine mettrait 2h40 à être imprimée.

Par ailleurs, un autre critère à prendre en compte est la résistance au rinçage et au séchage, qui est bien meilleure pour un treillis que pour une plaque, puisque le liquide peut passer dans les trous et applique donc une force plus faible sur la structure.

On peut en conclure que le treillis est préférable à la plaque massive par rapport aux spécificités du cahier des charges. J'ai donc choisi de faire une structure composée principalement d'un treillis, avec un pied plus long à chaque extrémité. Un des pieds est permanent et plus épais, et sert de point d'ancrage à toute la structure : il doit supporter des efforts mécaniques importants. Le second est décrochable, plus fin, et nécessaire pour la stabilité de la structure lors de l'impression, mais

sera décroché pour permettre l'actionnement. Cette forme de treillis permet également de limiter les déformations non voulues, telles que la torsion du squelette selon Ox, tout en étant relativement rapide et assez simple à imprimer.

3.2.1.2 Calculs de la déformation du squelette en forme de treillis

Pour connaître la déformation du squelette en fonction du moment appliqué, j'ai calculé la déformation y en tout point x du treillis grâce à la théorie des poutres, en remplaçant la section de la même façon que dans la partie précédente (fig. 3.3b). Le modèle 3D final utilisé pour les impressions a une épaisseur de 4 µm, j'ai donc choisi cette valeur pour ces calculs.

On suit les hypothèses de la théorie des poutres :
- une dimension très grande devant les deux autres
- hypothèse de Bernoulli : les sections planes perpendiculaires à la fibre moyenne restent planes et normales à la fibre moyenne après déformation

Ceci implique qu'on travaille avec des petites déformations. En réalité, on déformera le squelette plus que ce qu'on calcule ici, mais ce modèle permet de connaître la forme du squelette dans certaines situations où il est peu déformé.

Le moment quadratique du treillis vaut :

$$I_{treillis} = \frac{be_2^3}{12} = \frac{11,6 \times 4^3}{12} = 61,87 \ \mu m^4 \tag{3.3}$$

En mécanique statique, la somme des moments et des forces appliqués à un objet est égale à zéro (principe fondamental de la statique ou PFS). Grâce à cela, on peut déduire les efforts intérieurs en tout point du treillis.

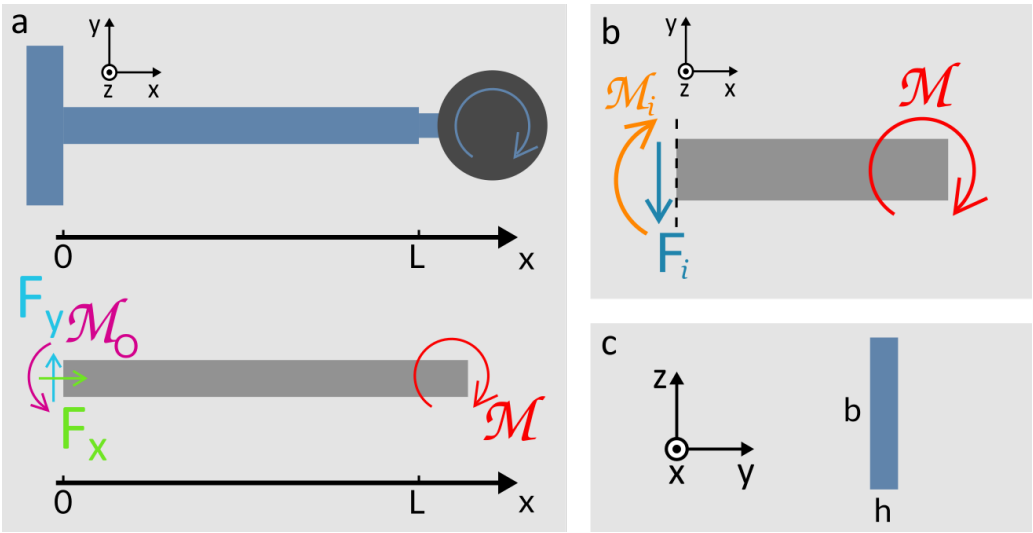


FIGURE 3.4 – Schémas utiles au calcul de la déformation du treillis. a) Représentation de la poutre et schéma statique pour calculer les efforts extérieurs. b. Schéma statique de la partie droite du treillis après coupure fictive pour étudier les efforts intérieurs. c. Section simplifiée du treillis.

En se basant sur le schéma 3.4.a et sur le PFS, on déduit que les forces de réaction F_x et F_y

sont nulles car aucune force n'est appliquée au treillis. Le moment de réaction $\mathcal{M}_0$ vaut $\mathcal{M}$, mais nous ne l'utiliserons pas pour la suite des calculs. En effet, pour calculer les efforts intérieurs, on peut faire une coupure fictive de la poutre, en n'importe quel point x (fig. 3.4.b). La force au niveau de la coupure F_c est nulle car seule force appliquée sur le morceau de poutre. Le moment se calcule avec le PFS :

$$\sum \mathcal{M} = -\mathcal{M}_i - \mathcal{M} = 0 \implies \mathcal{M}_i = -\mathcal{M} \tag{3.4}$$

La théorie des poutres, en particulier le modèle de Euler-Bernoulli [80], nous dit que le moment intérieur $\mathcal{M}_i$ est lié à la déformation de la poutre y par :

$$EI\frac{d^2y(x)}{dx^2} = \mathcal{M}_i(x) \tag{3.5}$$

En intégrant l'équation 3.5 avec le moment en x, au niveau de la coupure, on a :

$$\begin{aligned} &\implies EI\,\frac{d^2y}{dx^2} = \mathcal{M}_i = -\mathcal{M} \\ &\implies EI\,\frac{dy}{dx} = -\mathcal{M} \times x + C_1 \\ &\implies EIy = -\mathcal{M}\,\frac{x^2}{2} + C_1x + C_2 \end{aligned} \tag{3.6}$$

Pour trouver les constantes C_1 et C_2, on utilise les conditions aux limites. Ici, on sait qu'en $x = 0$, le déplacement et la pente sont nuls, car la poutre est encastrée en $x = 0$. On peut déduire les constantes en remplaçant x et y dans les équations 3.6. Ces constantes permettent de trouver l'équation de la déformée.

$$\begin{aligned} &En\ x = 0, y = 0 \implies C_2 = 0,\ et\ \frac{dy}{dx} = 0 \implies C_1 = 0 \\ &\implies EI\,\frac{dy}{dx} = -\mathcal{M} \times x\ et\ EIy = -\mathcal{M}\,\frac{x^2}{2} \end{aligned} \tag{3.7}$$

On a par ailleurs $I_{treillis} = 61,87\ \mu m^4 = 61,87.10^{-24}\ m^4$ et $E = 1,3\ GPa$ pour l'Ormocomp [81]. Ainsi, la déformation y du treillis vaut :

$$y(x) = -\frac{x^2}{2EI_{treillis}}\mathcal{M} = -\frac{x^2}{2 \times 1,3.10^9 \times 61,87.10^{-24}}\mathcal{M} = -6,22.10^{12} \times x^2 \times \mathcal{M} \tag{3.8}$$

On peut suivre le même raisonnement pour une plaque pleine de même épaisseur, permettant donc de comparer la déformation des deux modèles. La seule différence est dans la valeur du moment quadratique. La figure 3.5 montre le profil d'un squelette fait d'une plaque pleine (rouge) et d'un treillis (bleu) de même épaisseur (4 µm), pour des petites déformations, avec un moment appliqué de $4,2.10^{-11}\ N.m$.

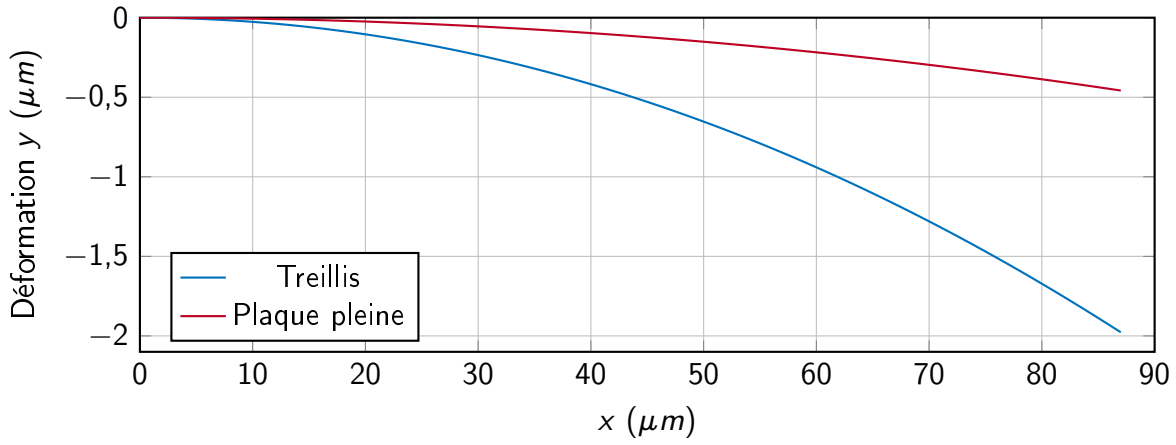


FIGURE 3.5 – Graphique représentant la déformation y des squelettes selon leur axe x. L'amplitude de la déformation dépend du moment appliqué.

Quel que soit le type de squelette, le déplacement maximal dépend linéairement du moment appliqué, d'après l'équation 3.8. Pour un treillis, avec un moment de $4,2.10^{-11}$ $N.m$, on a un déplacement maximal de 1,98 µm, et pour une plaque pleine un déplacement maximal de 0,45 µm. Le squelette se déforme également selon une parabole dans les deux cas. L'échelle en y est agrandie pour accentuer la déformation. On voit que le treillis se déforme beaucoup plus que la plaque pleine, confirmant qu'il remplit mieux les fonctions choisies au début que la plaque pleine en tant que squelette.

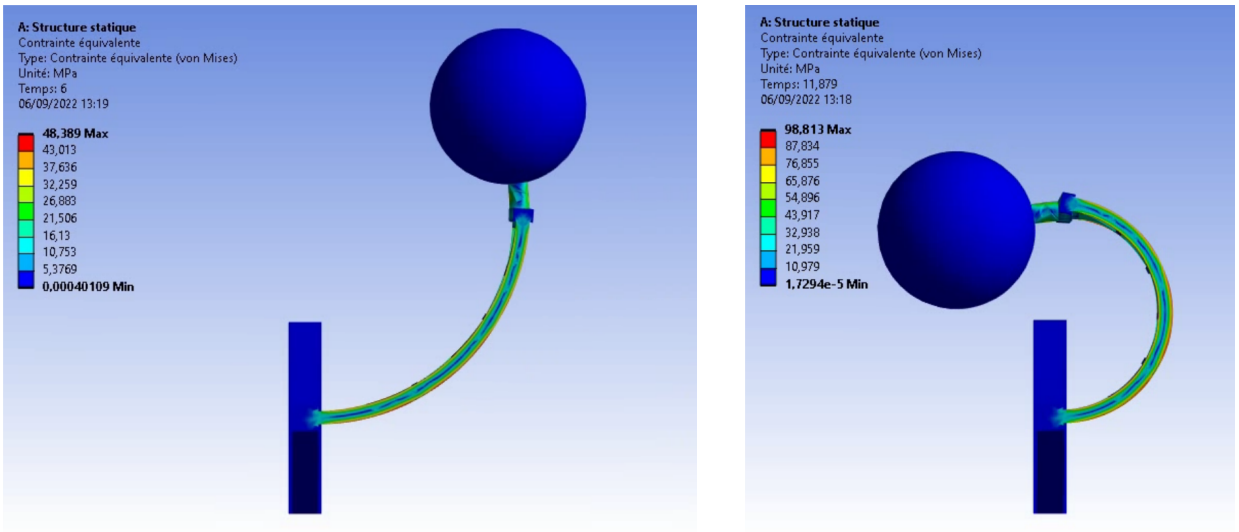
3.2.1.3 Simulations du squelette en flexion

Pour de plus grandes déformations, j'ai simulé le treillis final, en appliquant un moment variant de 0 à 1200 µN.µm au niveau de la bille, et un encastrement sous le pied principal.

La figure 3.6 montre le même treillis soumis à deux moments de valeurs différentes, leurs déformations ainsi que les contraintes de Von Mises selon l'échelle de couleur. Quel que soit le moment, les contraintes les plus élevées sont à la surface du treillis, sur la partie en tension. Les contraintes maximales restent dans le domaine élastique de l'Ormocomp (module d'élasticité $\approx$ 1 GPa [81] $\gg$ 98 MPa), ce qui veut dire que la structure est assez solide pour les moments appliqués.

Quant à la déformation du squelette, celle-ci correspond aux calculs de la partie précédente pour des faibles déformations. Pour des grandes déformations, le treillis se déforme en arc de cercle, atteignant une forme de demi-cercle quand le moment est très élevé, ce qui sera confirmé avec l'expérimentation (partie 3.3). De plus, la déformation du treillis est seulement une flexion dans le plan xy, sans torsion dans l'axe du treillis. On remarque également que le pied principal ne se déforme pas et reste droit : sur la simulation, le pied vu de dessus reste rectangulaire.

Ainsi, la conception du squelette est validée et on connait sa déformation, qui a été calculée à la fois de façon analytique et par simulation numérique à éléments finis. On cherche donc maintenant à fabriquer ce squelette puis à l'actionner.



(a) Moment appliqué de 400 µN.µm. (b) Moment appliqué de 1200 µN.µm.

FIGURE 3.6 – Simulation de la déformation d'un treillis, montrant sa déformation et les contraintes de Von Mises.

3.2.2 Fabrication et optimisation du modèle de squelette

Trois paramètres ont un effet sur la structure finale : le modèle 3D utilisé, son *slicing* et les paramètres d'impression (puissance du laser et temps d'exposition), qui sont tous indépendants. D'abord, il faut s'assurer d'avoir le bon design, car même si l'impression est parfaite, la structure peut échouer si le design choisi n'est pas adapté. La structure étant complexe, il y a eu de nombreuses versions du modèle 3D, et au sein de chaque version, du *slicing* utilisé. L'amélioration est incrémentale, l'optimisation du *slicing* est réutilisée pour les versions de modèle 3D postérieures.

Parmi les différentes améliorations du design, on étudiera des changements du modèle 3D (ajout de plusieurs renforts), du *slicing* (effet des options de remplissage, de *Merge Trajectories* et du *hatching*) et de la puissance du laser.

3.2.2.1 Support de la poutre supérieure

Initialement, j'ai utilisé un modèle simple tel que décrit auparavant : un treillis composé de trois X encadré par deux barres horizontales et deux barres verticales se finissant par des pieds, dont un pied décrochable. Les paramètres utilisés pour le *slicing* sont visibles dans la table 3.1. En particulier, l'option *Merge Trajectories* est activée.

Taille voxel x/y	Recouvrement x/y	Hatching	Remplissage	Autres
0,3/1 µm	60/80%	non	non	*Merge Traj*

TABLE 3.1 – Paramètres de *slicing* du premier treillis.

En outre, sur cet échantillon, j'ai imprimé des 'cylindres' horizontaux en Ormocomp sur les treillis,

afin de valider leur modèle 3D et leur *slicing* avant de les imprimer en gélatine.

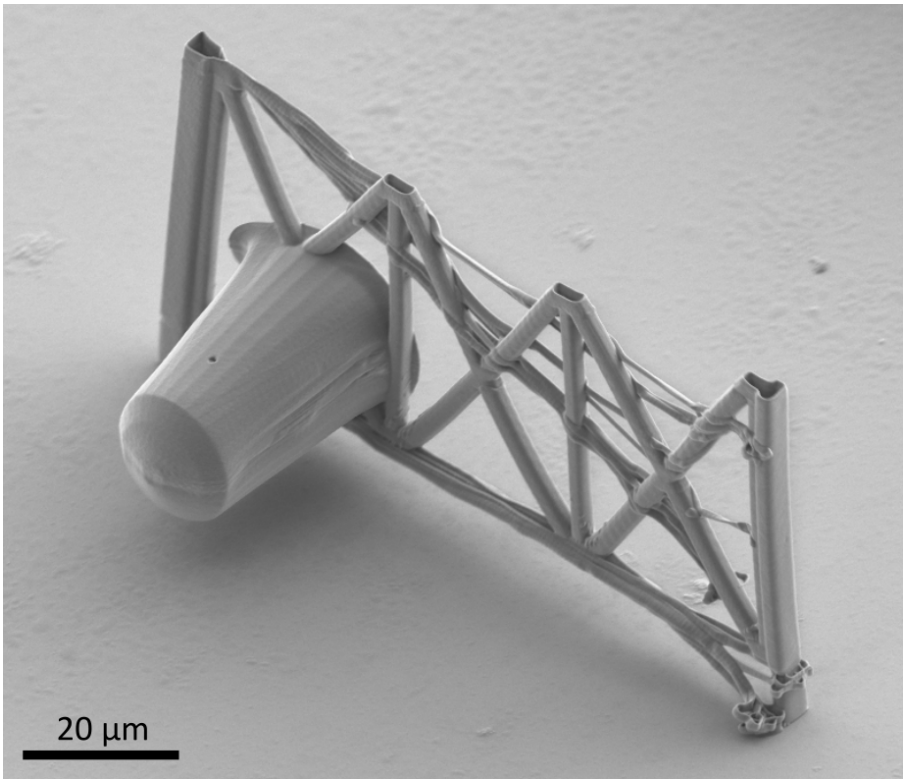


FIGURE 3.7 – Image MEB d'une des premières impressions d'un treillis en Ormocomp, avec un défaut de fabrication sur les barres horizontales. Le cylindre arrondi est un test en Ormocomp.

La figure 3.7 met en évidence un gros défaut de fabrication au niveau de la barre supérieure du treillis. En effet, chaque trait fabriqué est penché, comme s'il tombait, au lieu de créer une poutre horizontale en haut de la structure. Le reste de la structure est bien imprimé selon le modèle, ce défaut est donc marquant. Par ailleurs, le cylindre est assez bien imprimé, ayant une apparence assez lisse et fidèle au modèle : ceci valide le fichier et les conditions d'impression des cylindres.

La première solution envisagée pour corriger le défaut de fabrication a été d'ajouter des supports le long de cette poutre supérieure. En effet, une partie horizontale imprimée par 2PP sans support tombe à cause de la gravité. En ajoutant des barres verticales au centre des X, elles soutiennent la poutre horizontale supérieure pendant l'impression (fig. 3.8).

3.2.2.2 Effet de *Merge Trajectories*

L'ajout des supports de la poutre supérieure n'a pas résolu le problème d'impression, l'origine est donc autre. L'impression du reste de la structure étant de bonne qualité, le problème vient sûrement du *slicing*.

Le logiciel de *slicing* Simpoly permet de visualiser l'impression dans le temps. Pour le modèle que l'on vient de considérer, on remarque que la poutre supérieure est imprimée avant le pied vertical secondaire (à droite sur la figure 3.7). Chaque ligne imprimée n'est soutenue qu'en un point, en son début au niveau du pied principal, et fléchit donc avant même que la prochaine ligne soit

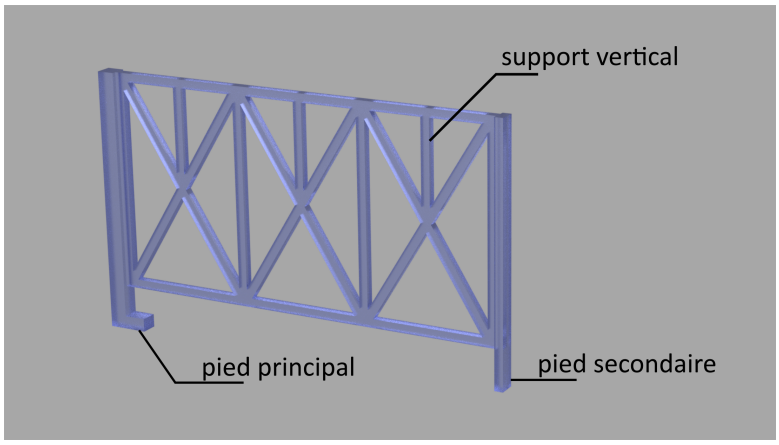


FIGURE 3.8 – Modélisation 3D du treillis avec supports de la poutre supérieure.

imprimée. L'option *Merge Trajectories* est la cause de cet ordre d'impression, cherchant à minimiser les mouvements de la platine pour réduire la durée d'impression. Le problème d'impression de la barre verticale est donc résolu en décochant cette option pour toutes les nouvelles versions de fichiers d'impression. Les structures sont alors construites couche par couche.

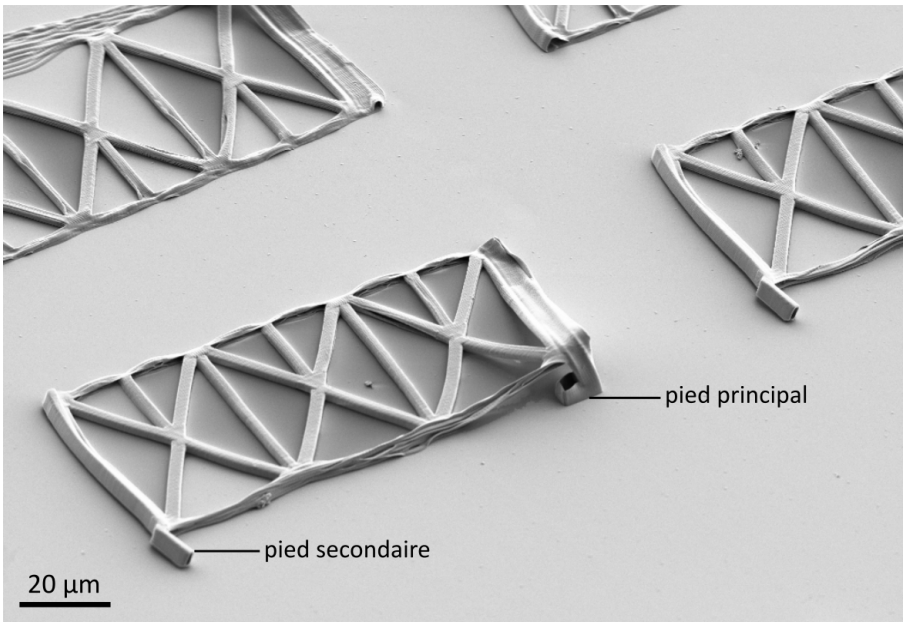


FIGURE 3.9 – Image MEB d'un treillis simple s'étant affaissé lors du rinçage.

Un squelette auquel ces modifications ont été apportées est visible figure 3.9. Les autres paramètres de *slicing* et d'impression sont les mêmes. La qualité de l'impression est bonne, le problème de la poutre horizontale a disparu : enlever l'option *Merge Trajectories* a donc résolu le défaut d'impression de la poutre supérieure.

Cependant la structure est tombée lors du rinçage et se retrouve aplatie sur le substrat. On remarque que le pied principal est tordu près de sa base, et que le pied secondaire est détaché. A l'origine, ce pied était plus court pour permettre de le décoller plus facilement, mais il semble que ça ait été un mauvais choix, car s'il était resté attaché au substrat, la stabilité de la structure serait

meilleure. Le pied secondaire a été allongé pour faire la même taille que le pied principal.

3.2.2.3 Consolidation du pied principal

Le treillis de la figure 3.9 a encore un gros défaut : le pied principal est très déformé. La face supérieure du pied est ouverte, et l'intérieur du pied est vide. Ceci est en accord avec les paramètres de *slicing* choisis, en l'occurrence le manque de remplissage et de hatching. Activer ces paramètres améliore la solidité de la structure, mais rallonge la durée d'impression. De plus, pour renforcer le pied principal, j'ai ajouté deux contreforts obliques de chaque coté, qui forment un triangle avec le socle (fig. 3.10).

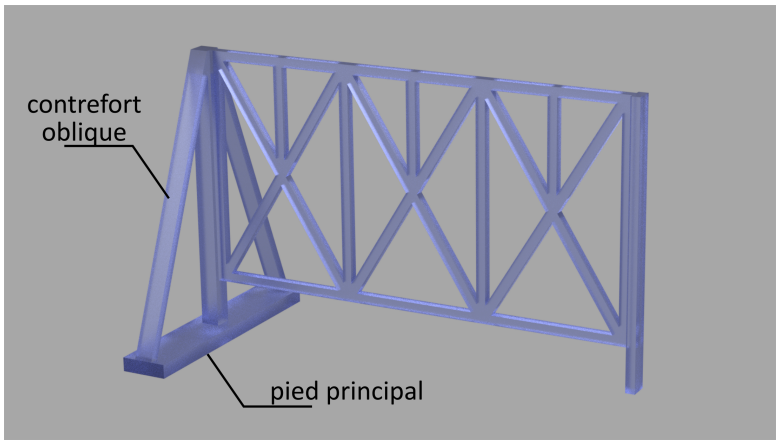


FIGURE 3.10 – Modélisation 3D du treillis avec pied principal renforcé avec des contreforts obliques.

Tous ces changements renforcent fortement le pied principal, ce qui l'empêche de tomber lors du rinçage des structures.

3.2.2.4 Influence de la puissance du laser

Les paramètres de fabrication doivent être optimisés pour les différents objets imprimés. Ici, on cherche la puissance idéale pour nos treillis. Pour ce faire, j'imprime des réseaux dans lesquels chaque ligne utilise une puissance différente (fig. 3.11). Chaque ligne est imprimée avec une tension de commande croissante, de 0,14 V à 0,18 V, soit des puissances de 0,28 mW à 0,47 mW.

Les structures imprimées aux puissances les plus faibles sont en haut à gauche de l'image. Elles sont tombées lors du séchage à cause de la tension de surface, mais les structures imprimées avec une puissance plus élevée sont restées en place. Ceci est dû au fait que le volume polymérisé au niveau de chaque voxel est plus gros, donc la structure finale est plus solide. Ainsi, avec ces modèles 3D, il faut utiliser une puissance plus élevée que d'ordinaire. Après de nombreux de tests, la puissance optimale est de 0,51 mW (tension de commande de 0,19 V) pour les squelettes finaux, mais cette valeur peut varier légèrement suivant le fichier utilisé et les paramètres extérieurs tels que la température de la pièce ou l'ancienneté de la résine (légère évolution au cours du temps de cette dernière).

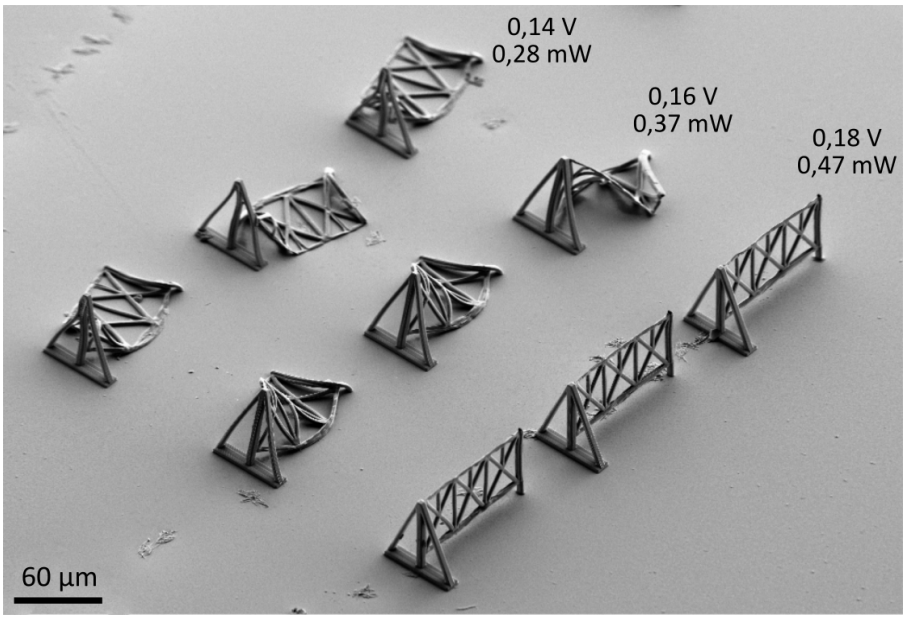


FIGURE 3.11 – Image MEB d'un réseau de squelettes avec pied amélioré, dont la puissance d'impression augmente selon les rangs de gauche à droite.

3.2.2.5 Extension de la structure

L'objectif final est d'avoir une structure plus grande, pour pouvoir répliquer des villosités à une échelle similaire aux villosités humaines (autour de 500 µm pour chaque villosité). J'ai donc imprimé un squelette plus long, en triplant la partie treillis sans le pied principal. Cette structure est imprimée en quatre morceaux, d'abord le pied principal, puis les treillis l'un après l'autre grâce à la platine grande course, car chacun a une longueur de 97 µm et le cube piézoélectrique ne se déplace que de 100 µm.

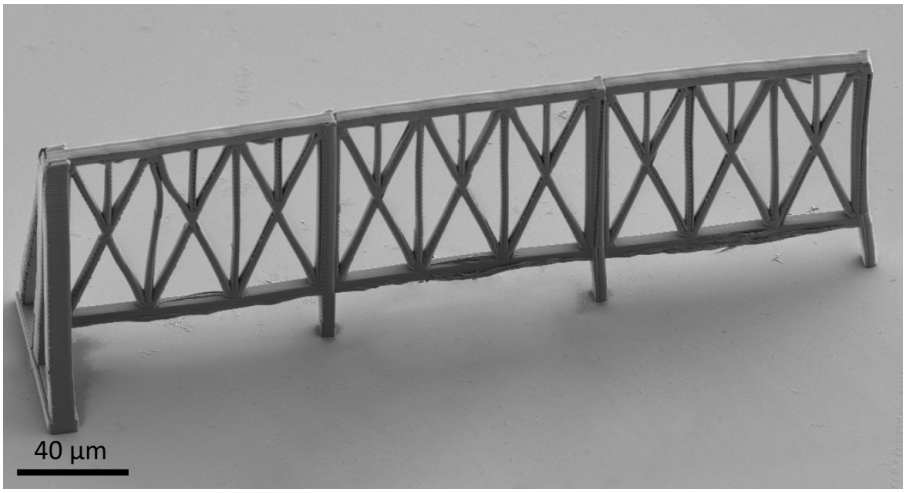


FIGURE 3.12 – Image MEB d'un treillis rallongé imprimé en 3 fois.

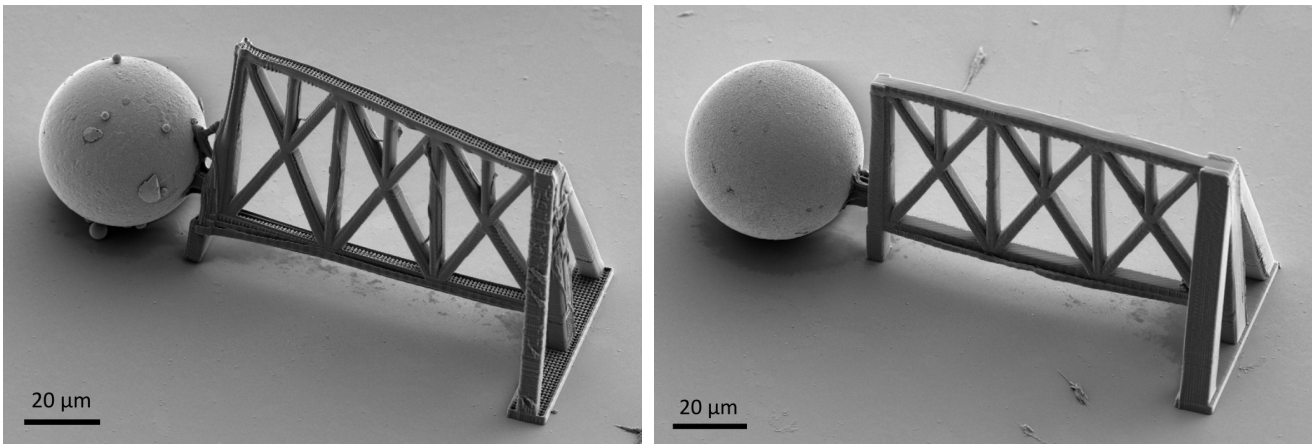
Le squelette long imprimé (fig. 3.12) est tout à fait fidèle au modèle 3D, montrant qu'il est assez simple d'agrandir la structure si besoin.

3.2.2.6 Ajout de la bille et optimisation du *slicing*

Les paramètres de *slicing* et d'impression du squelette sont presque finalisés, on peut donc maintenant imprimer les squelettes auprès de billes magnétiques pour pouvoir les attacher ensemble. En effet, les billes pourraient avoir un effet lors du rinçage (affaissement de la structure), et la création de structures magnétiques permet de travailler sur leur actionnement (voir partie 3.3).

Quelques ajustements sont encore nécessaires pour assurer la solidité des treillis. La dernière version des squelettes (fig. 3.11) imprimée à 0,47 mW (0,18 V) est assez solide pour résister au rinçage, mais ne résiste pas lors de l'ajout de la goutte de gélatine-collagène (voir partie 3.2.5). Il faut donc encore consolider la structure. Pour ce faire, j'ai épaissi les contreforts obliques du triangle de soutien.

J'ai attaché une bille aux treillis de ces échantillons (fig. 3.13). Deux structures sont imprimées sur la même lamelle de verre, et avec la même puissance de laser (0,51 mW), la différence entre les deux venant du modèle de base et du *slicing* : la seconde version a un pied principal renforcé, et l'ajout de *hatching*, couvrant donc les surfaces horizontales.



(a) Squelette sans *hatching*. La structure intérieure est visible.

(b) Squelette final avec *hatching* et contreforts plus épais.

FIGURE 3.13 – Images MEB des deux dernières versions du squelette avec billes.

Les figures 3.13a et fig. 3.13b montrent la différence entre ces deux squelettes : le premier est légèrement déformé et paraît moins solide que le second. Ceci montre que pour ce modèle 3D, le *hatching* est important, et l'épaississement des renforts du pied principal est efficace.

Ainsi, le modèle 3D final est composé de :

— un pied principal de section carrée de 8 µm, haut de 63 µm, renforcé par deux barres rectangulaires de 6 µm par 8 µm, qui ont un angle de 67° avec la base
— un treillis de 4 µm d'épaisseur, long de 94 µm, haut de 50 µm, dont les poutres mesurent 2 µm de largeur
— un pied secondaire haut de 63 µm, et de section rectangulaire de 6 µm par 4 µm.

Ce modèle est slicé avec Simpoly avec les paramètres du tableau 3.2, et est également légèrement raccourci, de 107 µm à 99 µm de long, car le modèle 3D mesure 107 µm, ce qui est plus long que la course de la platine. L'impression d'une squelette final dure environ 50 minutes.

Taille voxel x/y	Recouvrement x/y	Hatching	Remplissage	Autres
0,3/1 µm	60/80%	5°, Lines Ox	H lines 1/0,5 µm	Pas *Merge*

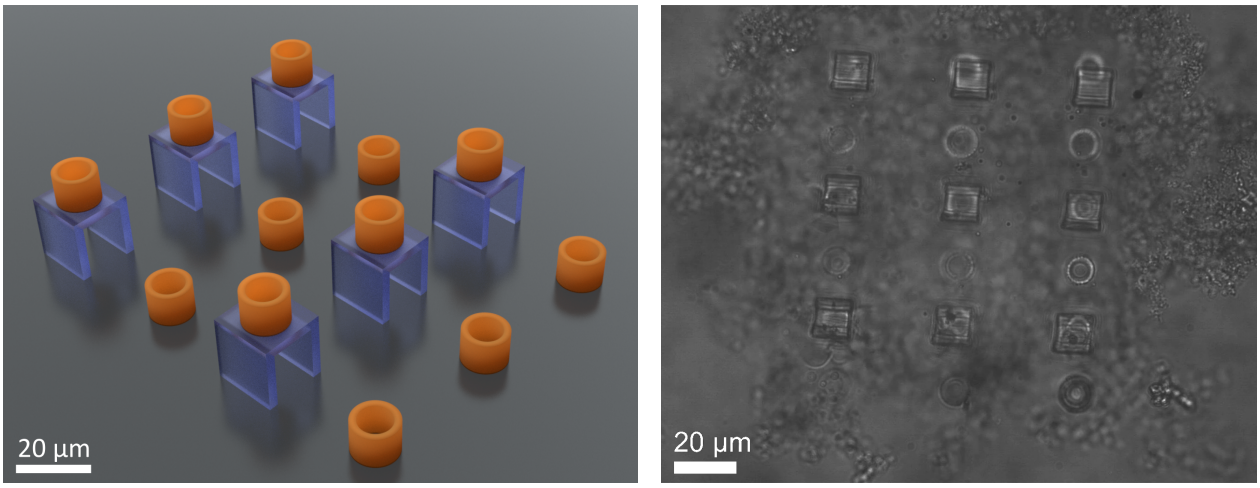
TABLE 3.2 – Paramètres de *slicing* des treillis finaux.

3.2.3 Validation de l'hybridation Ormocomp-gélatine

Notre design nécessite l'utilisation de deux résines (Ormocomp et gélatine-collagène) sur un même échantillon et liées entre elles. Cette technique est nouvelle, et il a donc d'abord fallu vérifier qu'une telle hybridation était possible.

Pour ce faire, j'ai fabriqué un échantillon test. L'objectif était de construire des structures hybrides de façon à pouvoir distinguer les deux matériaux au microscope optique. En effet, l'hydrogel étant riche en eau, les structures ne peuvent pas être séchées et observées au MEB. Au microscope optique, il est difficile de différencier les deux matériaux, j'ai donc choisi d'imprimer deux formes différentes vues du dessus : une arche carrée (16x16x16 µm) pour la structure en Ormocomp, et un cylindre creux (14x14x11 µm) pour la gélatine (fig. 3.14a). Les cylindres en gélatine sont imprimés soit sur les arches en Ormocomp soit directement sur la lamelle de verre pour servir de témoin.

Les arches en Ormocomp sont imprimées, rincées et séchées selon le protocole habituel (voir partie 2.2.1.4), espacées de 50 µm selon x et y. Une goutte de gélatine-collagène chaude est ensuite déposée sur les structures. Celle-ci doit être assez fluide pour se glisser entre les arches en Ormocomp. Ensuite, les cylindres en gélatine sont imprimés aux endroits prévus.



(a) Modélisation 3D de l'échantillon de test (bleu : Ormocomp, orange : gélatine.

(b) Vue de dessus au microscope optique de l'échantillon test.

FIGURE 3.14 – Test d'impression hybride Ormocomp et gélatine

La figure 3.14b montre l'échantillon après rinçage de la gélatine non réticulée. Les artefacts autour des structures sont des défauts d'impression (ceux-ci sont discutés partie 3.2.4.3). Les carrés visibles sont les arches en Ormocomp, et les cercles sont les cylindres en gélatine. On remarque que les cercles sont présents directement sur le verre et également sur les carrés en Ormocomp, validant

l'expérience : il est possible de fabriquer des structures hybrides Ormocomp et résine gélatine-collagène.

3.2.4 Enveloppe en résine gélatine-collagène

D'après notre design, l'enveloppe en gélatine entoure le squelette et sert de base sur laquelle cultiver des cellules. Nous cherchons à imiter des villosités intestinales, donc ceci doit être pris en compte lors de son design. La gélatine utilisée pour imprimer cette enveloppe diffère de l'Ormocomp utilisé pour le squelette : le protocole d'impression est donc également très différent. En partant du protocole mis en place au LiPhy, je développerai un protocole adapté à notre utilisation.

3.2.4.1 Design général

Comme expliqué dans la partie 3.1, le design idéal pour cette enveloppe serait constitué de piliers horizontaux imitant les villosités. Cette forme étant assez complexe, nous avons commencé par un simple pavé entourant le squelette (fig. 3.15).

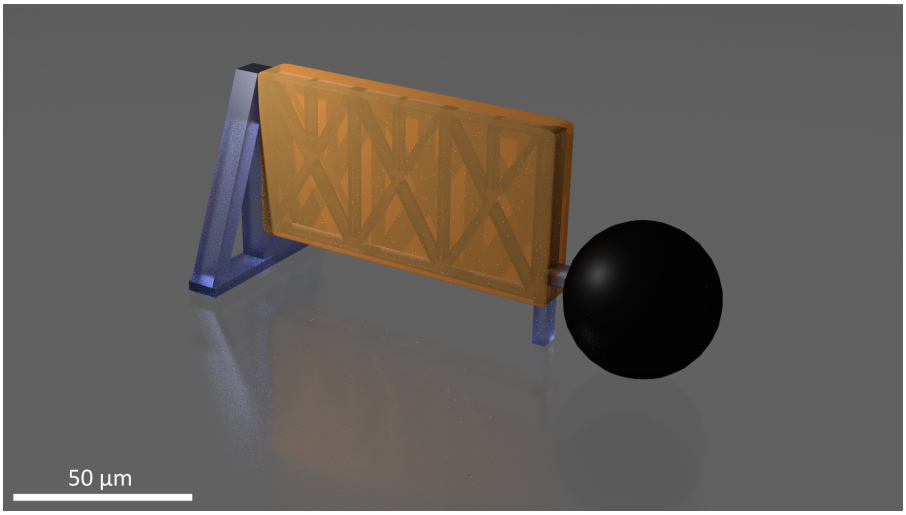


FIGURE 3.15 – Modélisation 3D du pavé enveloppant le squelette.

Ce pavé en gélatine doit recouvrir tout le treillis, ainsi, ses dimensions finales en x, y et z doivent être au minimum de 87 µm, 6 µm et 52 µm respectivement, dimensions légèrement supérieures à la partie en treillis du squelette.

3.2.4.2 Optimisation des paramètres de *slicing* de l'enveloppe seule

L'impression dans la gélatine-collagène diffère de celle dans l'Ormocomp. En effet, la taille d'un voxel est un peu plus élevée, et surtout, la structure gonfle lors du rinçage, en particulier en z, où le facteur de gonflement peut atteindre 2.

J'ai testé de nombreux *slicings* de pavés, ainsi que différentes dimensions pour prendre en compte le gonflement. Les paramètres des versions des pavés sont exposés dans le tableau 3.3. Le chiffre

indiqué dans la colonne *Scaffold* est la distance entre les traits du remplissage interne du pavé.

Version	Taille pavé	Taille voxel x/z	Recouvremt x/z	*Scaffold*	Options	Nb Points
1	87x8x50	0,3/2	60/80	2		377 562
2	87x12x50	0,3/2	60/80	2		469 535
2.1	87x12x50	0,5/5	60/80	10	Merge Traj	58 223
3	87x8x25	0,3/2	60/80	5	Merge Traj	119 828
3.2	87x8x25	0,3/2	60/80	2	Merge Traj	182 560
3.3	87x8x25	0,3/1	60/80	2	Merge Traj	291 764

TABLE 3.3 – Paramètres de *slicing* des versions des pavés en gélatine. Les longueurs sont en µm et le recouvrement en %.

La variation de la taille en y des pavés de 8 µm à 12 µm est un ajustement pour imprimer autour du squelette (voir partie 3.2.5.1) qui n'était finalement pas nécessaire[1]. J'ai également diminué la dimension z pour prendre en compte le gonflement de l'hydrogel, d'un facteur 2.

Pour la version 2.1, j'ai voulu pallier le gonflement en espaçant les voxels, et en laissant plus de place entre chaque partie construite. L'idée était que chaque voxel imprimé grandirait dans l'espace autour de lui, et le pavé entier garderait donc la même taille. De plus, cette version est très rapide à imprimer, prenant moins de 5 minutes. Cependant, comme on peut le voir figure 3.16, le pavé 2.1 a gonflé légèrement plus que les autres versions. Ceci laisse penser que des voxels plus serrés permettent d'avoir moins de gonflement car la structure est plus réticulée.

La figure 3.16 montre toutes les versions de pavés du tableau 3.3, imprimées sur un même échantillon. Ils sont imprimés avec une puissance de 0,37 mW (tension de commande : 0,16 V) et un temps d'exposition de 1 ms ou 2 ms, suivant la colonne. La qualité est assez similaire entre les deux temps d'exposition, mais on remarque une différence, en particulier sur les versions 3.2 et 3.3, les pavés restant plus rectangulaires avec un temps d'exposition plus élevé. Ainsi, j'ai choisi d'utiliser tout le temps un temps d'exposition de 2 ms pour la suite.

La version 1 donne un pavé d'assez bonne qualité, il est bien défini et assez fidèle au modèle. Les versions pour lesquelles la distance entre les voxels est réduite sont plus fidèles au modèle 3D. L'exemple le plus flagrant est la version 2.1 qui est assez déformée. Enfin, il y a peu de différences entre les versions 3.2 et 3.3, mais la seconde est 50% plus lente à imprimer. La version 3 est assez propre et s'imprime vite, mais elle connaît un fort gonflement car le *scaffold* intérieur a une maille assez lâche.

Ainsi, les deux pavés les mieux imprimés sont les versions 2 et 3.2. Pour déterminer la version finale, il faut les imprimer sur les treillis pour voir l'influence de celui-ci sur le gonflement.

1. Le squelette se déformait lors de l'ajout de la goutte de gélatine, le pavé ne l'enveloppait alors pas entièrement. En réponse, je l'ai agrandi en y, mais le vrai problème était que le squelette se tordait, et la réponse était plutôt de le corriger que d'adapter le pavé. Les versions suivantes sont donc de nouveau larges de 8 µm.

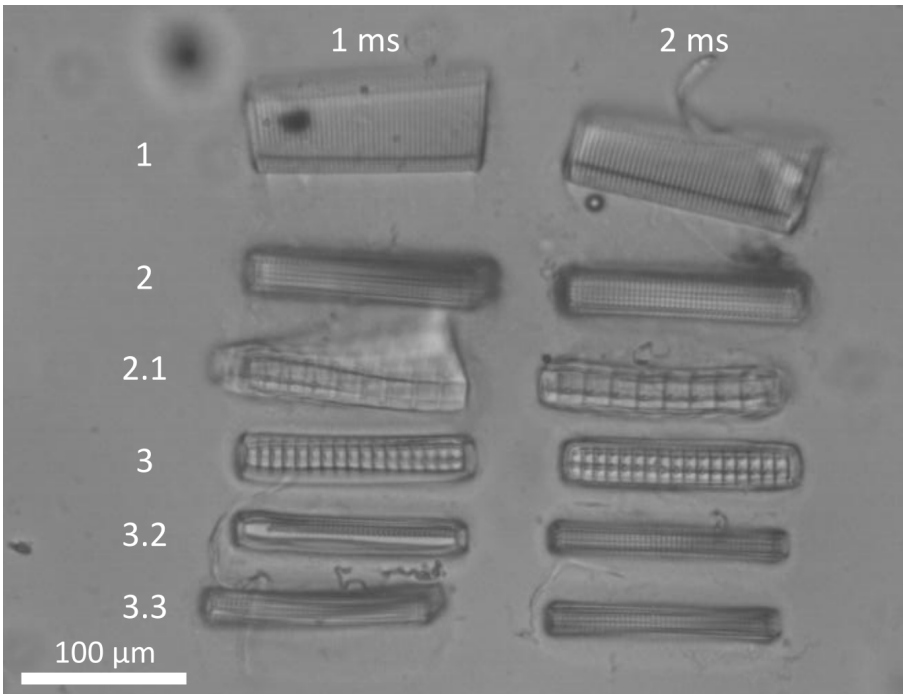


FIGURE 3.16 – Toutes les versions de pavés, vues au microscope optique. La colonne à gauche est le nom de la version et la ligne en haut le temps d'exposition utilisé lors de l'impression.

3.2.4.3 Préparation de la goutte de gélatine-collagène

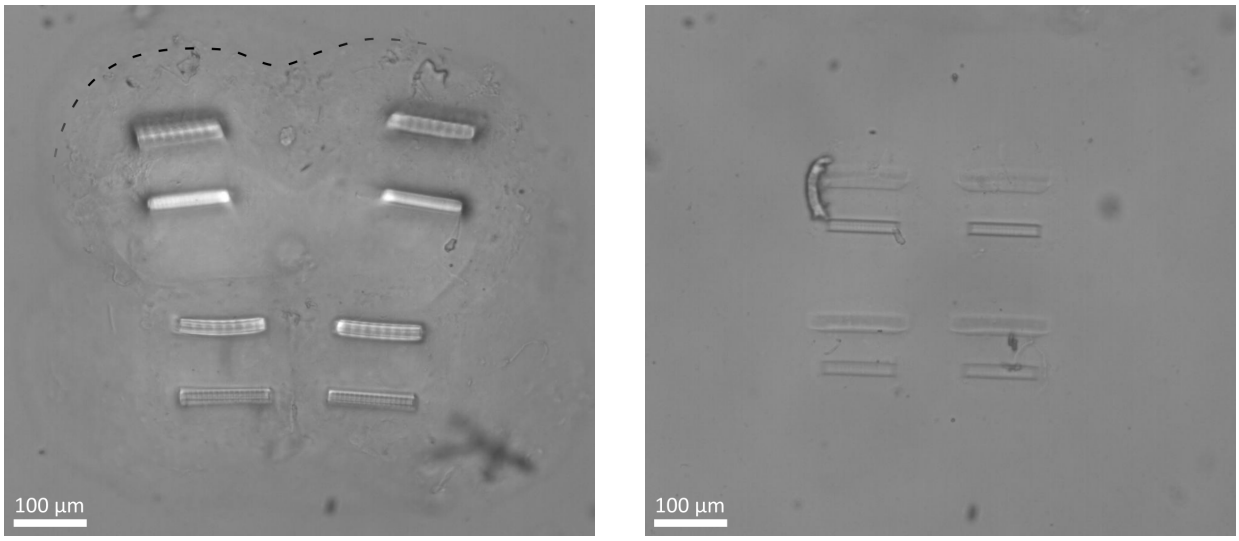
Nous avons observé un problème de qualité d'impression récurrent dans la gélatine : un "nuage" visible au microscope autour des structures (fig. 3.17a et 3.14b), qui semble être du gel partiellement réticulé. Ce nuage n'était pas présent sur tous les échantillons (fig. 3.17b) mais sur un grand nombre d'entre eux, et ce quelle que soit la puissance utilisée. Grâce à une aiguille très fine en tungstène, je peux habituellement faire bouger les structures de façon précise. Ici, l'aiguille est bloquée par le nuage de gélatine, et fait bouger toutes les structures au sein du nuage en même temps, le nuage solidarisant les structures. Celui-ci est donc assez consistant, et adhère bien aux objets imprimés. Il est donc très gênant : pour parvenir à imprimer sans ce nuage, il est essentiel d'en comprendre l'origine. On va donc étudier l'effet de la préparation de la goutte de gélatine, en particulier sa gélification et son séchage.

Quelle est l'origine de cette accumulation de gélatine-collagène autour des structures imprimées ? Nos hypothèses sont :

— diffusion lors de l'impression, le laser étant donc trop puissant ;
— structures qui se désagrègent au rinçage, car pas assez polymérisées, et la gélatine partiellement réticulée reste autour après le rinçage ;
— mauvaise qualité de la solution ;
— problème de gélification de la goutte.

Pour tester ces hypothèses, j'ai imprimé des structures avec de nombreuses puissances mais ce problème est récurrent, quelle que soit la puissance, laissant penser que l'origine est autre. J'ai également refait une solution neuve mais le nuage était toujours présent.

Nous avons étudié l'influence de la durée et des conditions de repos de la goutte avant impression.



(a) Pavés imprimés 30 min après dépôt de la goutte. Présence d'un "nuage" autour des structures.

(b) Pavés imprimés 1h30 après le dépôt de la goutte. Pas de défaut de fabrication.

FIGURE 3.17 – Séries de pavés (v3 et v3.2) imprimés sur le même échantillon, dans la même goutte, avec un décalage dans le temps.

À température ambiante, la gélatine est solide, mais devient liquide à partir de 40°C. Ceci permet de déposer une goutte de gélatine avec une pipette. Habituellement, dans l'équipe au LiPhy, plusieurs gouttes de gélatine sont préparées en même temps puis conservées au réfrigérateur pour être utilisées dans les jours qui suivent. Dans mon cas, je cherche à minimiser le temps de préparation de chaque échantillon, car les structures sont composées de plusieurs matériaux. En effet, je joue sur le design et l'impression des treillis pour qu'ils soient compatibles avec la gélatine. Si j'imprime de nombreux échantillons d'une version de treillis non adaptée, ils sont perdus. Pour que la goutte soit gélifiée, 30 minutes sont suffisantes, ce qui est important pour l'impression.

Pour déterminer le paramètre crucial pour ne pas avoir de nuage autour des impressions, j'ai comparé des gouttes préparées dans différentes conditions. En particulier, pour étudier l'effet du séchage, j'ai placé une goutte de gélatine entre deux lamelles espacées par deux morceaux de ruban adhésif superposés et troués en leur centre, d'un cercle d'environ 7 mm de diamètre dans lequel la goutte est déposée (fig. 3.18). Ainsi, la goutte n'est pas exposée à l'air, mais on peut imprimer dedans. Ensuite, les lamelles sont placées à 4°C pendant 24 heures.

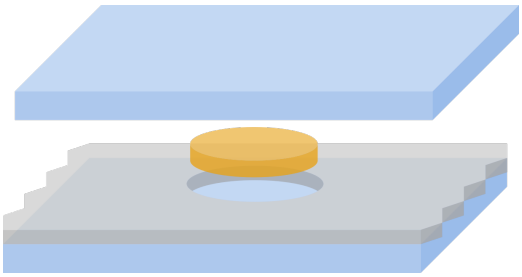


FIGURE 3.18 – Schéma décomposé des échantillons de test. Une goutte de gélatine (orange) est placée entre deux lamelles de verre (bleu), séparées par du ruban adhésif (gris).

Dans le premier échantillon préparé ainsi, j'ai imprimé plusieurs structures, puis rincé normalement l'hydrogel non réticulé. Un nuage était présent autour des objets imprimés dans cette goutte, alors que pour une goutte non couverte placée dans le réfrigérateur pendant une journée, il n'y a pas de tels artefacts de fabrication.

J'ai donc comparé la texture d'une goutte placée entre deux lamelles et une goutte normale après 24 heures à 4°C. Une fois la lamelle du dessus enlevée, la goutte aplatie était encore molle, alors que la goutte laissée à l'air libre était totalement dure. Environ 10 minutes après avoir séparé les lamelles, la goutte ayant été placée entre deux lamelles était dure. Ainsi, pour que la goutte durcisse vraiment, il faut qu'elle s'évapore à l'air libre : l'effet combiné du refroidissement et du séchage est nécessaire.

J'ai retrouvé les mêmes textures en touchant des gouttes après leur dépôt (selon le protocole décrit partie b) : pendant quelques dizaines de secondes, les gouttes sont liquides, car encore chaudes. Ensuite, pendant une période pouvant durer jusqu'à une heure, suivant la taille de la goutte, les gouttes sèchent, du bord vers l'intérieur, le centre étant gélifié et un peu mou. Après une heure, les gouttes sont plus plates et dures. Cette distinction entre gélifié et sec s'est avérée cruciale à la qualité des impressions dans la gélatine.

Ainsi, pour imprimer dans la gélatine sans qu'un nuage se forme autour des structures, il faut imprimer dans l'hydrogel séché, ce qui nécessite au moins une heure de repos à l'air libre après le dépôt de la goutte. En outre, il faut aussi utiliser une solution assez neuve, au maximum vieille de quelques semaines car la solution perd en qualité avec le temps. L'impression des pavés étant validée, nous pouvons maintenant combiner les deux parties : le squelette en Ormocomp et l'enveloppe en gélatine-collagène.

3.2.5 Structure complète - Squelette + Enveloppe + Bille

La fabrication de la structure complète, avec un squelette en Ormocomp attaché à une bille magnétique et recouvert d'une enveloppe de gélatine est un challenge, en particulier les deux impressions successives. Nous avons développé un nouveau protocole de dépôt de la goutte pour imprimer les pavés sur les squelettes sans défauts d'impression. Quelques structures imitant des villosités seront également étudiées, imprimées d'abord en Ormocomp pour développer un modèle 3D adapté, puis en gélatine-collagène.

3.2.5.1 Structure simplifiée avec pavé en gélatine

Pour imprimer la structure complète, j'ai d'abord travaillé sans la bille ; en effet l'ajout de celle-ci est maîtrisé et n'influe pas sur les autres étapes, mais il est chronophage car il faut localiser plusieurs billes et imprimer les structures auprès de celles-ci. Ainsi, j'ai imprimé des réseaux de quelques treillis en Ormocomp, entre 4 et 6 le plus souvent.

a Dépôt de la goutte de gélatine-collagène sur les squelettes

Le plus grand défi auquel nous ayons été confrontés pour l'impression des enveloppes sur les squelettes a été de déposer la gélatine sans déformer les treillis.

Comme on l'a vu dans la partie précédente 3.2.4.3, il faut que la gélatine soit sèche pour pouvoir imprimer les enveloppes. Cependant, en séchant, l'hydrogel exerce des contraintes de grande magnitude sur les treillis, et ceux-ci se déforment (fig. 3.19). Ainsi, on ne peut pas imprimer dessus car les pavés sont perpendiculaires à la surface de la lamelle de verre, et ne seraient donc pas accrochés aux treillis sur toute la surface.

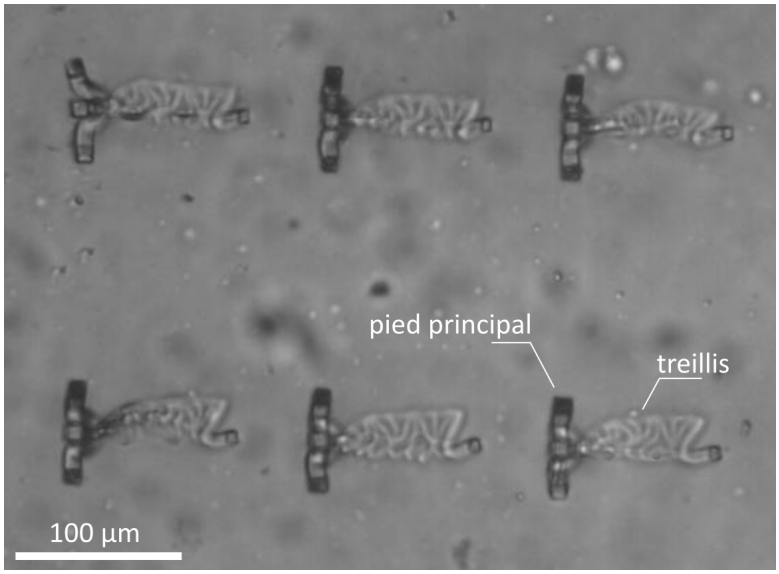


FIGURE 3.19 – Image au microscope optique de squelettes en Ormocomp dans une goutte de gélatine, environ 1 heure après le dépôt de la goutte.

Pour confirmer le fait que les treillis se déforment quand la gélatine sèche, j'ai déposé une goutte de gélatine sur un réseaux de treillis et ai vérifié toutes les cinq minutes la position des treillis au microscope. Jusqu'à une heure pile, les treillis étaient stables, mais à 1h05, ils ont commencé à se déformer et à 1h10, ils étaient fortement inclinés (fig. 3.19). Ceci correspond bien à la chronologie de la gélification et du séchage de l'hydrogel.

Il faut donc réussir à sécher la gélatine en générant le moins de contraintes possible sur les treillis, pour qu'il ne s'inclinent pas. La déformation des treillis est observée en laissant sécher la goutte à 4°C ainsi qu'à température ambiante. Deux alternatives ont été testées : maîtriser la forme de la goutte pour que les contraintes sur les treillis soient uniformes lors du séchage ou que la goutte se déforme très peu pendant le séchage, et modifier la gélification et le séchage pour que la gélatine reste partiellement liquide pendant qu'elle sèche.

La figure 3.20 montre plusieurs tests de mise en place de gouttes :

— a. goutte entre deux lamelles comme en figure 3.18 : la séparation nette des lamelles et de la goutte est impossible après plusieurs heures, la goutte restant collée sur les deux lamelles.
— b. goutte sur une lamelle et couverte d'un morceau de Parafilm jusqu'à ce que la goutte soit gélifiée, puis le Parafilm est retiré et la goutte peut durcir. Malgré cela, les treillis se penchent

quand même.

— c. la lamelle et la goutte sont chauffées à 80°C sur une plaque chauffante. Le but était de forcer le séchage à s'effectuer avant la gélification. Cependant, de nombreuses bulles sont apparues au sein de l'hydrogel, déformant les treillis.

— d. un morceau de PDMS est troué et placé sur une lamelle avant que la goutte ne soit placée dans le trou. L'idée est que la surface de la goutte reste horizontale et plate lors du séchage. En séchant, la goutte a rétréci et les squelettes se sont penchés.

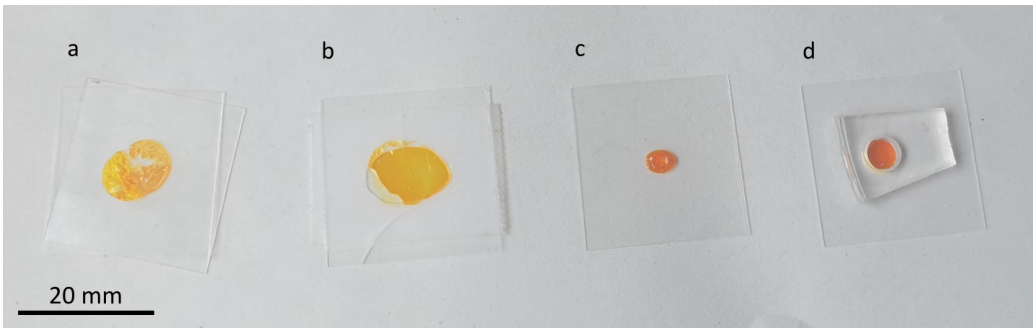


FIGURE 3.20 – Gouttes de gélatine dans différentes configurations pour gélifier et sécher l'hydrogel sans que les treillis ne s'affaissent.

La méthode la plus prometteuse est la c, le problème venant de la trop haute température de la plaque chauffante. Ainsi, j'ai refait la même expérience en chauffant un échantillon sur lequel les squelettes sont fabriqués à 50°C. Le chauffage de la goutte force la gélatine à rester partiellement liquide et l'eau à s'évaporer. La partie supérieure de la goutte, en contact avec l'air, durcit plus rapidement que le centre de la goutte, donnant ainsi une apparence fripée à la goutte (fig. 3.21a). Avec cette méthode, les squelettes en Ormocomp restent droits (fig. 3.21b), permettant l'impression des pavés.

Cependant, un inconvénient de cette méthode est que la goutte se détache parfois de la lamelle de verre quelques heures après avoir été déposée dessus. Ceci implique que l'échantillon doit être rincé rapidement après l'impression pour ne pas décoller l'ensemble des structures imprimées.

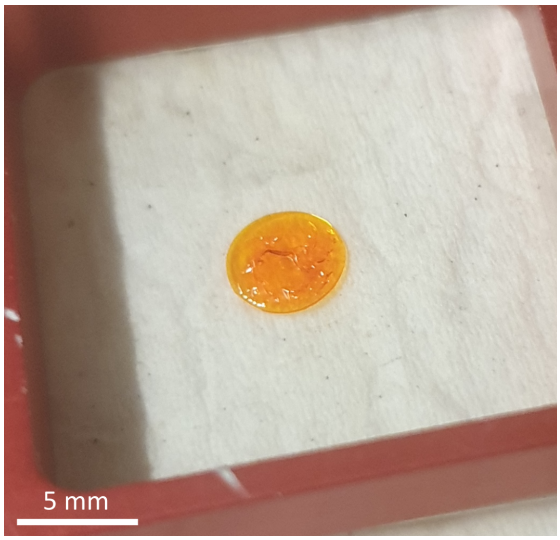
Cette méthode de dépôt de la goutte permet d'appliquer des contraintes assez faibles sur les squelettes pour que les treillis restent perpendiculaires au substrat, ce qui correspond à ce que nous voulions.

b Impression de pavés sur les squelettes

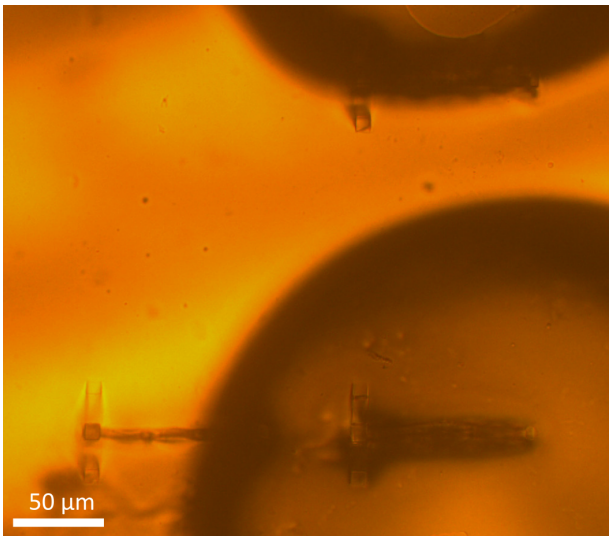
L'impression des pavés sur les squelettes est assez similaire à celle faite dans la gélatine simple. La seule différence est le placement du pavé par rapport aux squelettes.

En utilisant la méthode de dépôt de goutte développée juste avant, j'ai imprimé des pavés en gélatine (version 3) sur des squelettes en Ormocomp sans problème d'impression. La surface supérieure fripée de la goutte n'affecte pas l'impression, ce qui est logique car le laser pénètre la goutte par la lamelle.

Pour rendre plus facile l'impression des pavés, leur modèle 3D est décalé avant le *slicing* aux



(a) Photo de la goutte sèche, dont l'apparence est fripée.



(b) Image au microscope de squelettes droits dans la goutte sèche et fripée (affectant la qualité de l'image).

FIGURE 3.21 – Goutte de gélatine séchée selon la méthode finale, sur une plaque chauffante.

coordonnées nécessaires pour qu'il soit bien placé quand le zéro de la platine est fait dans le coin en haut à gauche du squelette.

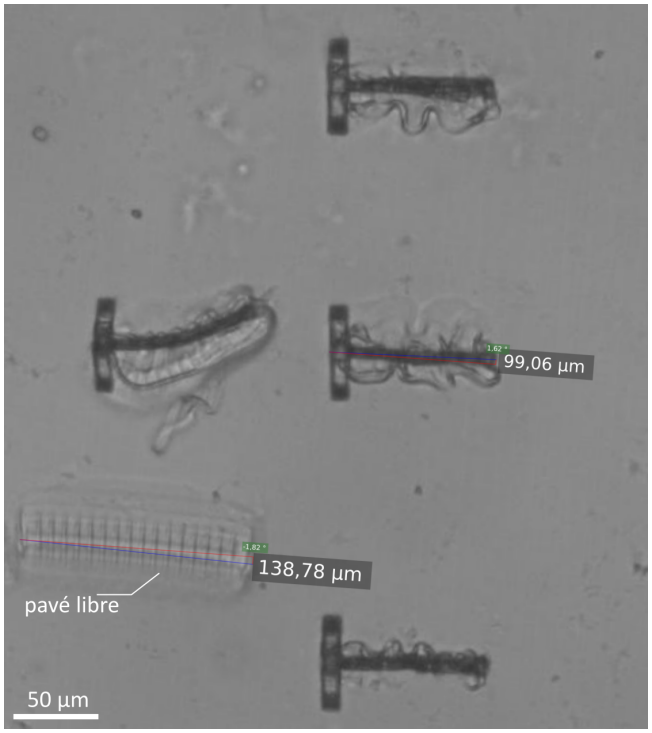


FIGURE 3.22 – Image au microscope optique de pavés imprimés en gélatine sur des squelettes en Ormocomp, et d'un pavé libre. Les ondulations sont dues au gonflement de l'hydrogel et au fait que le centre des pavés est accroché aux treillis de manière non uniforme.

La figure 3.22 montre des pavés imprimés sur quatre squelettes, et un imprimé directement sur la lamelle. Sur le squelette le plus à gauche, le pavé est un peu décalé en y, et à cause du gonflement lors du rinçage, le treillis est déformé. Ceci est aussi dû au fait que le pied secondaire s'est décroché. la pavé seul est bien en place, et on voit qu'il a gonflé, passant d'une longueur de 94 µm à 139 µm environ, soit un facteur de gonflement de presque 1,5. Sur les trois squelettes restants, le pavé était bien imprimé, mais s'est déformé lors du gonflement. En effet, le centre du pavé étant fixé au treillis, le pavé ne peut pas se déformer en tout point, donc la surface crée des ondulations. C'est pour cette raison que limiter le gonflement est important.

L'impression de pavés sur les squelettes paraît simple au premier abord, mais elle demande de la précision quant à la position du pavé, ainsi qu'un *slicing* du pavé particulier, pour empêcher le gonflement de la gélatine.

c Fabrication de la structure complète

Pour fabriquer des structures complètes, avec un squelette, une bille magnétique et un pavé, on suit les étapes développées auparavant.

Le protocole final utilisé pour fabriquer les structures est décrit en annexe A.

En suivant ce protocole, j'ai fabriqué des structures complètes, telle que celle visible figure 3.23. J'ai renversé la structure pour pouvoir la voir de côté et non de dessus. On remarque que le pavé n'est pas bien aligné en z, ce qui peut être dû à une erreur de mise au point lors de l'impression de celui-ci. Sinon, le pavé est d'assez bonne qualité et a peu gonflé, confirmant donc que cette version de pavé est bonne pour imprimer sur les treillis sans créer de "vagues" à la surface du pavé. Le dernier paramètre à régler est un offset en z, pour que le pavé soit parfaitement aligné avec le treillis.

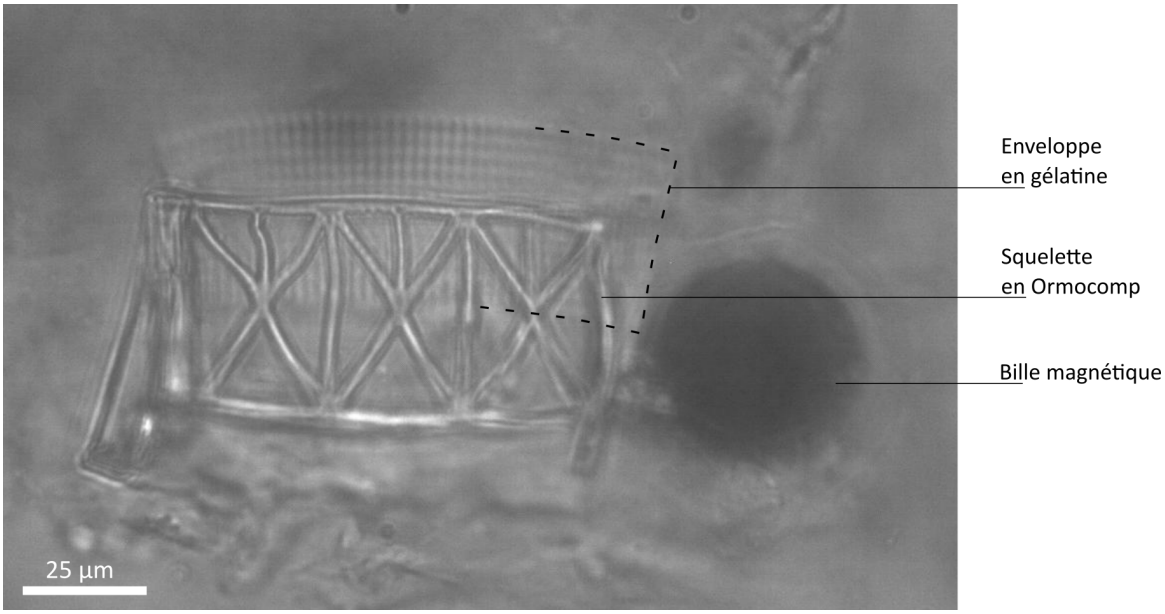


FIGURE 3.23 – Structure complète, avec squelette, bille et enveloppe en gélatine, vue de coté.

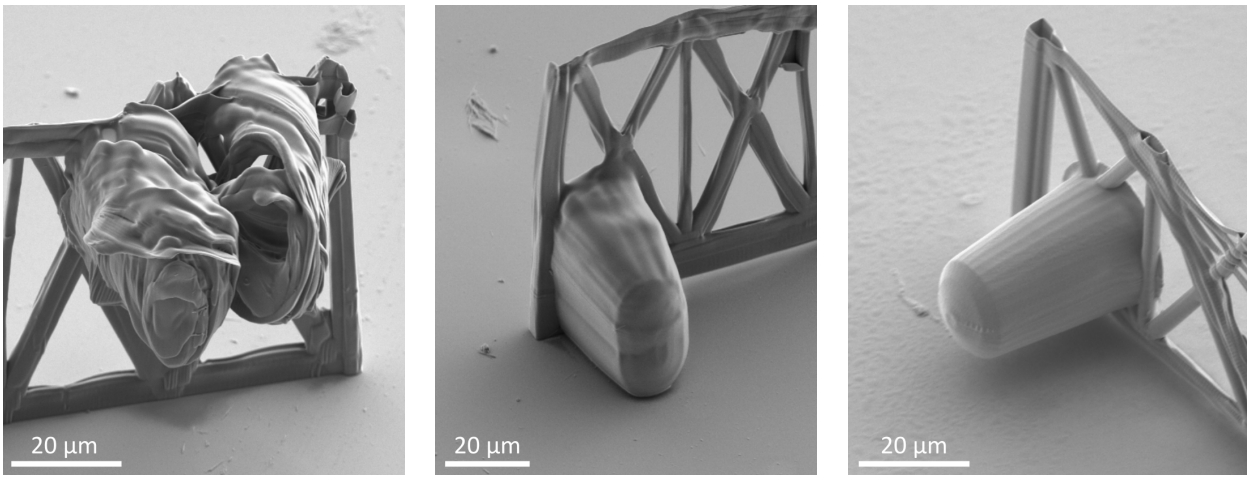
Les paramètres de *slicing* des pavés ont été ajustés pour obtenir la meilleure impression des

pavés dans la gélatine et ceux-ci peuvent être imprimés sur les treillis sans problème. La technique la plus difficile, qui consistait à imprimer dans la gélatine autour des structures en Ormocomp, est validée. Il faut que la goutte de gélatine soit sèche avant l'impression, et ceci sans que les squelettes ne s'affaissent. Pour ce faire, nous plaçons l'échantillon sur une plaque chauffante pendant la gélification et le séchage de la goutte.

3.2.5.2 Imitation des villosités intestinales

Comme expliqué au début du chapitre, notre objectif est de fabriquer une structure déformable imitant des villosités. Le pavé utilisé jusqu'à présent n'a pas la forme recherchée, donc on cherche ici à développer un modèle 3D de villosité, et à déterminer les meilleurs paramètres d'impression associés. Pour ce faire, la structure est d'abord imprimée en Ormocomp, pour permettre de l'observer précisément au MEB, puis en gélatine.

Pour imiter les villosités, j'ai conçu un cylindre légèrement effilé, dont le bout est arrondi, puis fabriqué plusieurs de ces cylindres en Ormocomp en premier lieu, pour valider le design et le *slicing*. Ceux-ci sont d'assez petite taille par rapport à la taille finale, qui est de quelques centaines de microns. Le diamètre maximum des cylindres est de 27,3 µm et leur longueur de 36,3 µm.



(a) Première version, x40. (b) Dernière version, x40. (c) Dernière version, x100.

FIGURE 3.24 – Images MEB de multiples versions de cylindres imprimés dans de l'Orcocomp, avec différents objectifs.

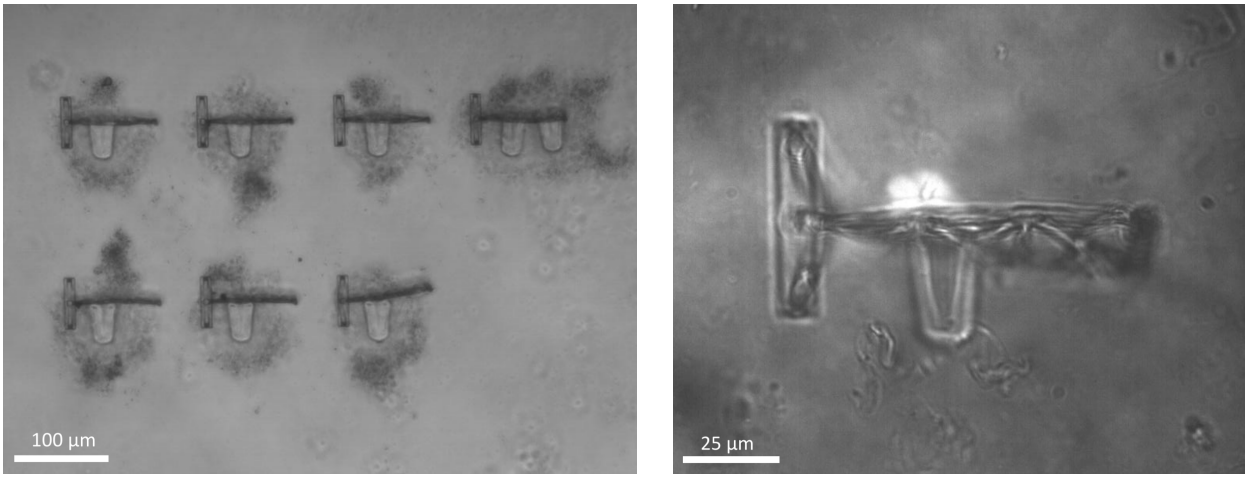
La figure 3.24 montre trois versions de ces cylindres, dont le *slicing* ou l'impression sont différents. Les deux premières versions ont été imprimées avec un objectif x40, et la dernière au x100. On remarque que la qualité de la première version est très mauvaise, les cylindres étant à peine reconnaissables. Leur surface est très déformée, j'ai donc choisi de supprimer le *hatching* pour les versions suivantes. les deux autres images correspondent à la même version de *slicing*, mais la première est imprimée au x40 et la seconde au x100. On voit que la qualité du cylindre imprimé avec l'objectif x100 est bien meilleure, ce qui s'explique par sa résolution plus élevée.

De plus, les cylindres sont destinés à être imprimés dans de la gélatine, donc les voxels sont légèrement plus grands. Les paramètres de la version finale sont présentées dans le tableau 3.4.

Taille voxel x/y	Recouvrement x/y	Remplissage	Autres
0,3/2 µm	80/80%	Non	*Merge traject. et Adapt. layer thickness*

TABLE 3.4 – Paramètres de *slicing* utilisés pour les cylindres finaux.

Ensuite, j'ai imprimé ces cylindres arrondis dans la gélatine et les ai attaché aux squelettes en Ormocomp. Ces échantillons (fig. 3.25) ont été faits avant de perfectionner le protocole d'impression de l'enveloppe en gélatine-collagène, un nuage est donc présent autour des structures.



(a) Vision globale des structures. (b) Zoom sur une structure.

FIGURE 3.25 – Cylindres arrondis imitant des villosités imprimés dans de la gélatine sur des treillis en Ormocomp. Images au microscope optique.

Les cylindres sont bien imprimés sur tous les squelettes, et comme on peut le voir figure 3.25b, la surface est régulière et fidèle au modèle 3D. La fabrication des cylindres sur les piliers est donc en bonne voie, le fichier d'impression étant validé [2].

L'impression des cylindres en gélatine n'a pas encore été finalisée, par manque de temps, mais la suite consiste à combiner l'impression d'un pavé et de plusieurs cylindres sur un squelette. Le pavé est utilisé pour envelopper entièrement le treillis, permettant aux cellules de croître sur celui-ci, et les cylindres imitent les villosités. Idéalement, tout ceci serait fait à plus grande échelle avec le deuxième montage de 2PP du LiPhy qui possède une plus grande platine de 300 microns.

3.3 Actionnement

L'objectif final de ces structures hybrides est de cultiver des cellules sur l'enveloppe en gélatine, et de faire bouger la structure complète, en la fléchissant dans la longueur. Pour ce faire, on attache une bille à chaque structure avec la technique expliquée section 2.2.1.6.

2. Le seul problème restant est le nuage, qui est en toute logique soluble grâce à la méthode décrite précédemment (3.2.4.3).

Pour pouvoir fléchir la structure comme voulu, il faut aimanter la bille dans l'axe du treillis. Ainsi, dans un champ rotatif, la bille s'alignera avec celui-ci et déformera la structure (fig. 3.26). Ensuite, l'actionnement magnétique est possible. Ici, on regardera uniquement la structure en Ormocomp, sans enveloppe en gélatine.

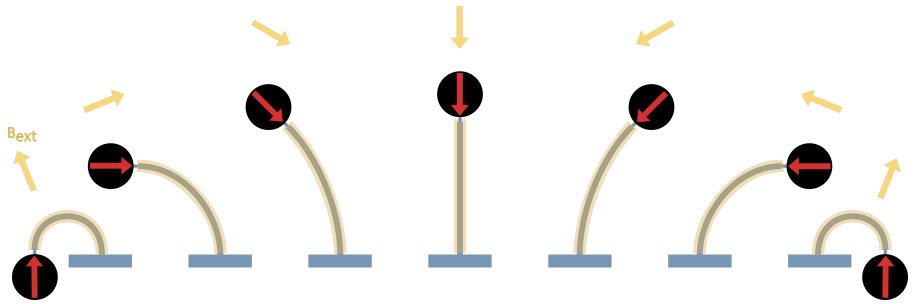


FIGURE 3.26 – Schéma montrant la flexion de la structure avec une bille aimantée dans l'axe du treillis dans un champ magnétique tournant.

Les simulations faites sur le squelette (fig. 3.6) suggèrent que la structure peut se déformer au maximum de ses capacités, jusqu'à faire un demi-cercle, sans nuire à l'intégrité du squelette.

3.3.1 Aimantation de la bille

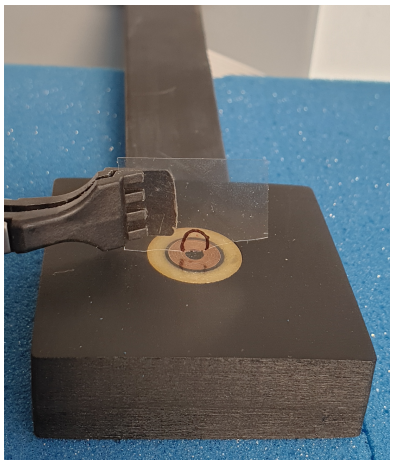
Pour actionner la structure comme voulu, la bille doit être aimantée dans le plan de base. Si on l'aimante dans l'axe du treillis, on simplifie le repérage de la direction du champ d'actionnement. Deux méthodes s'offrent à nous pour aimanter les billes : la première consiste à placer un aimant permanent (voir partie 2.2.3.1) sous la lamelle, dans l'axe voulu, mais l'aimantation rémanente de la bille est alors d'environ 75 mT, ce qui est trop faible pour pouvoir déformer la structure autant que voulu. Une méthode alternative est l'utilisation du générateur de champ pulsé introduit partie 2.2.2.2. Celui-ci génère un champ au niveau de la bobine et sortant de la surface de celle-ci, décroissant très rapidement.

Idéalement, il faut que les billes soient à moins d'un millimètre de la surface de la bobine pour être aimantées à saturation. En prenant en compte l'orientation des structures sur la lamelle, le seul moyen d'approcher suffisamment les billes de la bobine est de couper la lamelle de verre devant les billes, comme montré sur le schéma 3.27.

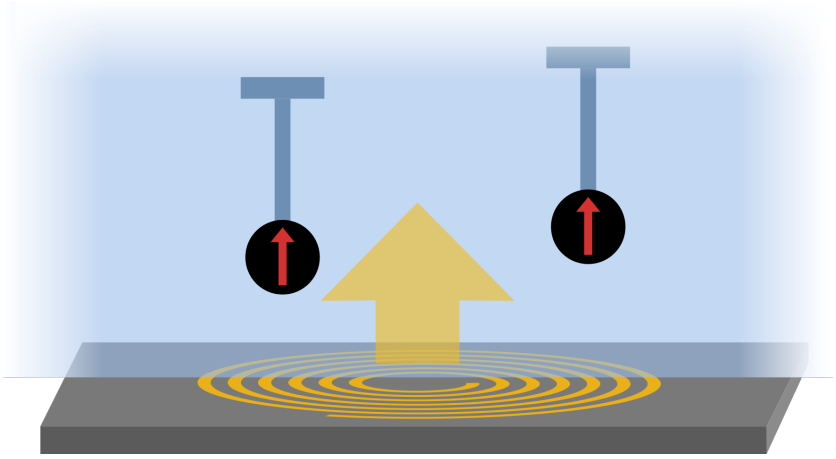
Pour découper la lamelle, je dessine une ligne au plus proche des structures en regardant avec un microscope, puis j'utilise un stylo-diamant pour couper sur la ligne. Je dessine également un demi-cercle autour des structures, pour pouvoir les centrer lors de l'aimantation.

Pour aimanter les billes, je place le bord coupé de l'échantillon au centre de la bobine et je déclenche une impulsion avec une tension de 400 V, qui génère un champ de 4 T à la surface de la bobine. Ainsi, les billes sont aimantées à saturation (750 mT) et les structures peuvent être déformées avec la plus grande amplitude possible.

Ce protocole permet d'aimanter plusieurs structures en même temps tant qu'elles sont placées proches les unes des autres, dans un carré de 4x4 mm, ce qui est notre cas puisque les structures



(a) Mise en place de l'échantillon sur le générateur.



(b) Schéma montrant l'échantillon sur le générateur (pas à l'échelle).

FIGURE 3.27 – Aimantation des billes accrochées aux squelettes avec le générateur pulsé.

sont imprimées dans une seule goutte de taille similaire. En général, les structures sont espacées de moins d'un millimètre.

3.3.2 Actionnement du squelette seul

Pour confirmer que l'actionnement de la structure était possible, j'ai d'abord voulu actionner uniquement le squelette interne. Pour ce faire, j'ai utilisé la version finale des squelettes (fig. 3.13b), et accroché des billes à plusieurs structures. Deux méthodes d'actionnement sont possibles, la première consiste à faire tourner manuellement un aimant permanent à proximité de l'échantillon (description section 2.2.3.1), et la seconde à placer l'échantillon au centre d'un ensemble d'électroaimants (description section 2.2.3.2).

3.3.2.1 Aimant permanent

Les premiers essais de déformation des structures ont été faits avec un aimant permanent cylindrique troué en son centre tournant autour d'un axe. Le bord de l'aimant est placé à 5 mm de la coupe de la lamelle, soit environ 7 mm des échantillons. D'après la simulation du champ émis par l'aimant (fig. 2.5), le champ est compris entre 50 et 100 mT au niveau des structures, suivant l'orientation de l'aimant et les erreurs de manipulation (déplacement de l'axe de rotation, inclinaison de l'aimant).

La figure 3.28 montre des images extraites d'une vidéo au microscope lors de l'actionnement magnétique d'un squelette avec un aimant permanent, ainsi qu'une comparaison avec la simulation du même squelette. La structure se déforme aisément jusqu'à ce que la bille touche le pied principal du squelette. Si on continue à tourner l'aimant, la structure finit par décrocher et s'aligner avec le champ à un angle plus aigu par rapport à sa position de repos (fig. 3.29).

On remarque sur la deuxième série d'images (fig. 3.28.e-h) que la déformation réelle est très

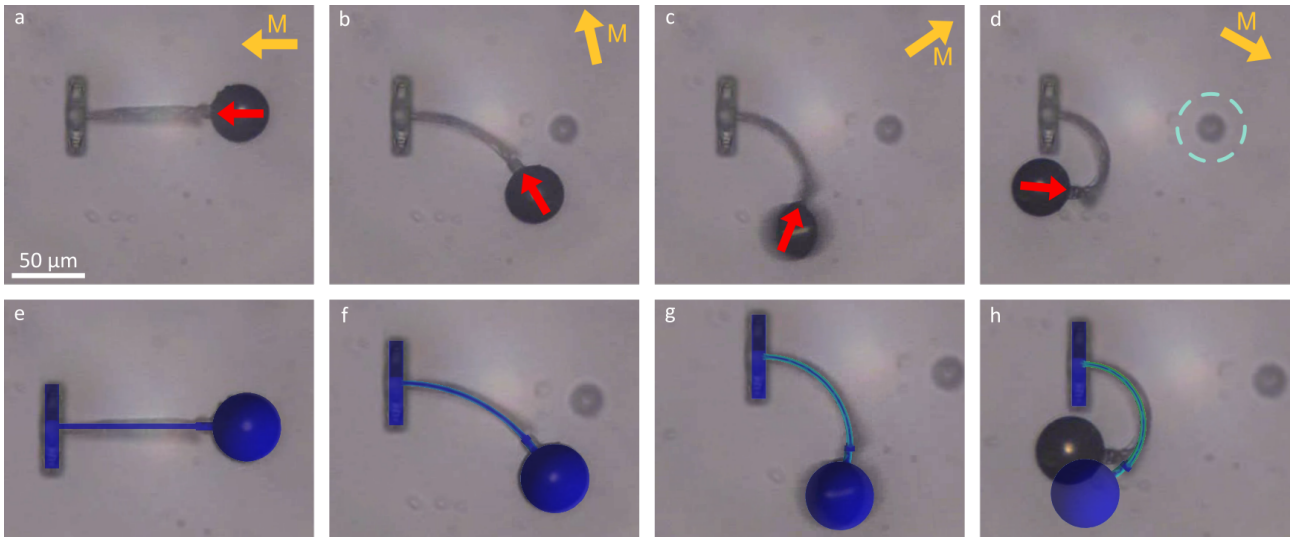


FIGURE 3.28 – Squelette déformé par l'actionnement magnétique de la bille. a-d. La flèche rouge représente l'aimantation de la bille, la flèche jaune le champ extérieur et le cercle cyan le point sur lequel la bille se bloque parfois. e-h. Comparaison de la déformation réelle avec la simulation.

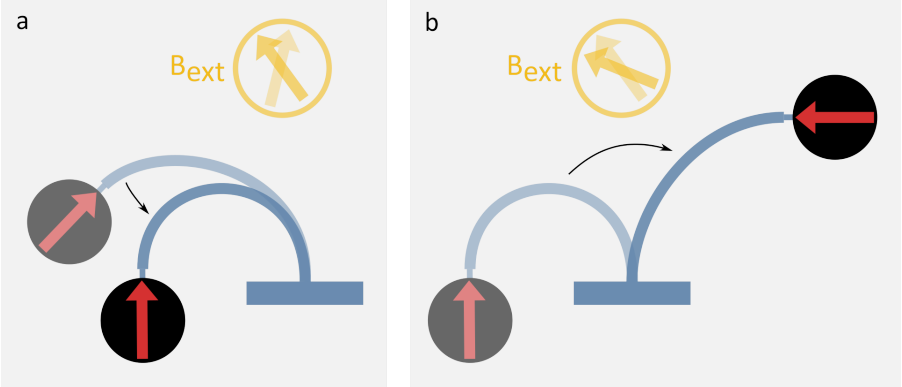


FIGURE 3.29 – Alignement de la structure avec le champ dans différentes configurations. a. Situation normale, la bille s'aligne avec le champ tournant. b. Le champ tourne trop et la bille décroche du champ pour se réaligner dans l'autre position possible.

proche de la déformation simulée lors de la conception du squelette, en particulier pour les trois premières images. Sur la dernière, il y a un léger décalage au niveau de la bille, qui peut être expliqué par les incertitudes sur la taille du lien entre la bille et le squelette, qui se plie plus que dans la simulation. Ceci est plus spécifiquement remarquable sur cette image que sur les premières car le moment exercé sur la bille est plus élevé.

Sur les images, il y a également un point plus foncé au niveau du point de repos de la bille (entouré en cyan sur la figure 3.28.d). Ce point n'apparaît pas sur tous les échantillons. Au niveau de celui-ci, la bille se bloque parfois, nécessitant un plus grand couple pour se décrocher de ce point. L'origine de ce point n'est pas entièrement déterminée, mais il est probable que ce soit un défaut de fabrication, un reste de résine qui s'est mal rincé par exemple.

3.3.2.2 Électroaimants

Nous avons également utilisé le cube d'électroaimants (voir section 2.2.3.2) pour actionner les structures. Ceci permet d'appliquer un champ précis connu et de le moduler simplement.

Les champs générés varient en amplitude selon une fonction triangle d'amplitude maximale de 60 mT (ou 100 mT) et minimale de -60 mT (ou -100 mT), et de période choisie entre 1 et 5 secondes. Pour avoir un mouvement symétrique, le champ est orienté perpendiculairement au treillis.

Une structure placée dans ce champ oscille avec la fréquence définie. Les images sont très similaires à celles de la figure 3.28, la différence principale étant dans l'évolution temporelle. En effet, le squelette oscille de façon régulière, contrairement à ce que l'on observe quand l'actionnement est manuel. De plus, l'amplitude de déplacement est plus faible, car l'angle du champ est plus faible. Il est cependant possible de générer un vrai champ tournant avec ces électroaimants.

3.3.3 Actionnement de la structure complète

La résine gélatine-collagène a un module de Young très bas par rapport à celui de l'Ormocomp, de quelques dizaines de kPa [79], soit un rapport de plus de 1000 avec l'Ormocomp qui a un module de Young voisin de 1 GPa. Ainsi, l'enveloppe en gélatine ne devrait avoir que très peu d'effet sur la déformation de la structure complète. Malheureusement, par manque de temps, nous n'avons pas pu faire cette expérience.

Pour conclure, grâce aux billes magnétiques aimantées à saturation, on parvient à déformer la structure comme prévu lors de sa conception, avec un aimant permanent et avec un ensemble d'électroaimants. Cette déformation correspond également aux simulations, et est satisfaisante.

3.4 Culture cellulaire

L'objectif final est d'utiliser les structures développées dans la première partie du chapitre en tant que substrats de culture cellulaire. Le collagène et la gélatine sont communément utilisés pour faire de la culture cellulaire. La formulation utilisée ici a été employée avec succès pour fabriquer des matrices 3D de gélatine et y cultiver des cellules [4].

Les expériences présentées ici ne sont encore qu'aux premiers stades de développement. Elles ont été effectuées par Caterina Tomba a l'INL.

Je présenterais d'abord la méthode suivie pour cultiver les cellules et les premiers tests, puis j'exposerai les résultats sur structure hybride.

3.4.1 Méthode

Nous utilisons des cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney, soit rein de chien), car elles peuvent être utilisées comme modèle pour le tissu épithélial de mammifères, et réagissent à leur environnement 3D [82, 83]. De plus, les noyaux des cellules que nous utilisons sont modifiés gé-

nétiquement de façon à être fluorescents (histone GFP) et facilement visibles au microscope en fluorescence. Les cellules MDCK doublent leur population en une vingtaine d'heures et permettent donc des expériences rapides, sur quelques jours.

Les échantillons sont laissés dans du PBS pendant 24 heures au réfrigérateur avant le dépôt des cellules pour s'assurer qu'ils sont complètement gonflés et stables. Ensuite, les cellules sont déposées sur les structures dans du milieu de culture et les échantillons sont gardés à 37°C dans un incubateur contrôlé en taux de CO_2 (5%).

Tout d'abord, nous avons cherché à garantir la compatibilité des cellules et des substrats en gélatine imprimés par 2PP, nous avons donc fait des tests de culture cellulaire sur des grands pavés plats, de quelques centaines microns de coté. Cependant, afin de construire ces pavés en un temps raisonnable (moins de 2 heures pour un pavé de 100x100x12 µm), il faut faire des compromis au niveau du *slicing*, en réduisant la densité de remplissage et l'écart entre les voxels imprimés. De plus, les pavés étant horizontaux, l'orientation des voxels est différente de celle des voxels des pavés imprimés sur les squelettes. Ainsi, les pavés finaux sont très différents de ceux imprimés sur les treillis. Les cellules n'interagissent donc pas de la même manière avec ces pavés plats qu'avec les enveloppes sur les treillis.

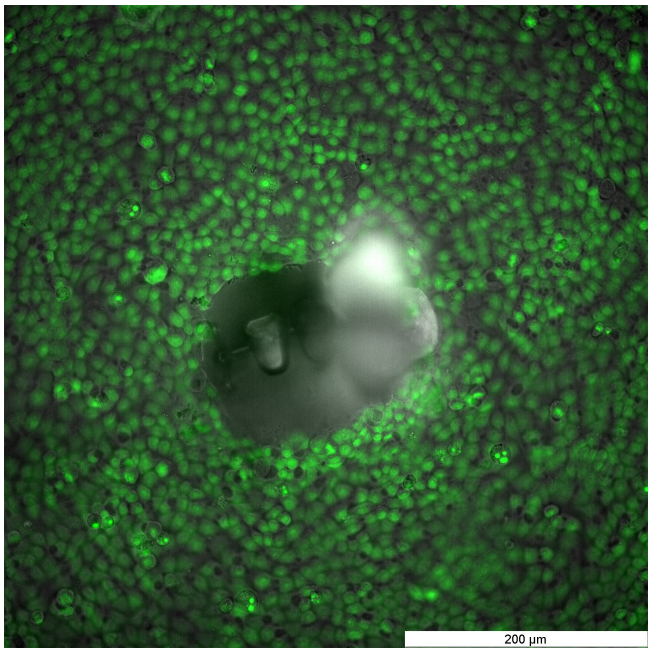


FIGURE 3.30 – Premiers tests de culture cellulaire sur structure hybride. Les noyaux cellulaires sont marqués en vert. Le nuage de gélatine empêche les cellules d'atteindre la structure. Premier jour de culture.

La figure 3.30 montre des cellules autour d'une des premières structures hybrides Ormocomp + gélatine-collagène imitant des villosités, avec un nuage de gélatine autour de la structure (voir partie 3.2.4.3). Cette expérience prouve à nouveau que le défaut de fabrication était problématique, les cellules ne pouvant pas atteindre les structures imprimées.

Le protocole décrit ici sera utilisé pour tous les tests de culture cellulaire.

3.4.2 Résultats sur squelette + enveloppe

On utilise ensuite ce protocole pour cultiver des cellules sur la structure hybride consistant d'un treillis en Ormocomp et d'une enveloppe en gélatine pendant 3 jours. Sur la structure utilisée, le pavé n'est pas parfaitement centré sur le squelette, mais ça ne devrait pas avoir d'influence pour la culture cellulaire.

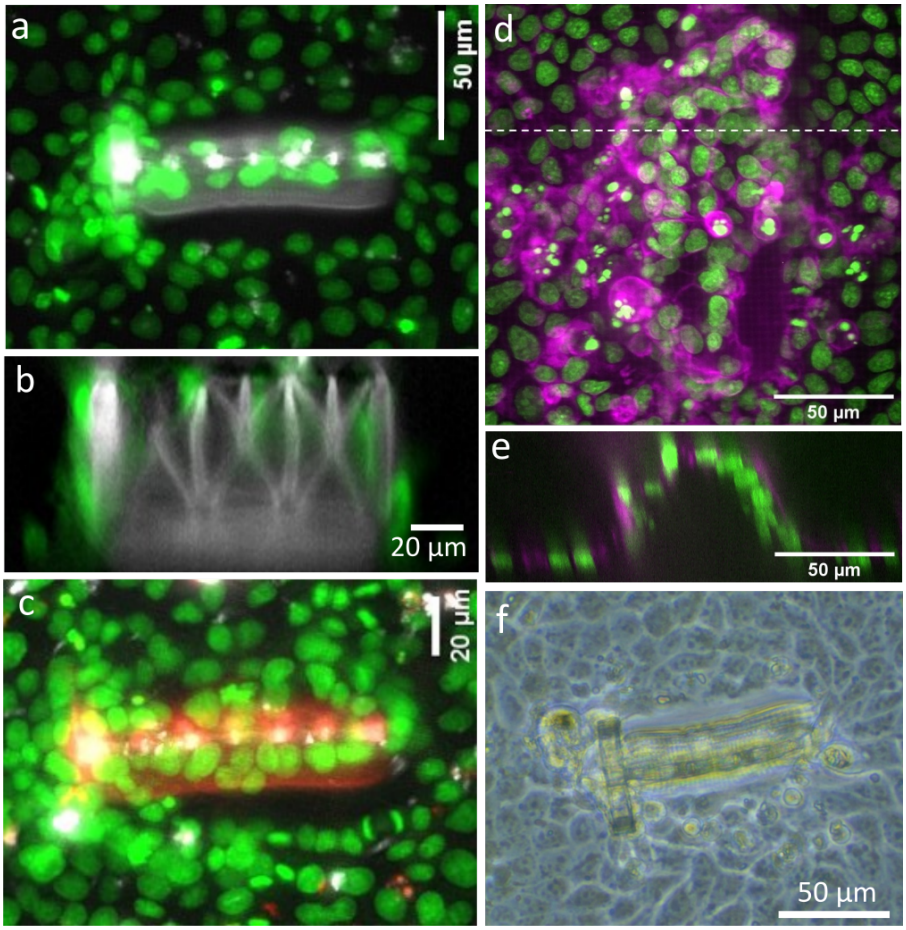


FIGURE 3.31 – Culture cellulaire (MDCK) sur un squelette recouvert d'un pavé de gélatine. Pour les images au microscope à épifluorescence (a-c), le vert est le noyau cellulaire, le blanc l'Ormocomp et la gélatine, et le rouge la gélatine. Pour les images au microscope confocal (d, e), le vert est le noyau cellulaire (histone-GFP) et le magenta la membrane cellulaire (CellMask™ Deep Red). a. Vue de dessus (épifluorescence), jour 1. b. Vue de coté dans l'axe central du treillis (épifluorescence), jour 1. c. Vue de dessus (épifluorescence), jour 2. d. Vue de dessus (Max projection en z, confocal), jour 3. e. Coupe orthogonale le long du trait blanc pointillé en (d) (confocal), jour 3. f. Vue de dessus (microscope à contraste de phase), jour 1.

La figure 3.31 montre l'évolution de cet échantillon aux jours 1, 2 et 3. Les images 3.31.a, b et f. sont des vues du treillis au premier jour de culture. On voit que des cellules sont placées sur la structure, aussi bien sur l'Ormocomp que sur la gélatine. Après 2 jours de culture, les cellules sont plus nombreuses, montrant qu'elles se sont multipliées, et leur nombre a environ doublé sur la structure. Après 3 jours de culture, il y a encore une augmentation de la population. On remarque

en particulier sur la coupe figure 3.31.e que les cellules sont nombreuses sur la structure, avec une densité plus élevée que sur la lamelle, mais qu'elles sont disposées en "dôme", alors qu'on s'attend à des angles plus droits car le pavé est orthogonal à la lamelle.

D'après les premiers tests, les cellules adhèrent à la structure en gélatine-collagène et prolifèrent dessus, mais il est nécessaire de faire plus d'échantillons pour pouvoir conclure sur la culture cellulaire sur nos structures.

3.5 Conclusion et perspectives

Afin de créer un milieu de culture imitant les conditions *in vivo*, nous avons développé et fabriqué une structure magnétique hybride Ormocomp-gélatine pouvant se déformer, étudié son actionnement, ainsi que commencé la culture cellulaire sur les structures.

Ces structures sont composées de deux parties imprimées avec deux matériaux différents, successivement. Chaque partie a d'abord été étudiée séparément : le design choisi pour le squelette est un treillis en Ormocomp, qui permet de fortes déformations tout en étant assez rapide à imprimer et solide, et le *slicing* de pavés en gélatine-collagène a été analysé pour déterminer celui qui avait la meilleure forme finale après rinçage. De plus, nous avons déterminé que la gélatine devait être sèche avant l'impression pour ne pas avoir de défauts de fabrication.

Pour combiner ces deux éléments, nous avons développé un protocole de fabrication adapté, permettant de sécher la goutte de gélatine sans appliquer des contraintes trop élevées sur les squelettes. La méthode trouvée consiste à chauffer l'échantillon pendant qu'il sèche, afin d'empêcher la gélification rapide.

Par ailleurs, l'actionnement magnétique a été fructueux, les structures se déformant totalement et selon les simulations effectuées. Nous devons encore étudier l'actionnement d'une structure complète avec pavé en gélatine-collagène, dont la déformation devrait être similaire à la déformation du squelette simple.

Le travail sur la culture cellulaire est encore à ses débuts, mais les résultats sont encourageants. Nous allons le continuer, à la fois sur des structures simples en gélatine, et sur des structures complètes. Après cela, la déformation de la structure complète avec cellules devrait être possible et permettra d'étudier la réaction des cellules à la déformation du substrat.

De plus, la fabrication de structures hybrides étant maîtrisée, nous pourront également travailler sur la conception et l'impression d'autres structures en gélatine, et à des échelles plus grandes, soit pour mieux répliquer les villosités intestinales, soit pour d'autres applications.

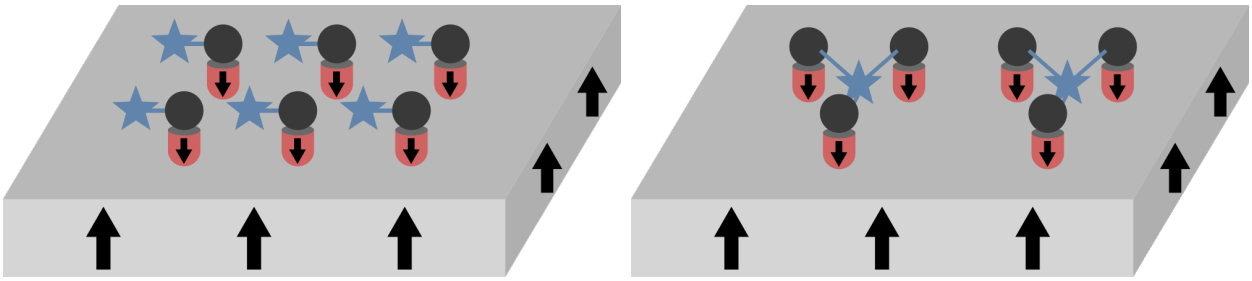
Chapitre 4

Méthode d'impression en série

4.1 Contexte et concept

Comme expliqué dans les parties 2.2.1.6 et 3.2.5, la méthode d'impression actuelle consiste à imprimer la structure à côté de la bille magnétique après l'avoir localisée. Ce processus individuel et manuel est assez long et entrave la fabrication en série d'objets de façon rapide et reproductible. Pour pallier ce problème, il faudrait placer les billes à des endroits prédéterminés afin de pouvoir rentrer les coordonnées connues dans le logiciel d'impression Lithos, et donc imprimer à coté de plusieurs billes en n'en ayant localisé qu'une seule au départ.

Pour placer les billes, nous avons décidé d'utiliser des substrats magnétiques TMP (décrits partie 2.1.5). Ceux-ci permettront de piéger magnétiquement les billes à des endroits choisis par le motif appliqué à l'aimant TMP. Ensuite, il est facile de localiser un point du motif et d'en déduire les coordonnées de toutes les billes, puisqu'elles sont alignées sur le motif. Ainsi, il est avant tout plus simple de construire des objets à une bille (fig. 4.1a), car la mise en place est plus rapide. Mais cette méthode simplifie surtout énormément la fabrication d'objets à plusieurs billes : en effet, on peut choisir l'emplacement de toutes les billes nécessaires et construire entre celles-ci (fig. 4.1b). Cependant, les substrats TMP sont métalliques et imprimer par 2PP sur des substrats opaques et réfléchissants est un défi.



(a) Micro-robots à 1 bille. (b) Micro-robots à 3 billes.

FIGURE 4.1 – Concept pour l'impression collective sur substrat TMP.

Pour mettre en place cette méthode de fabrication, il y a plusieurs étapes à aborder : le design et la fabrication des aimants TMP, le piégeage des billes sur ceux-ci, l'impression 3D sur ces substrats,

et pour finir la fabrication de micro-structures magnétiques sur les substrats, alliant donc la capture des billes et l'impression sur les substrats TMP.

4.2 Pièges à billes

Pour commencer, nous avons vérifié que les billes pouvaient effectivement être piégées sur les aimants TMP (voir partie 2.2.4). L'idée est de créer un puits magnétique qui attire une seule bille (fig. 4.2), et que chaque puits puisse capter une bille afin que tous les pièges soient remplis.

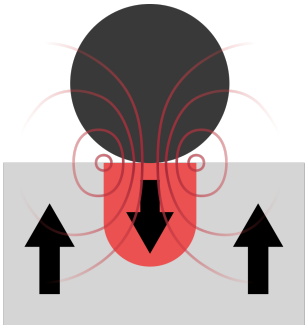


FIGURE 4.2 – Schéma du piégeage d'une bille sur un aimant TMP.

Pour que la bille soit attirée depuis assez loin, il faut un gradient assez fort, mais un motif assez petit pour qu'une seule bille se fixe sur chaque puits. De plus, la force magnétique qui retient la bille doit être élevée, pour que la bille reste attachée pendant et après le dépôt. On étudiera l'influence de la forme et du rayon des pièges sur la capture, et différents protocoles de fabrication seront testés.

La technique finale de capture consistera à déposer le substrat, couche aimantée vers le bas, dans une solution d'éthanol et de billes non aimantées triées par taille. Les pièges seront ronds de diamètre similaire à celui des billes.

4.2.1 Motifs du masque

Pour remplir ces conditions, nous avons fabriqué un masque directement sur un substrat TMP, constitué de plusieurs quadrillages de motifs, pour comparer l'efficacité de divers motifs de pièges. Différents diamètres ont été testés expérimentalement, de 2,5 µm à 30 µm. Des simulations de pièges magnétiques ont été faites avec Comsol.

4.2.1.1 Simulations des pièges avec Comsol

La capture des billes se déroule en deux étapes : d'abord l'attraction des billes par les pièges, puis leur piégeage sur place. Pour toutes les simulations de pièges, l'épaisseur du film est de 4 µm. Pour les simulations avec bille, on suppose que les billes sont en matériau magnétique doux de perméabilité $\mu_r = 4000$.

La simulation d'un piège circulaire de diamètre 20 µm est visible figure 4.3. On voit que le champ est maximal au niveau du bord du piège.

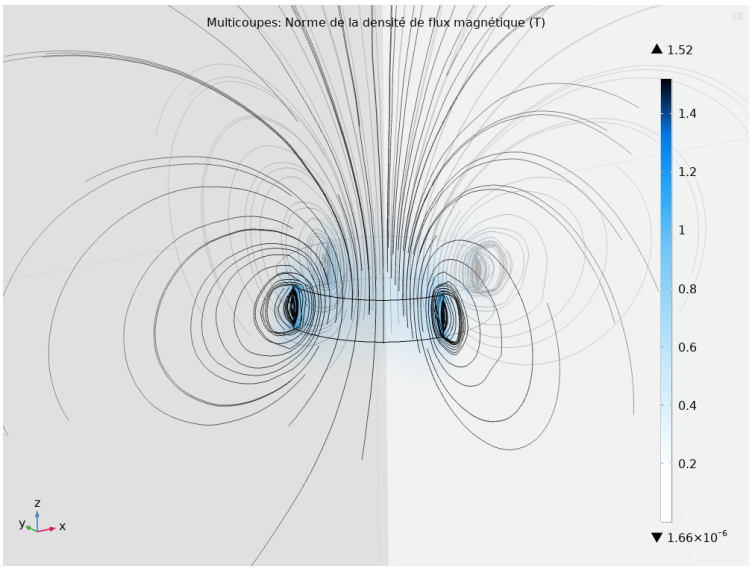


FIGURE 4.3 – Simulations d'un piège circulaire de 20 µm de diamètre.

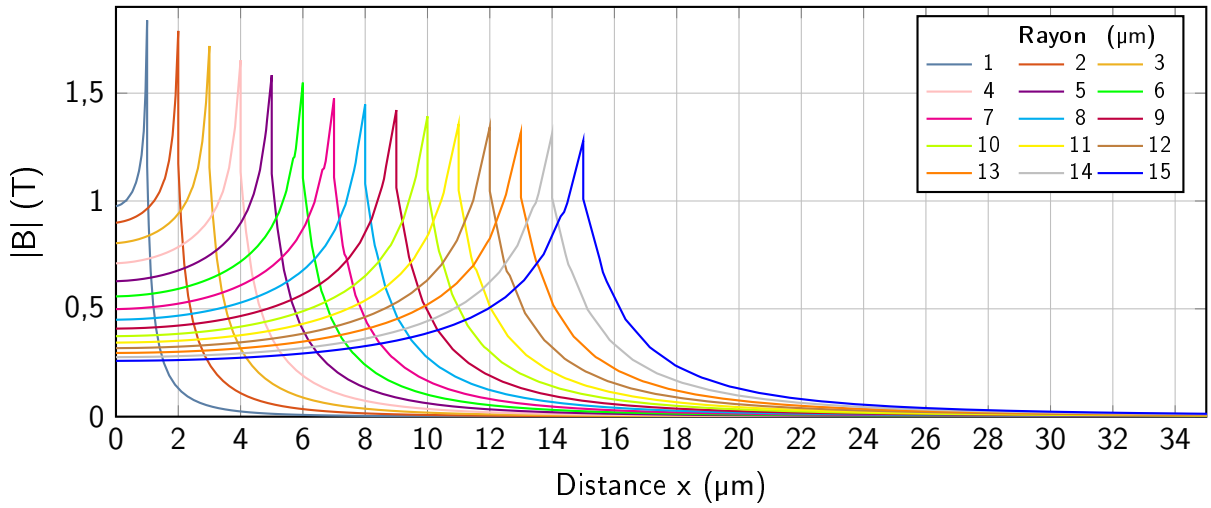
Cette même simulation a été faite pour 15 rayons de pièges, entre 1 µm et 15 µm avec un pas de 1 µm. Le champ magnétique selon l'axe x est visible figure 4.4a, chaque couleur représentant un piège de rayon différent. Cet axe commence au centre du piège, à la surface du substrat. Le gradient de ce champ $\frac{d|B|}{dx}$ est représenté figure 4.4b.

On remarque que plus le piège est petit, plus le champ maximal est élevé, que ce soit horizontalement (en x) ou verticalement (en z). Un champ plus élevé au niveau du piège aide à garder la bille en place une fois qu'elle est piégée, les pièges les plus petits sont donc plus efficaces pour garder les billes piégées.

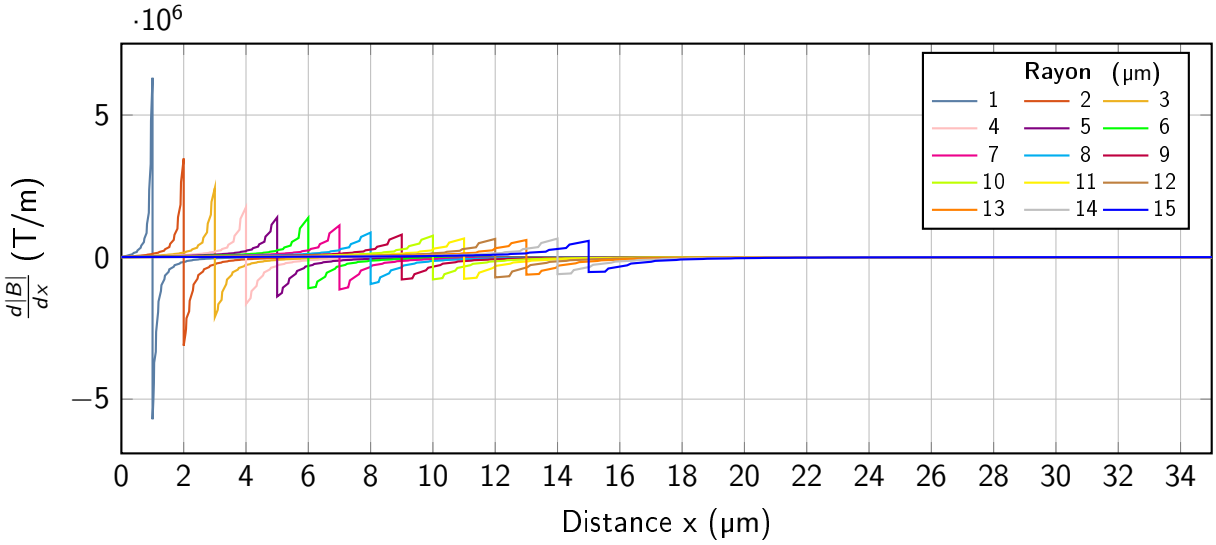
Mais avant de pouvoir garder la bille en place, il faut déjà que celle-ci arrive sur le piège. Pour que la capture soit efficace, il faut que le piège attire la bille depuis une distance assez élevée, autour de quelques dizaines de microns (espacement entre les pièges). Sur la figure 4.4, le champ et le gradient en x décroissent plus rapidement à partir du bord du piège pour les pièges les plus petits que pour les plus grands. Un piège plus grand attire donc une bille sur un plus grand rayon à partir du bord du piège.

Par exemple, on voit que pour le piège de plus petit rayon (1 µm), le champ tombe sous 5 mT après 6 µm, alors que pour le plus grand (15 µm de rayon), ce n'est qu'après 32 µm. De plus, il faut prendre en compte, outre la distance au bord du piège, aussi la distance au centre du piège : cela donne au piège un plus grand rayon d'action. Ainsi, un piège de 15 µm de rayon génère un champ supérieur à 5 mT sur un rayon total de 47 µm, alors qu'un piège de 2 µm de rayon ne génère 5 mT ou plus que sur 12 µm de rayon total.

Par ailleurs, le champ magnétique en z est également important pour l'attraction des billes. Sur la figure 4.5, on voit que pour les pièges les plus petits, le champ au centre du piège est très fort mais décroît très rapidement quand on s'éloigne verticalement du piège. Ainsi, si une bille est située à quelques dizaines de microns du piège, elle sera plus facilement attirée par un gros piège. Avec le protocole mis au point pour le piégeage des billes, ce paramètre est très important, puisque le substrat magnétique TMP est renversé et en appui sur les billes les plus grosses (diamètres voisins



(a) Norme de la densité de flux magnétique totale selon x pour différents rayons de pièges.



(b) Gradient de la densité de flux magnétique totale selon x pour rayons diamètres de pièges.

FIGURE 4.4 – Simulations du champ magnétique et du gradient selon x pour des pièges de rayons de 1 à 15 µm.

de 50 µm), et les plus petites sont attirées à distance vers le substrat par les pièges (fig. 4.10).

L'endroit où se place la bille sur le piège est également un aspect important, ainsi que la taille optimale du piège par rapport à celle de la bille. Pour répondre à ces questions, j'ai fait des simulations d'une bille sur un substrat TMP avec différents diamètres de pièges. On compare l'énergie magnétique totale du système, en soustrayant la valeur à l'infini, pour permettre la comparaison entre différents pièges.

La figure 4.6 simule l'énergie totale du système pour une bille de diamètre 20 µm. L'énergie totale du système est calculée avec la bille placée à la surface du substrat à différentes coordonnées x, mais stables en y et en z. Cette simulation est faite pour 15 pièges de rayons 1 à 15 µm. Ainsi, les différentes courbes colorées représentent le profil du puits d'énergie pour différentes tailles de piège, selon la position de la bille. On remarque que l'énergie minimale est au centre du piège, donc

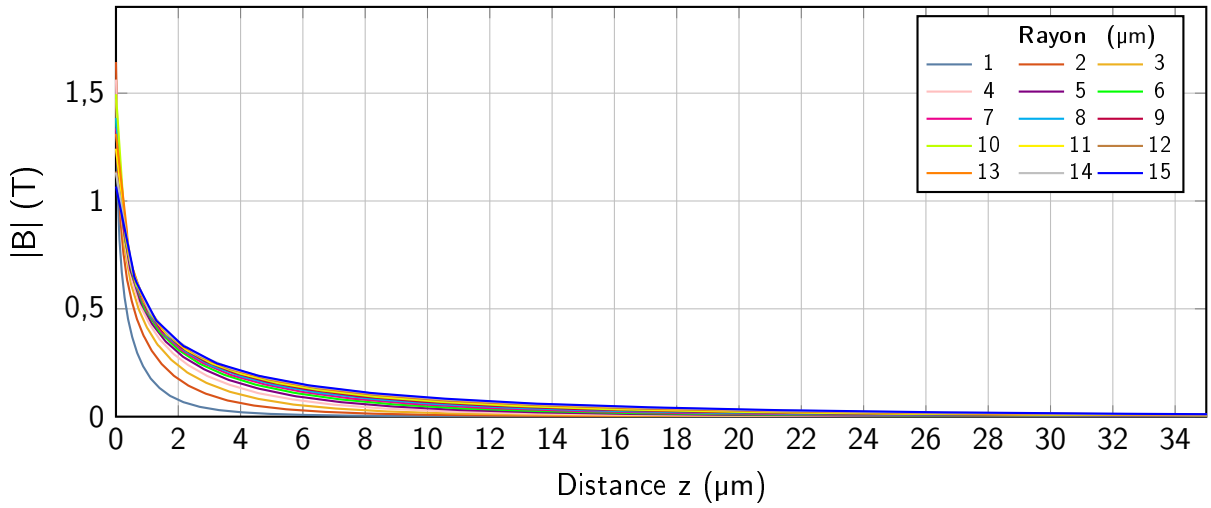


FIGURE 4.5 – Norme de la densité de flux magnétique totale en fonction de l'altitude z au maximum du champ total (bord du piège), à partir de la surface du substrat.

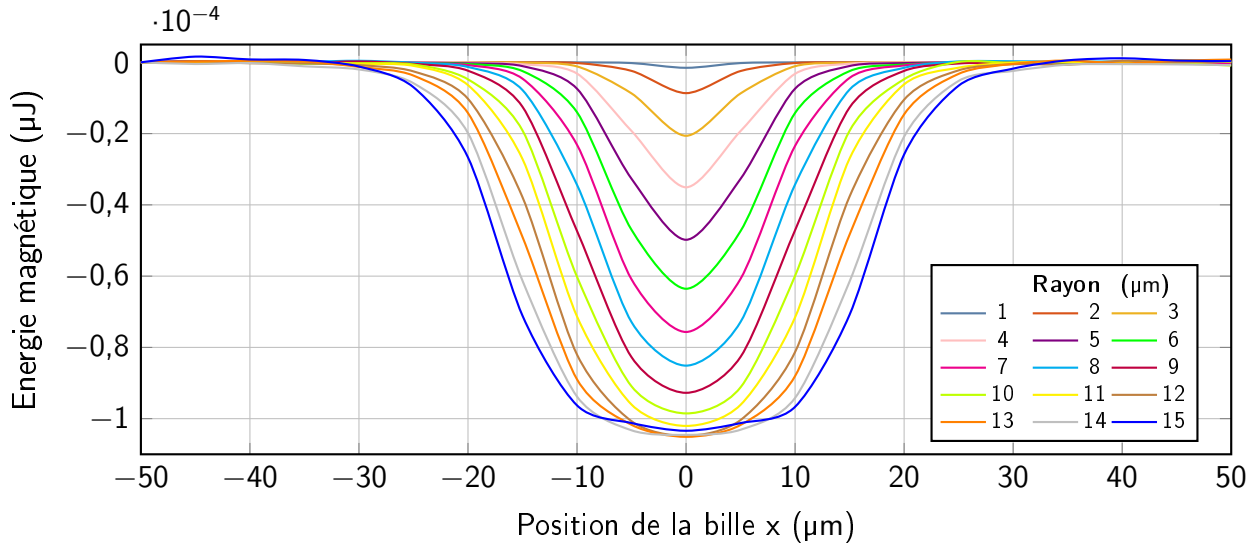


FIGURE 4.6 – Énergie magnétique totale du système avec une bille de 20 µm pour 15 pièges de tailles diverses.

que le système est plus stable quand la bille est au centre, pour tous les diamètres de pièges. En outre, l'énergie est minimale pour les pièges de diamètres similaires à celui de la bille. Ainsi, le piège le plus adapté aurait un diamètre de 24 µm et la bille serait piégée en son centre. Pour confirmer l'hypothèse que le meilleur piège a une taille comparable à celle de la bille, ou un peu plus grande, j'ai fait une autre simulation avec une bille de 5 µm de diamètre (fig. 4.7).

Tout d'abord, on remarque que l'énergie est minimale pour le piège de 7 µm de rayon, mais pas au centre du piège. Pour avoir la bille au centre du piège, les pièges les plus efficaces sont ceux de 4 µm et 5 µm de rayon. On remarque également que pour des rayons supérieurs à 7 µm, le minimum de la courbe n'est plus au centre, mais est maintenant au bord du piège. Cela signifie qu'une bille de 5 µm de diamètre ne serait pas piégée au centre d'un piège de grand diamètre mais sur son bord.

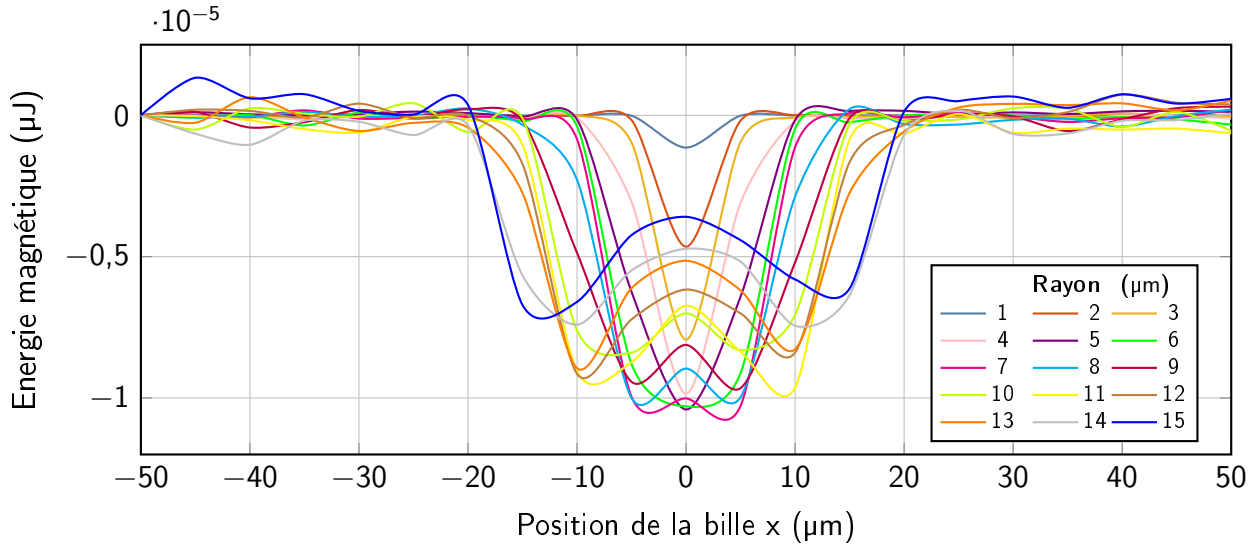


FIGURE 4.7 – Énergie magnétique totale avec une bille de 5 µm pour 15 pièges.

Ainsi, il est difficile de piéger efficacement diverses billes de diamètres variés avec un seul type de piège : il est nécessaire de réduire la dispersion en taille des billes pour obtenir un comportement homogène.

4.2.1.2 Fabrication des substrats TMP

En nous basant sur ces simulations, nous avons testé expérimentalement différents motifs et diamètres de pièges. Des substrats TMP dont l'aimantation du film est retournée localement selon ces motifs ont été fabriqués selon la méthode décrite partie 2.2.4. Le masque est fait par lithographie de résine car ce sont des tests, il n'est donc pas utile de faire un masque durable.

La figure 4.8 montre le modèle du masque pour deux types de pièges. En commençant à grande échelle, chaque piège a une forme parmi les 4 testées (fig. 4.9) : un disque simple, un anneau, des anneaux concentriques et un disque quadrillé.

Des grilles de 10x10 pièges sont créées, pour chaque diamètre testé. Les pièges sont espacés de 100 µm. Ces grilles sont elles-mêmes espacées de 600 µm, le diamètre des pièges augmentant à chaque nouvelle grille, suivant la flèche. Les plus petits sont en bas à gauche d'une série. Enfin, il y a 3 réplications d'une série de pièges pour vérifier la répétabilité.

4.2.2 Protocole de piégeage des billes

Pour déposer les billes sur les aimants TMP, on cherche une méthode efficace, rapide et facile à mettre en œuvre. À cette étape, les billes ne sont pas encore aimantées. La première solution testée fut de de saupoudrer les billes directement sur l'aimant TMP. La gravité fait tomber les billes sur le substrat, mais la friction des billes sur le substrat est trop forte comparée à la force magnétique des pièges, donc les billes restent là où elles sont tombées. Si on applique ensuite une force mécanique pour essayer de déplacer les billes, par exemple en utilisant un pinceau, la force mécanique est trop

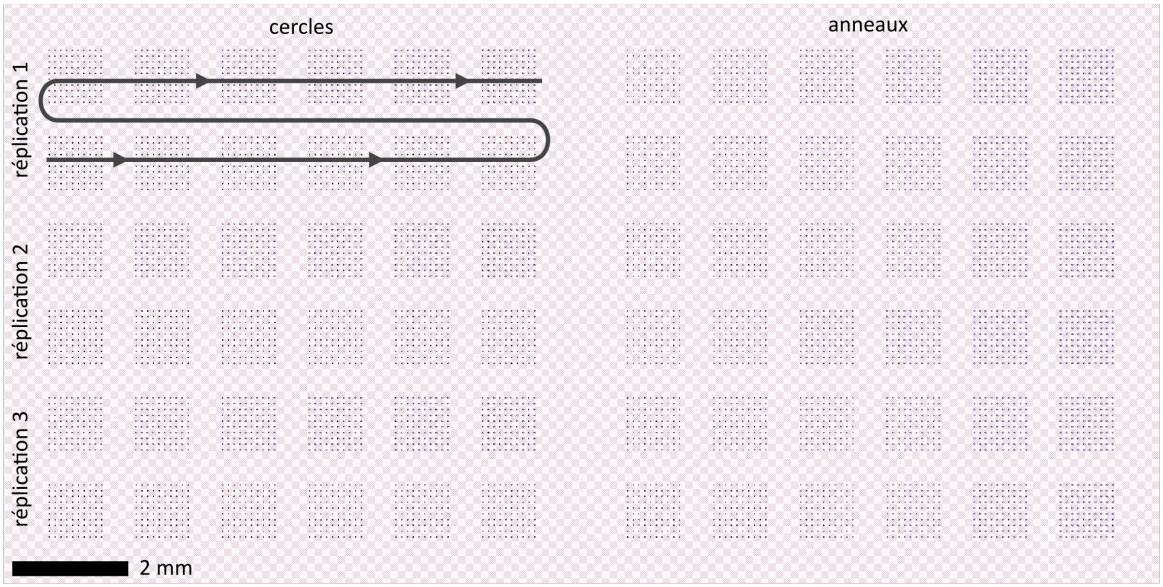


FIGURE 4.8 – Dispositions des réseaux de pièges sur le substrat TMP. Chaque point noir est un piège unique. La flèche représente l'accroissement du rayon des pièges.

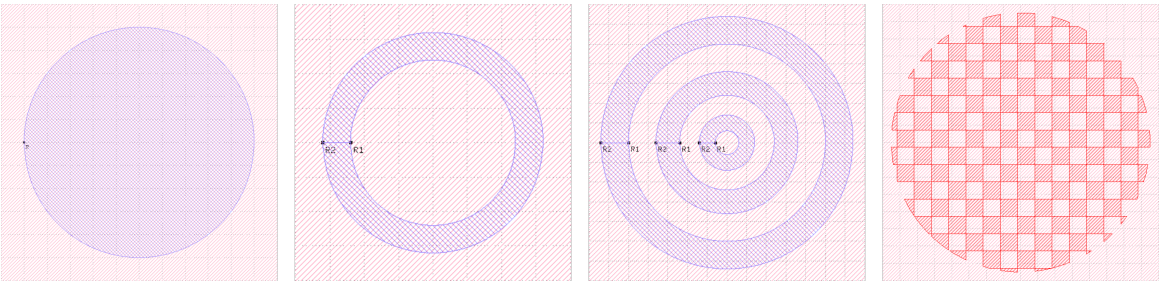


FIGURE 4.9 – Formes des différents pièges.

élevée et les billes sont entraînées par le pinceau sans s'arrêter sur les pièges.

On a donc décidé de travailler en milieu liquide, pour réduire ces forces de friction. On utilise de l'éthanol pour ses propriétés d'évaporation assez rapide et sa simplicité d'utilisation. Tout d'abord, nous avons essayé de déposer avec une pipette des billes mélangées à de l'éthanol, mais les billes sédimentaient avant le dépôt, et celui-ci n'était donc pas uniforme, les billes formant des amas. Par ailleurs, comme auparavant, les billes avaient tendance à rester là où elles avaient été déposées.

Pour contrer la gravité et la friction, nous avons décidé de travailler la tête en bas : on met les billes dans de l'éthanol dans un cristallisoir, puis on les répartit en faisant tourner le cristallisoir. Ensuite, on dépose le substrat TMP face aimantée vers le bas au dessus des billes dans l'éthanol, et celles-ci sont attirées vers le haut par les pièges et s'y fixent (fig. 4.10). Pour améliorer leur répartition, on peut faire bouger l'aimant dans le mélange : les billes les plus grosses pourront se déplacer par friction entre le fond du cristallisoir et l'aimant TMP, et les plus petites sont attirées par des pièges qui se sont rapprochés.

Ces premiers résultats sont encourageants (fig. 4.11). En effet, on peut bien distinguer le motif de grille, même si certains pièges ne sont pas remplis et d'autres ont piégé plusieurs billes. On

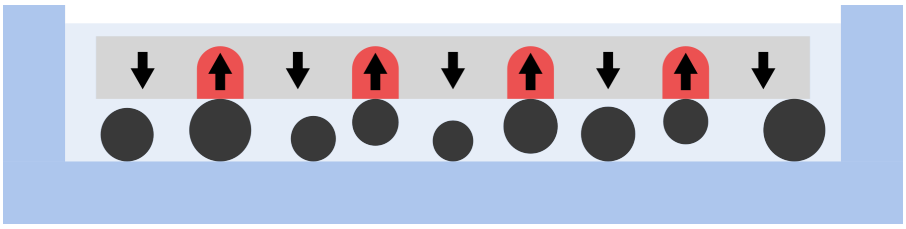


FIGURE 4.10 – Illustration du protocole de piégeage des billes sur substrat TMP.

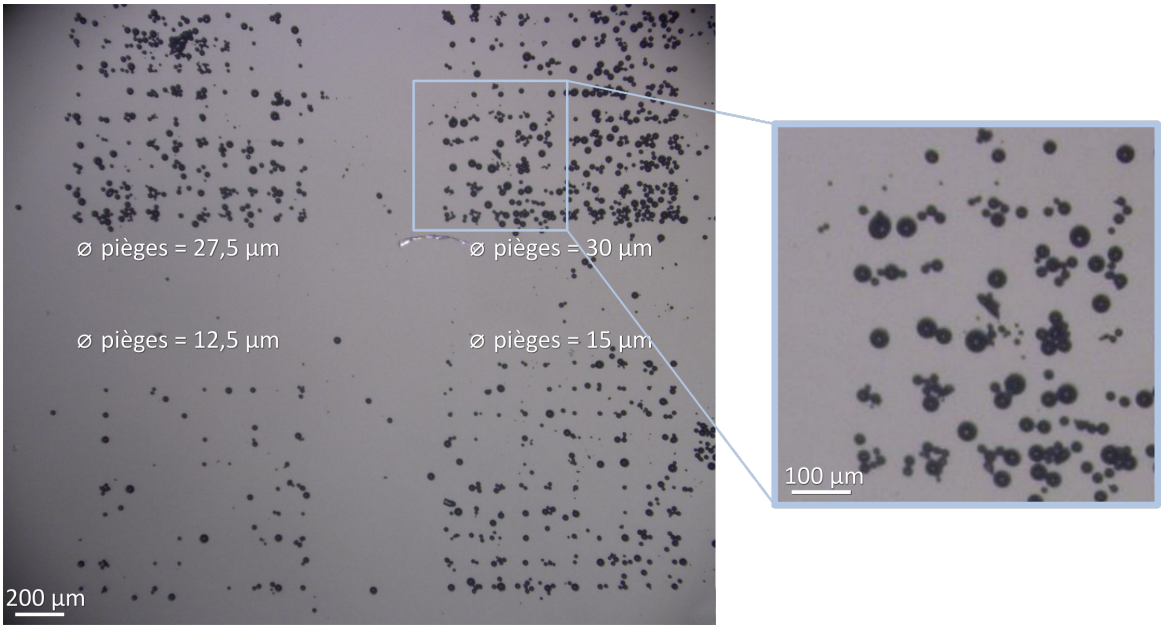


FIGURE 4.11 – Billes non triées piégées par la méthode tête en bas sur un substrat TMP.

remarque également une grande variété dans la taille des billes, et que les plus petites s'accumulent sur les pièges. Ceci concorde avec les simulations faites précédemment : les billes les plus petites sont attirées par les bords des pièges les plus grands, et plusieurs billes peuvent donc se placer sur un seul piège. On voit aussi que les pièges les plus gros (en haut à droite) sont plus efficaces que les plus petits (en bas à gauche).

Par ailleurs, il y a assez peu de différences d'efficacité entre les différentes formes de pièges (fig. 4.9) : les pièges ronds, en anneaux et en anneaux concentriques piègent un nombre similaire de billes, avec un léger avantage pour le disque simple. Le disque quadrillé est le piège le moins efficace. Ainsi, pour la suite des expériences, nous utiliserons des pièges ronds de diamètre 25 et 30 µm pour piéger des billes de diamètres supérieurs à 20 µm.

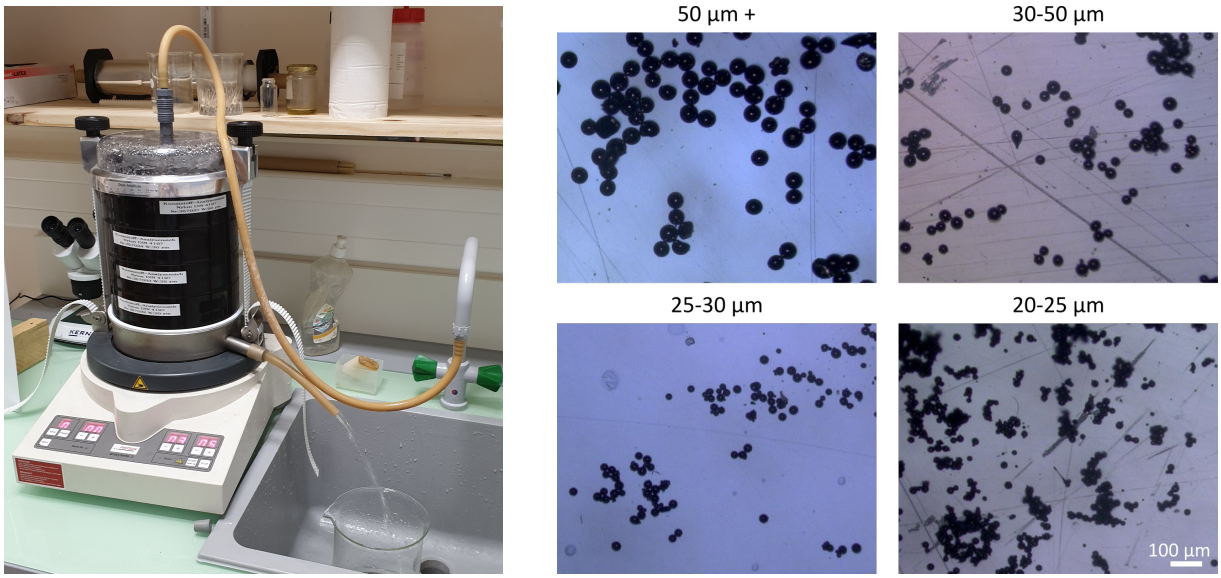
4.2.3 Tri granulométrique

Il est rapidement apparu que le diamètre des billes variait trop pour nos applications, il était donc crucial de trier les billes par taille. Plusieurs méthodes ont été testées.

La sédimentation dans l'eau était beaucoup trop rapide, les billes tombant au fond du tube en quelques secondes : il était impossible de séparer précisément plusieurs sections. J'ai essayé

la sédimentation dans du glycérol mélangé à de l'eau à différentes concentrations. Les billes sont placées en haut d'un tube rempli d'un mélange eau-glycérol dont le fond est troué. Lorsque les billes commencent à tomber, des gouttes sont déposées dans un cristallisoir à intervalles réguliers. Théoriquement, dans les premières gouttes, il devrait y avoir les billes de plus grand diamètre, car elles tombent plus vite. Cependant, les billes formant des amas, il n'y avait pas de différence remarquable entre les gouttes.

La méthode la plus efficace est un processus de tamisage des billes utilisant une série de tamis de différentes tailles. Pour des grains de diamètres inférieurs à 100 µm (notre cas), il est recommandé d'utiliser un tamisage humide avec une base vibrante.



(a) Tamiseuse pour le tri humide. (b) Billes triées vues au microscope optique.

FIGURE 4.12 – Tri des billes par tamisage humide multi-étage.

Pour le tri humide, un petit volume de billes est placé dans le plus haut tamis, puis on alimente la tamiseuse avec un filet d'eau par le haut, qui passe à travers les quatre tamis de mailles décroissantes, puis ressort dans un bécher poubelle où s'évacuent les billes les plus petites (fig. 4.12a). Les tamis utilisés sont, de haut en bas, des tamis de 50, 30, 25 et 20 µm. Les billes de diamètre inférieur à 20 µm ne sont pas utiles pour nos applications et sont donc évacuées.

Après la fin du cycle de tamisage, les billes sont triées par gamme de taille (fig. 4.12b). On remarque que pour les deux plus grandes tailles, les billes sont bien triées, il y a peu de billes hors calibre. Pour les deux plus petites tailles, le tri a été efficace mais il reste quelques billes plus petites que le tamis le plus fin qui n'ont pas été évacuées.

4.2.4 Résultats piégeage des billes sur TMP

D'après nos premiers tests, les pièges ronds de tailles similaires aux billes sont les plus efficaces, ainsi nous utilisons des pièges de 25 µm et 30 µm de diamètre pour ces prochains essais. Nous utilisons les billes triées de diamètre compris entre 30 et 50 µm. Sur ce nouvel aimant TMP, les pièges

sont espacés de 100 µm, 200 µm et 400 µm, en différentes grilles. Un apercu de ce substrat TMP est visible figure 4.13. Un MOIF (Magneto-Optical Indicator Film[84, 85]) est placé au-dessus de l'aimant TMP, et permet de visualiser les inversions de champ magnétique donc le motif magnétique de l'aimant TMP. Le champ de vision est centré sur des pièges de 25 µm de diamètre, espacés de 200 µm.

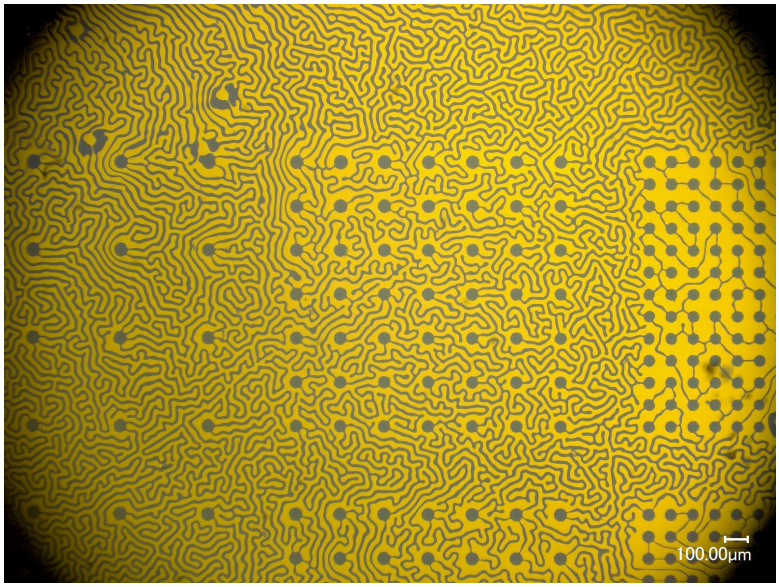


FIGURE 4.13 – MOIF sur un aimant TMP vu au microscope optique.

En suivant le protocole mis en place partie 4.2.2 (aimant TMP placé à l'envers dans un mélange éthanol/billes), on obtient un piégeage efficace des billes dont un exemple est visible figure 4.14. On remarque que plus de la moitié des pièges sont occupés par une bille, et que seuls quelques uns ont plusieurs billes ou aucune bille. Pour quantifier l'efficacité des pièges, j'ai compté les billes placées sur 6 grilles de 4x4 pièges (espacés de 400 µm), 8 grilles de 7x7 pièges (espacés de 200 µm) et 6 grilles de 13x13 pièges (espacés de 100 µm), et les ai classées en 4 catégories :

— 1 bille (cercle vert), la situation idéale ,
— Vide (cercle rouge), pour un piège sans bille
— Multiples billes (cercle jaune), si plusieurs billes sont attachées à un même piège
— Bille mal placée (cercle bleu), catégorie non comptée dans les pourcentages, pour les billes placées dans la grille de pièges mais pas directement sur un piège

Des exemples de ces quatre situations sont entourés sur cette même figure 4.14. En moyenne, sur 20 pièges, 60% des pièges sont occupés correctement, cette proportion étant légèrement plus élevée pour les pièges les plus espacés (4x4, espacés de 400 µm) que pour les plus rapprochés (13x13, espacés de 100 µm). Les proportions de billes dans les quatre situations sont reportées figure 4.15. L'ordonnée (par exemple 4x4) correspond au nombre de pièges dans chaque grille unique.

On remarque que la proportion de pièges bien remplis est assez stable au sein d'un type de grille, plus que celle de pièges vides ou remplis avec plusieurs billes, et que les grilles dont les pièges sont espacés sont plus efficaces que celles où ils sont proches. Ces variations peuvent être dues à une différence du nombre de billes placées dans le cristallisoir. S'il y en a un trop gros nombre, la plupart des pièges seront remplis, mais certains auront aussi plusieurs billes, et peu seront vides. À l'inverse,

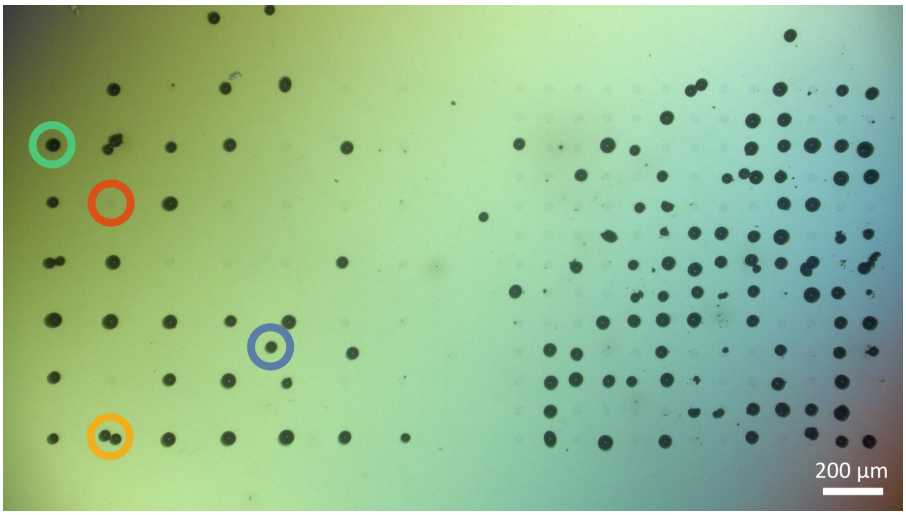


FIGURE 4.14 – Billes triées (30-50 µm) piégées sur un aimant TMP.

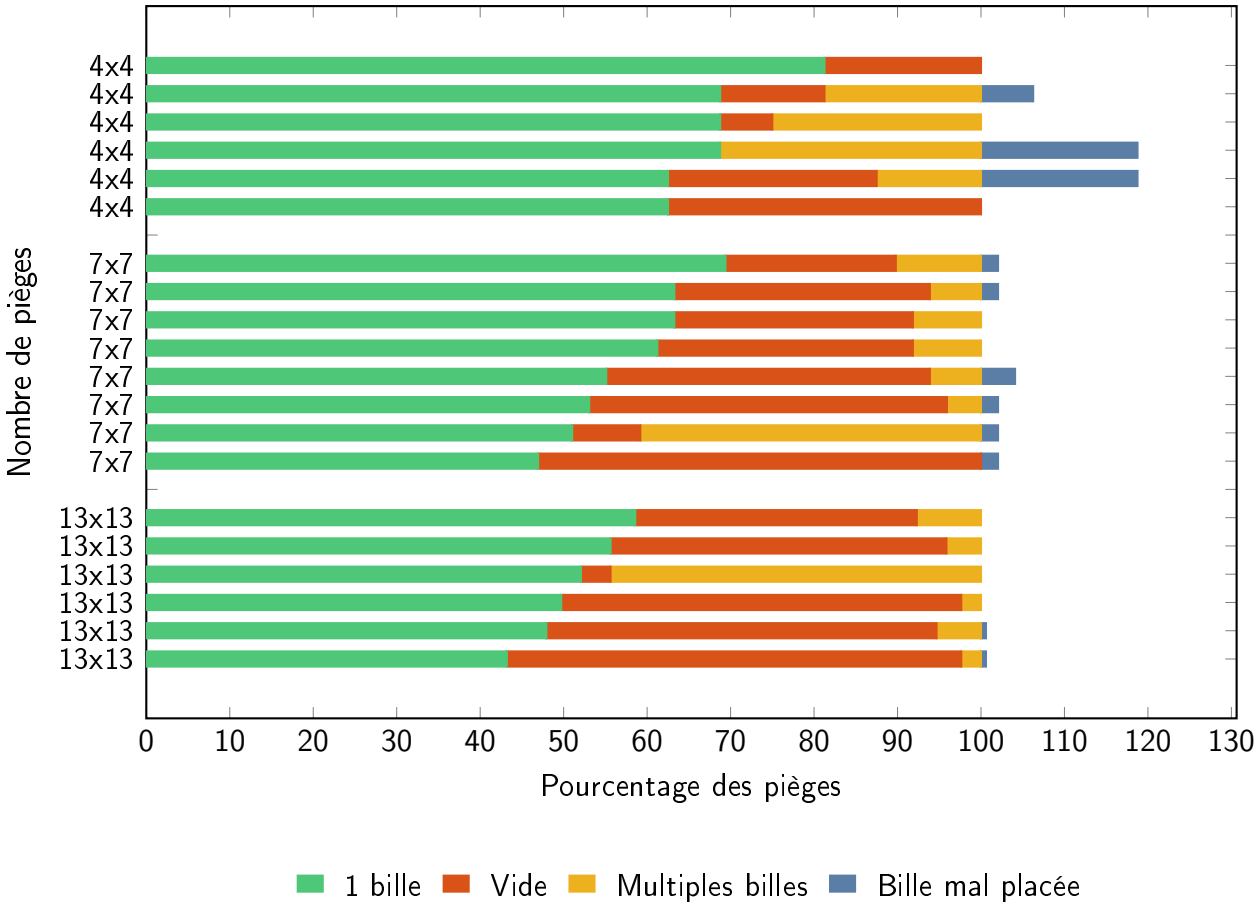


FIGURE 4.15 – Proportion des pièges dans différentes configurations.

s'il y a trop peu de billes dans le cristallisoir, il y aura plus de pièges vides, et peu avec plusieurs billes. Cependant, il est assez difficile de quantifier le nombre de billes.

On observe un lien entre la densité de la grille et son type de remplissage : une grille dense

(13x13) comporte de nombreux pièges vides, alors qu'une grille peu dense (4x4) comporte plus de billes multiples sur un piège ou de billes mal placées. Ceci est dû au fait que quand les pièges sont espacés, tous les pièges sont soit déjà remplis par une autre bille soit trop loin des billes en question.

Cependant, la proportion globale de capture est satisfaisante, donc nous validons le protocole pour notre usage.

Pour cette analyse, on a utilisé les billes de diamètres compris entre 30 et 50 µm. Pour les autres tailles de billes, le protocole est également efficace, mais des billes de tailles plus petites se collent aux pièges, surtout pour la taille 20-25 µm (la plus petite testée), car elles ont mal été triées.

Pour conclure, plusieurs tailles et formes de pièges magnétiques ont été simulées et testées expérimentalement, et les pièges circulaires de diamètres comparables à ceux des billes utilisées sont les plus efficaces, pouvant atteindre un taux de capture de 80 %, en moyenne de 60%, en passant rarement sous la barre des 50 %, ces valeurs différant légèrement selon l'agencement des pièges. Pour optimiser la capture, nous avons trié les billes avec une tamiseuse humide, et les billes les plus grosses (diamètre $>$ 30 µm) sont les mieux triées et les plus efficaces lors du piégeage. Les simulations ont également montré que les billes dont le diamètre est petit par rapport au piège sont placées sur le bord du piège, alors que celles de diamètre similaire se placent au centre. Face à ces résultats encourageants, nous pouvons passer à la deuxième étape, qui consiste à imprimer un objet à coté des billes piégées.

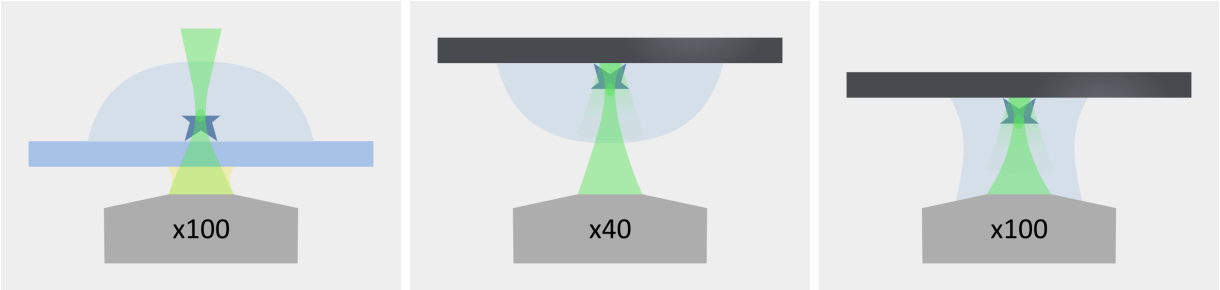
4.3 Impression sur substrat TMP

Dans cette partie, on cherche à imprimer sur des substrats métalliques, opaques et réfléchissants : il faut donc prendre en compte la différence à la fois chimique et optique des substrats par rapport aux lamelles de verre. Plusieurs défis se présentent alors ; il est nécessaire de modifier légèrement le montage expérimental pour pouvoir observer les échantillons et il faut adapter le protocole de fabrication.

Le substrat habituel pour le 2PP est une lamelle de verre, dont les propriétés physico-chimiques et optiques sont très différentes des substrats TMP sur lesquels les billes sont piégées. Les aimants TMP sont constitués d'un substrat en silicium sur lequel est déposé une couche de NdFeB en sandwich entre deux couches de tantale. Ces substrats sont opaques et réfléchissants, il faut donc développer une méthode d'impression adaptée à ce type de substrat, différente de celle utilisée pour le verre transparent, sur lequel on imprime en transmission.

La première différence fondamentale à prendre en compte pour imprimer sur ces substrats est leur opacité. On ne peut pas utiliser la configuration classique (fig. 4.16a), dans laquelle le laser traverse la lamelle de verre pour construire au-dessus de la lamelle. Nos substrats étant opaques, on doit imprimer du côté où arrive le laser. Comme dans ce type d'imprimante il arrive par en-dessous, il faut retourner retourner l'aimant TMP. Deux solutions s'offrent à nous : soit utiliser un objectif x40 à air avec une distance de travail assez grande pour que l'objectif ne touche pas la goutte (fig. 4.16b), soit utiliser un objectif x100 à huile, mais en remplaçant l'huile par l'Ormocomp (fig. 4.16c). L'objectif x40 ne permet pas d'imprimer avec une résolution aussi bonne que l'objectif x100. La seconde méthode risque d'endommager l'objectif (nous ignorons l'impact de l'Ormocomp sur les

composants optiques) : la première méthode est donc a privilégier. Quelle que soit la configuration choisie, les objets doivent être imprimés à l'envers, le modèle 3D est donc retourné avant le *slicing*, puis imprimé de haut en bas, à l'inverse de la méthode habituelle.



(a) Impression classique. (b) x40 à l'envers. (c) x100 à l'envers.

FIGURE 4.16 – Configurations pour l'impression sur substrats transparents (verre) et opaques (substrats TMP).

On va donc étudier l'impact du choix de l'objectif sur l'impression sur substrats TMP, puis expérimenter avec différents revêtements déposés sur les substrats pour améliorer l'adhérence et l'impression des structures. Ensuite, on comparera deux techniques de séchage des échantillons, puis on s'intéressera aux paramètres d'impression, en particulier l'effet de la puissance du laser sur la qualité des structures. Enfin, on essayera d'imprimer différents types de modèles 3D.

Pour le reste de cette partie, la plupart des substrats TMP utilisés pour l'impression ne sont pas aimantés, mais leur composition est identique à celle des pièges à billes (Si-Ta-NdFeB-Ta) : la couche de tantale en surface des substrats est identique qu'ils aient ou non été aimantés selon un motif. L'étape d'aimantation (voir partie 2.2.4) est assez longue et n'est pas nécessaire pour les tests d'impression simple.

4.3.1 Modification du montage expérimental

Sur le montage que l'on utilise, l'échantillon est illuminé en transmission par le haut. Comme nous utilisons ici des substrats opaques, la lampe du microscope ne permet pas d'éclairer nos échantillons qui sont imprimés sous le substrat. Ainsi, nous avons fabriqué une lampe pour éclairer le substrat par dessous, à travers l'objectif, selon le même chemin que le laser. Cette lampe à LED est escamotable sur une coulisse, pour laisser le passage au laser pendant l'impression.

La figure 4.17 illustre les modifications apportées au montage pour éclairer les échantillons. Un support est inséré dans le microscope (non-illustré sur le schéma), permettant à la LED et au diffuseur de coulisser. On insère la LED pour éclairer et observer l'échantillon, ou on la retire laisser passer le laser pour imprimer. Le diffuseur est utile pour diffuser la lumière de la LED pour certains objectifs (en particulier x10), car sinon on a une tache lumineuse trop intense au centre du champ de vision du microscope. Le support et les barres maintenant la LED et le diffuseur ont été imprimés en 3D avec une imprimante 3D classique (filaire). L'éclairage obtenu n'est pas totalement uniforme, mais permet de se repérer sur l'échantillon et de voir les structures.

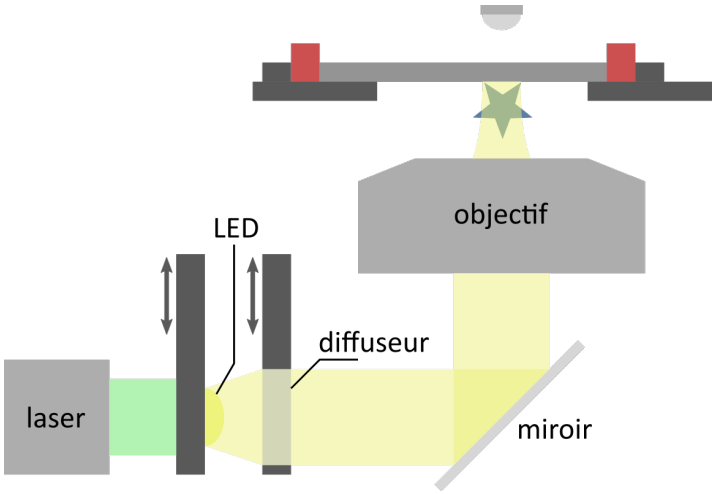


FIGURE 4.17 – Schéma du montage inversé avec lampe et diffuseur coulissants. Fonctionne avec tous les objectifs.

4.3.2 Influence de l'objectif et mise au point

Deux objectifs ont été testés pour imprimer sur les substrats métalliques à l'envers. Le premier est un objectif x40 à air, la goutte d'Ormocomp ne touchant pas l'objectif. Cette méthode est moins risquée pour le matériel, mais offre une résolution plus faible, le voxel mesurant environ 4 à 5 µm de haut et 700 nm de large. Le second est un objectif x100 à huile, pour lequel on remplace l'huile par l'Ormocomp. Cette méthode permet de prendre avantage de la bonne résolution de l'objectif, mais pourrait l'endommager car il n'est fait que pour être utilisé avec de l'huile à immersion.

La mise au point et le choix de l'origine du système de coordonnées de l'imprimante sont assez délicats dans cette configuration, et seront également discutés.

4.3.2.1 Définition de l'origine du système de coordonnées de l'imprimante

Un des défis pour obtenir des impressions de bonne qualité est de réaliser une bonne mise au point et bien choisir le zéro de l'imprimante en z.

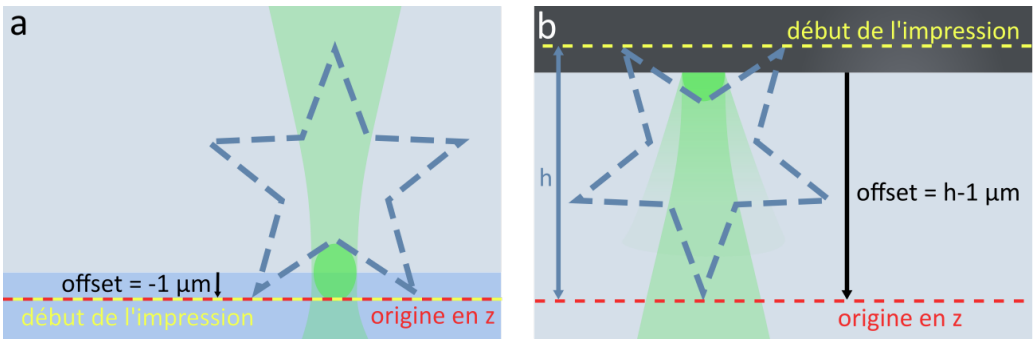


FIGURE 4.18 – Schéma montrant la définition de l'altitude zéro de l'imprimante. a. dans la configuration normale. b. pour des substrats opaques retournés.

Sur des lamelles de verre, on fait la mise au point en allumant le laser à une puissance faible (0,03 V/0,01 mW) et en ajustant la hauteur de l'objectif manuellement avec la molette du microscope. Quand le laser est focalisé sur l'interface verre-résine, une tache de lumière apparait, et on peut faire une mise au point plus précise avec Lithos. Ensuite, on peut imprimer à partir de cette hauteur, avec un offset en z de 1 µm pour s'assurer d'imprimer au niveau de la surface du verre et de l'adhérence de l'objet (fig. 4.18.a).

Pour les substrats TMP, le premier protocole consistait à mettre au point au niveau de la surface du substrat, en gardant le laser éteint et en utilisant uniquement la fuite du laser (car sinon la tache lumineuse est trop grande), puis descendre légèrement l'objectif avec la molette du microscope. Ceci n'est pas du tout précis et il a fallu améliorer ce protocole.

Les fichiers à imprimer sur les substrats TMP sont retournés avant le *slicing* et ont une option activée, *Start from top*, qui commence l'impression par le haut de l'objet. Ainsi, les structures finales sont imprimées dans le bon sens quand le substrat est remis à l'endroit.

La solution choisie est de mettre au point au niveau de la surface de la même manière, mais de changer la façon de déterminer le zéro de l'imprimante, sur lequel toute l'impression est basée. En effet, Lithos permet d'ajouter un offset en z, dont on peut tirer avantage. Si on saisit donc un offset égal à la valeur de la hauteur de l'objet à imprimer, et qu'on imprime en partant du haut, la couche initiale de l'impression sera située au niveau de l'interface substrat-résine. On utilise ce principe, en soustrayant 1 µm à la dimension verticale de l'objet pour s'assurer qu'il soit accroché au substrat (fig. 4.18.b).

4.3.2.2 Objectif x40 à air

Pour préserver l'équipement, les premiers tests ont été faits avec l'objectif x40 à air.

a Impression sur verre

Pour qualifier les performances de cet objectif, de premiers tests ont été faits sur verre, en comparaison avec l'objectif x100 également. Les impressions ont été faites avec l'objectif x40 à air en utilisant Simpoly car il permet des impressions rapides ainsi qu'une impression "à main levée", en allumant le laser et en déplaçant librement la platine grande course. Pour mes tests préliminaires, j'ai imprimé un cube de 10 µm d'arête, troué d'un coté, posé sur un pied cylindrique, dans trois configurations différentes (fig. 4.19). Comme référence, j'ai imprimé le fichier avec un objectif x100 dans la configuration classique, visible à droite. Ensuite, j'ai utilisé l'objectif x40 également avec la configuration classique (à gauche sur l'image). Enfin, j'ai imprimé le même fichier après avoir retourné la lamelle pour que la goutte soit vers le bas (centre de l'image). Les deux objets les plus à droite sont tronqués au niveau de la lamelle (donc moins hauts que les trois autres) à cause d'un problème de mise au point en z.

En premier lieu, on remarque que les structures imprimées au x40 sont très allongées verticalement, comparées aux structures imprimées avec l'objectif x100. Ceci est dû au fait que le voxel est bien plus long en z car l'ouverture numérique de l'objectif x40 est plus faible (0,65) que celle de l'objectif x100 (1,25). En conséquence, la structure finale est très allongée en z par rapport au fichier

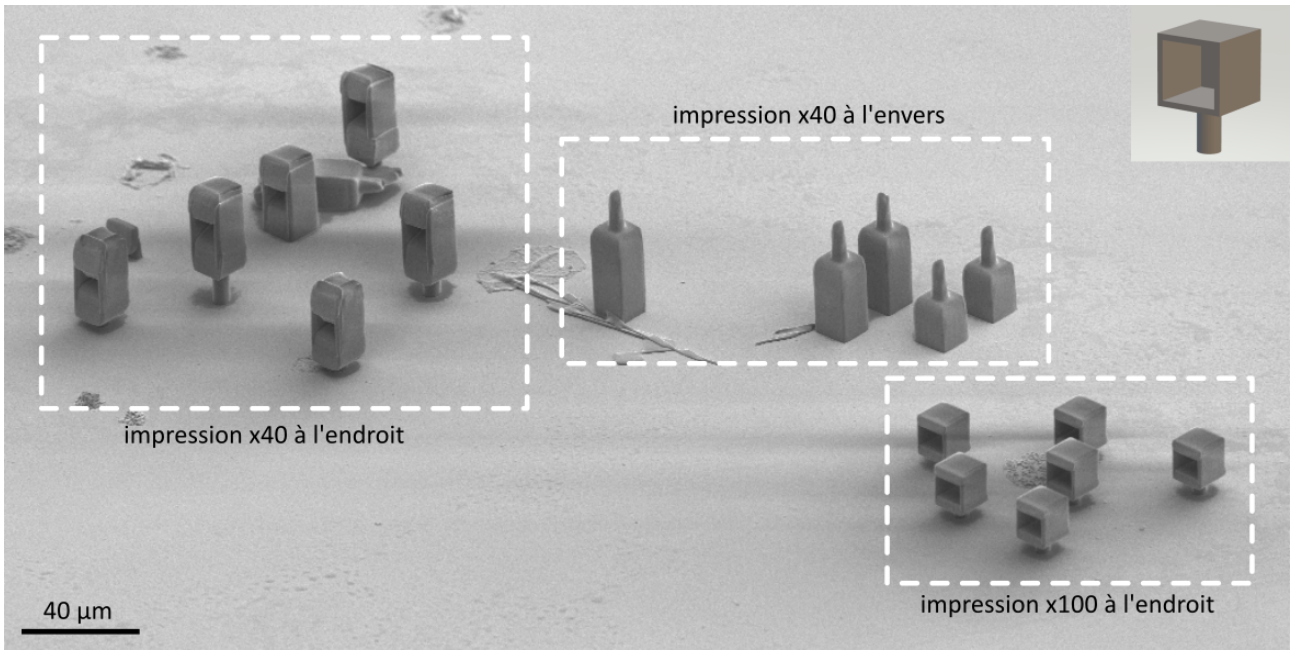


FIGURE 4.19 – Premières impressions à l'objectif x40 sur lamelle de verre (à l'endroit = imprimés à travers le substrat ; à l'envers = imprimés sur substrat retourné).

initial. Il est possible de corriger partiellement le problème en comprimant le fichier d'impression, mais les parties horizontales seront toujours plus épaisses.

En second lieu, on peut comparer les deux impressions au x40, à l'envers et à l'endroit. Hormis les problèmes de mise au point, les structures finales sont très similaires, ce qui nous permet d'affirmer qu'imprimer à l'envers ne pose pas de problème majeur.

b Impression sur substrat TMP

Ayant validé le fait que l'impression tête en bas ne pose pas de problème, il est possible de tester avec l'impression sur aimants TMP. Pour les tests préliminaires, j'ai imprimé quatre types d'objets avec Simpoly. D'abord, il faut réussir à faire la mise au point, qui est difficile sur ces substrats : les modèles 3D imprimés ici ont donc été pensés dans ce sens, pour valider la mise au point, en particulier la pyramide. Pour le premier modèle (1), le laser est allumé et la platine déplacée en x et en z (fig. 4.20). Sur verre, ceci permet d'imprimer des lignes dont certaines portions sont forcément accrochées à la lamelle. Le deuxième (2) est un empilement de lignes, chaque couche perpendiculaire à la précédente. Le troisième (3) est le même modèle de cube sur pied que pour les tests précédents. Le quatrième (4) est des pyramides à degrés constituées de 4 pavés superposés, de 60 µm par 60 µm par 40 µm. L'objectif est de pouvoir détecter quelles couches ont été imprimées facilement, et donc déduire si la mise au point était correcte, car celle-ci est difficile à effectuer.

La figure 4.21 montre les résultats de ces premiers tests d'impression sur substrat TMP.

Au premier abord, aucune des structures n'a été imprimée correctement. Des "boules" de résine sont présentes, sûrement le résultat de bulles apparues quand le laser a été absorbé par le substrat, qui ont ensuite été polymérisées. Pour les structures 3D, seule une couche subsiste sur le substrat, ce

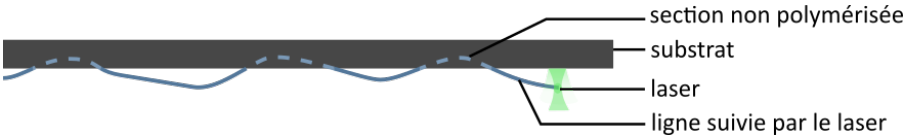


FIGURE 4.20 – Schéma vu de coté du déplacement du point focal du laser pour imprimer une ligne à main levée.

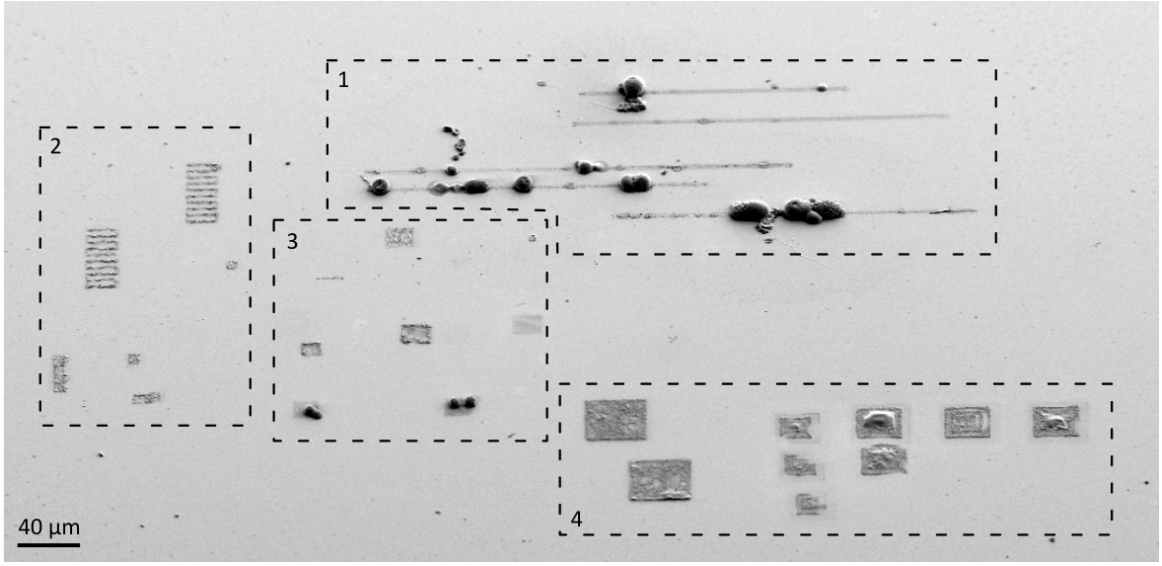


FIGURE 4.21 – Tests sur substrat TMP au x40. Différents modèles ont été imprimés. 1 : lignes à main levée. 2 : empilement de lignes. 3 : cube sur pied cylindrique. 4 : pyramides en escalier.

qui semble résulter soit d'un manque d'adhérence (l'objet se serait donc détaché après l'impression), soit d'un problème optique qui aurait empêché l'impression même de l'objet (réflexion du laser).

Pour vérifier ces premiers résultats et améliorer le protocole d'impression, j'ai imprimé le même modèle de pyramide, avec Lithos cette fois-ci. Lithos permet d'imprimer simplement des réseaux de structures en variant un paramètre, ici la distance z par rapport au zéro. Un problème récurrent est la difficulté à commencer l'impression exactement à la surface du substrat (interface substrat goutte). Le protocole suivi consiste à mettre au point grâce au laser se réfléchissant sur la surface, puis descendre l'objectif avec la molette du microscope. Ceci manque de précision, et j'ai amélioré ce protocole plus tard (voir section 4.3.2.1).

Sur l'image MEB de cet échantillon (fig. 4.22), on voit que les structures 3D sont absentes à nouveau, ce qui était prévisible puisque les paramètres sont identiques à l'échantillon précédent. De plus, il y a un aspect de "brûlé", laissant penser que le laser est trop fort au niveau de la surface, sûrement à cause de sa forte réflexion. On voit également que certaines structures n'ont que les étages supérieurs visibles, donc la mise au point était trop haute. Par ailleurs, il n'y a aucune trace d'une impression par réflexion, ce qui laisse à penser que la réflexion du laser quand celui-ci est mis au point plus haut que la surface n'entraîne pas de polymérisation.

Devant la difficulté d'imprimer au x40 sur les substrats TMP, nous sommes revenus à l'objectif x100, qui est celui utilisé dans le reste du travail (chapitre 3) et permet une impression sans élongation en z, donc plus précise.

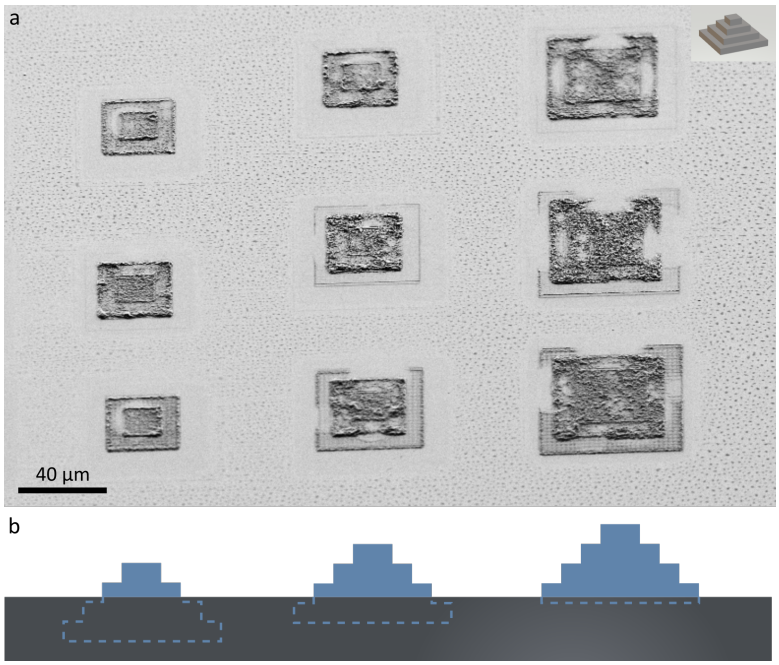


FIGURE 4.22 – Impression de pyramides à étages au x40 à différentes hauteurs de mise au point sur substrat TMP. Lors de l'impression, la mise au point était plus haute à gauche et plus basse à droite. a. Image MEB. b. Schéma montrant les pyramides aux différentes hauteurs de mise au point, alignées avec l'image du dessus.

4.3.2.3 Objectif x100

Pour imprimer sur les substrats TMP avec l'objectif x100, j'utilise la disposition montrée figure 4.16c. Le même modèle de pyramide est imprimé. Après rinçage, la plupart des structures sont absentes, mais deux des objets ont gardé une forme en 3D, assez déformée par rapport au modèle (fig. 4.23). Les structures 3D sont de mauvaise qualité, et je n'ai pas réussi à reproduire cette expérience avec les mêmes paramètres.

Ceci confirme les conclusions tirées précédemment : il faut améliorer l'adhérence de l'objet imprimé pour optimiser dans un second temps les paramètres d'impression. Pour ce faire, les deux premières pistes sont de réduire la réflexion du substrat et/ou changer la composition chimique de la surface.

4.3.3 Revêtement sur le substrat

Nous avons choisi de déposer une couche mince de matériau sur le substrat TMP pour améliorer ses propriétés optiques et chimiques pour l'impression. De plus, il faut que cette couche soit assez fine pour pouvoir encore piéger les billes, donc mesurer quelques microns au maximum. Ainsi, nous avons testé différents matériaux, le but principal étant de trouver un matériau sur lequel l'impression soit possible et de bonne qualité. De plus, il faut penser aux autres étapes de fabrication : le piégeage des billes doit rester possible (avant ou après le dépôt), le matériau doit supporter le rinçage sans endommager les structures, soit en se dissolvant complètement dans l'acétone, soit en

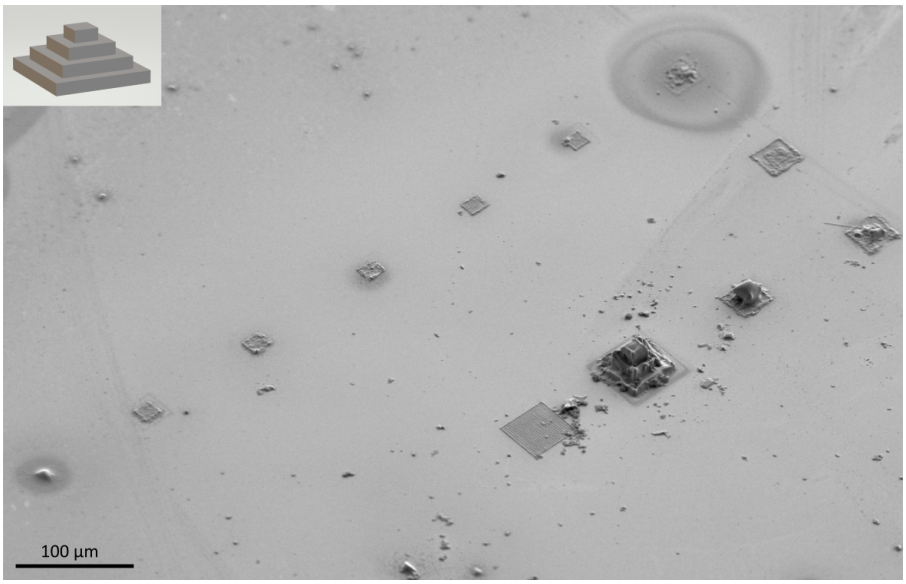


FIGURE 4.23 – Impression de pyramides au x100 sur un substrat TMP.

restant inerte dans le bain. Les différents dépôts testés sont le bind-silane, le PEDOT (poly(3,4-éthylènedioxythiophène)), de l'encre de stylo plume, un film d'Ormocomp et divers feutres.

4.3.3.1 Bind-silane

La première option est une couche de bind-silane (3-méthacryloyloxypropyltriméthoxysilane, $C_{10}H_{20}0_5Si$), qui est assez simple à mettre en œuvre et logique puisque le bind-silane est utilisé au Liphy sur les lamelles de verre pour faciliter l'adhérence des structures en gélatine. Le protocole suivi consiste à déposer une goutte de bind-silane sur le substrat, qui s'étale naturellement, puis à essuyer la surface avec un papier optique.

La figure 4.24 montre que la couche de bind-silane n'a pas eu beaucoup d'effet sur la fabrication des structures, la plupart étant absentes, seule une empreinte restant sur l'échantillon. Il y a encore une fois une structure 3D présente, mais c'est la seule malgré les paramètres identiques des autres impressions, donc son impression est difficile à répliquer. En outre, sur l'image au microscope optique prise juste après la fabrication, on remarque des carrés imbriqués partant à la dérive, similaires aux pyramides qu'on imprime. Ceci montre donc que les structures ont bien été imprimées, mais n'ont pas adhéré à la surface et sont donc parties lors du rinçage. Il faut donc améliorer l'adhérence de la surface des substrats.

4.3.3.2 Parylène

Le parylène est un film polymère biocompatible et inerte dans la plupart des solvants, qui se dépose sous vide en quelques heures. On peut faire des films d'environ 1 µm d'épaisseur jusqu'à plusieurs dizaines de microns si le temps de dépôt est assez long. Ce polymère est de couleur blanche quand déposé en grande épaisseur.

J'ai déposé une couche de 2 µm de parylène sur le TMP, puis imprimé des cubes simples pleins (de

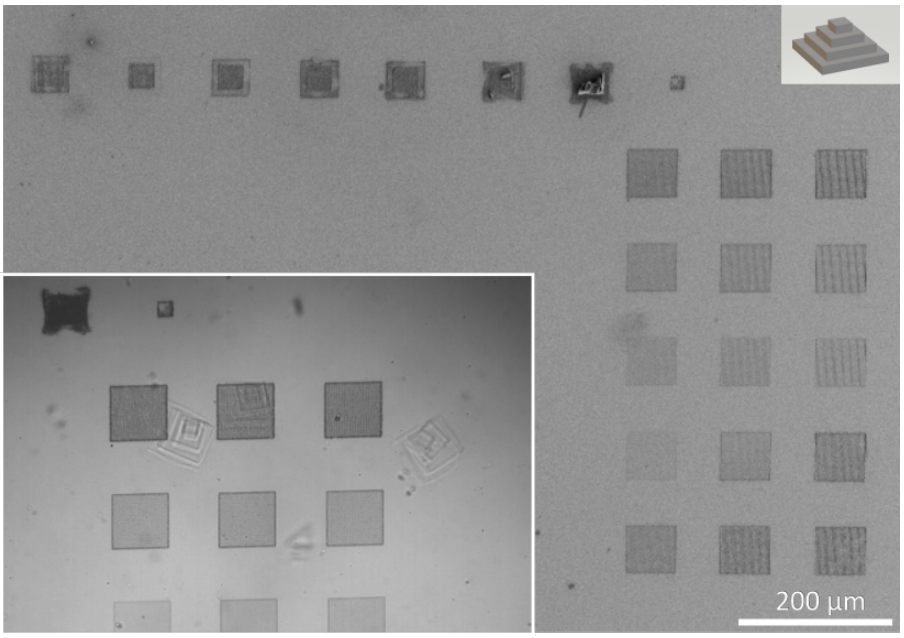


FIGURE 4.24 – Pyramides imprimées sur aimant TMP recouvert de bind-silane. L'image principale est capturée au MEB, et l'encart au microscope optique.

15 µm de coté) dessus avec le protocole actuel, au x100 à l'envers, avec une tension de commande comprise entre 0,12 V et 0,16 V (puissances de 0,21 mW à 0,37 mW).

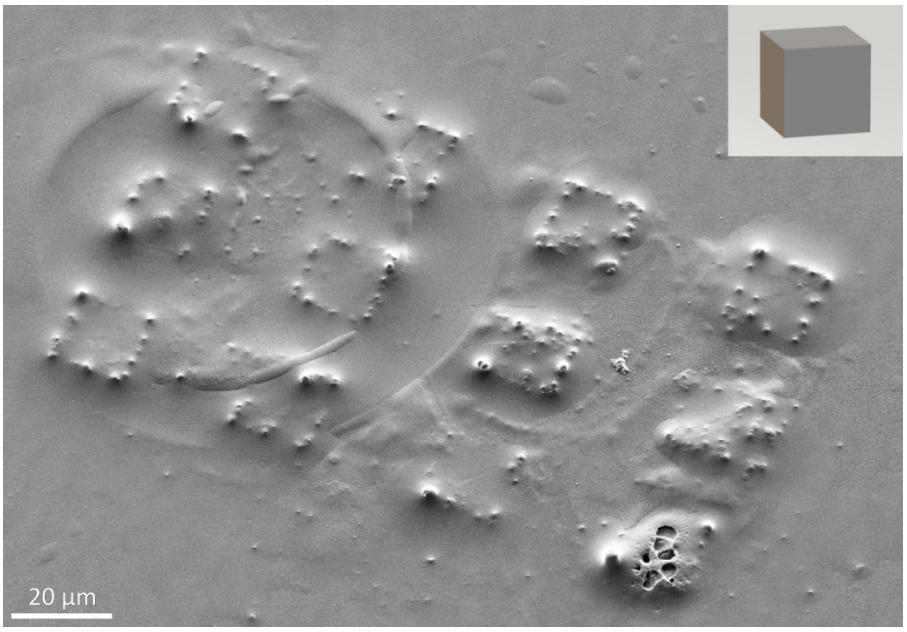


FIGURE 4.25 – Image MEB de cubes imprimés sur une couche de parylène sur substrat TMP.

La figure 4.25 est une image MEB des cubes imprimés sur le parylène. Encore une fois, les cubes ne laissent qu'une trace sur le substrat ; ces traces sont très similaires, quelle que soit la puissance du laser. On remarque des boules de résine sur le pourtour des cubes, qui pourraient être le résultat de bulles. Ces artéfacts semblent bien liés au substrat. Les résultats furent similaires sur plusieurs

échantillons imprimés sur parylène, j'en ai donc conclu que le parylène seul n'était pas suffisant.

4.3.3.3 Autres revêtements

Comme expliqué dans l'introduction, de nombreux revêtements ont été testés pour permettre la fabrication sur aimants TMP. La plupart des matériaux testés ont donné des résultats assez similaires aux premiers tests sur parylène, les structures présentes n'étant qu'une empreinte d'apparence brûlée sur le substrat.

Le PEDOT (Poly(3,4-éthylènedioxythiophène), $(C_6H_40_2S)_n$) est déposé à la tournette et la couche finale est d'apparence noire, opaque et mate. L'encre de stylo plume est déposée puis s'évapore, laissant un revêtement bleu transparent. Enfin, différentes encres de feutres ont été déposées en faisant une tache sur le substrat puis en l'étalant avec un papier optique. Pour tous ces revêtements, les résultats ont été similaires à la figure 4.26 (impressions sur PEDOT). L'impression sur Ormocomp déposé à la tournette puis durci aux UV n'est pas viable car la résine se décolle lors du rinçage à l'acétone.

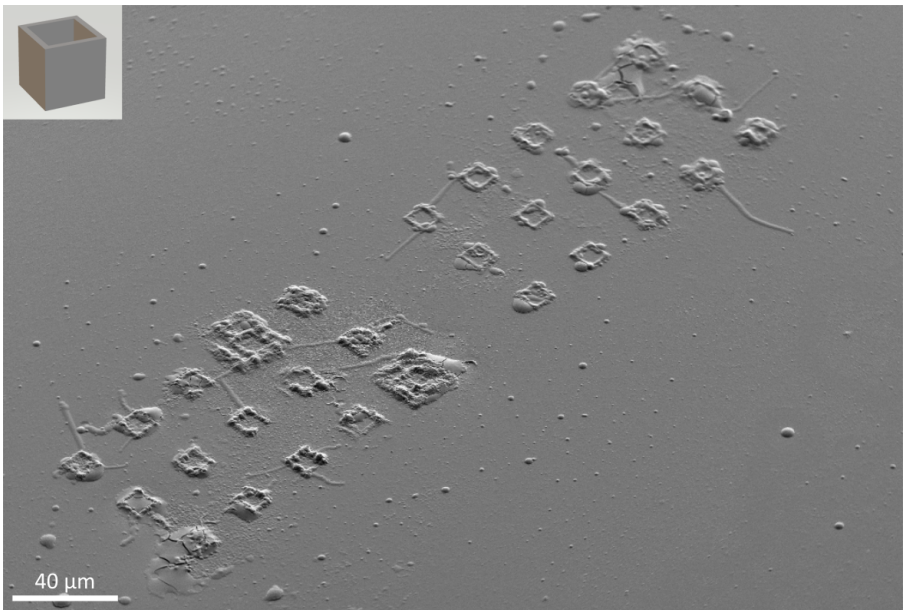


FIGURE 4.26 – Impressions de cubes creux sur TMP avec revêtement PEDOT (image MEB).

4.3.3.4 Encre de marqueur noir

Le dernier revêtement auquel on s'intéresse est une encre de marqueur noir sur le substrat. L'encre présente l'avantage d'être simple à déposer et de laisser un résidu assez opaque et mat sur le substrat, ce qui résout les problèmes de réflexion. Cette idée est venue d'un échantillon que j'ai réutilisé après l'avoir déjà regardé au MEB. Lorsque j'observe les structures au MEB, je les entoure d'un trait de marqueur pour pouvoir les localiser plus facilement dans le microscope, il y avait donc un trait de marqueur avant la seconde impression.

a Comparaison de l'impression avec et sans revêtement marqueur

Lors de l'impression, j'ai fabriqué deux séries de cubes, une directement sur le TMP nu, et l'autre sur la trace de marqueur (fig. 4.27). J'ai testé différents ensembles de paramètres sur les différents cubes, en faisant varier la puissance du laser ainsi que la distance de mise au point. Il y a deux cubes, un par ligne, pour chaque lot de paramètres. Un lot sur deux est imprimé avec la mise au point faite au niveau de la surface, et le deuxième avec un offset de 7,5 µm. La puissance du laser utilisée varie entre 0,21 mW et 0,37 mW, (tension de commande entre 0,12 V et 0,16 V).

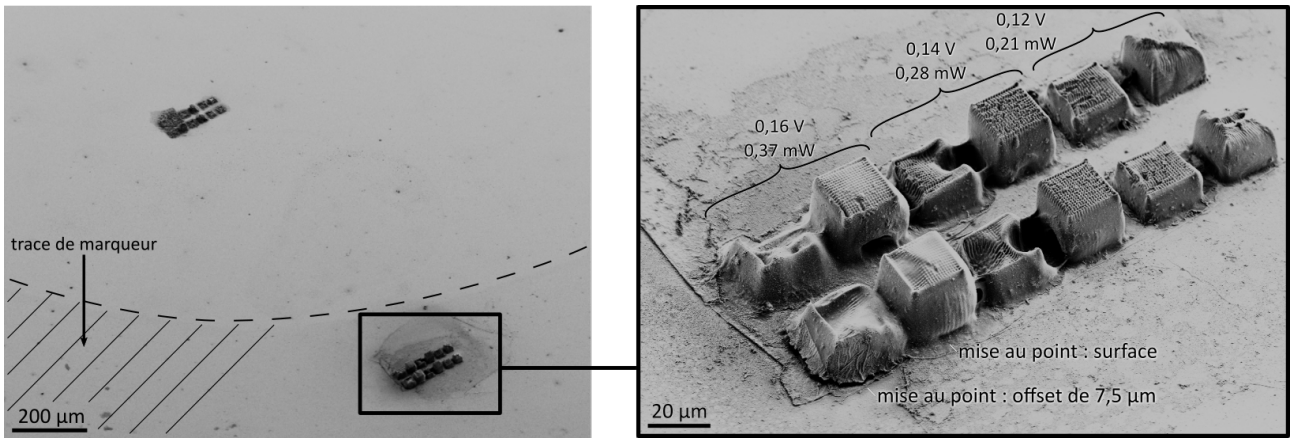


FIGURE 4.27 – Impression de cubes sur une trace de marqueur sur substrat TMP. (Image MEB)

L'impression des cubes directement sur le substrat n'est pas plus efficace qu'auparavant. Les structures sont très aplaties et ont encore une apparence de "brûlé". En revanche, les cubes imprimés sur le marqueur ont tous une apparence 3D, ayant bien la forme cubique du modèle d'origine. Certains cubes sont mieux imprimés que d'autres, mais aucun n'est "parfait". L'apparence de la face haute du cube n'est pas de bonne qualité, en partie à cause du *slicing* du modèle.

Ce résultat, bien que largement imparfait, confirme qu'une couche d'apprêt déposée sur le substrat améliore grandement les capacités d'impression sur substrat TMP. Les impressions les plus fidèles au modèle de base sont celles faites sur un trait de feutre noir. Par conséquent, il paraît logique de continuer dans cette direction pour trouver un revêtement efficace permettant d'imprimer sur les substrats TMP. Tous les feutres ne donnent pas les mêmes résultats, le plus efficace étant un marqueur indélébile noir Bic Mark-it [86] (nous n'avons pas pu déterminer ce qui le différencie des autres pour cette application par manque de temps), qui est donc celui que j'ai utilisé par la suite. Pour appliquer le marqueur, la méthode suivie consiste à dessiner une tache avec le marqueur sur le substrat et attendre que celui-ci sèche, avant de suivre le protocole d'impression normal.

b Ajustement du modèle 3D et du *slicing* du cube de test

Un des problèmes possibles avec la 2PP est la présence de résine non durcie dans la structure finale, la surface de l'objet étant polymérisée, sans que l'intérieur ne le soit nécessairement. Après rinçage, la résine liquide peut potentiellement sortir de l'objet et altérer sa forme. Un cube tel que ceux imprimés jusqu'à maintenant peut présenter ce genre de limitations. Pour la suite, j'ai donc créé un nouveau design de structure test. Celui-ci est un cube creux de 10 µm de côté, dont l'épaisseur

des murs est de 1 µm. Les paramètres du slicing de ces cubes creux sont disponibles dans le tableau 4.1.

Taille voxel x/y	Recouvrement x/y	Hatching	Remplissage
0,3/1 µm	80/80%	5°, Lines Ox	H lines 1/0,5 µm

TABLE 4.1 – Paramètres utilisés pour les cubes creux.

c Dépôt du revêtement marqueur

Pour appliquer le marqueur, j'ai longtemps suivi un protocole assez simple, qui consistait à dessiner une tache puis à étaler celle-ci avec un papier optique, puis à déposer une goutte d'Ormocomp dessus pour pouvoir imprimer avec l'objectif x100.

Pour améliorer la reproductibilité et l'homogénéité des dépôts, j'ai extrait l'encre du marqueur pour avoir un liquide simple à déposer sur le substrat. J'ai dissout l'encre du marqueur dans un solvant. J'ai testé deux solvants, l'éthanol et le chloroforme ; les deux ayant eu des résultats assez similaires, j'ai choisi d'utiliser l'éthanol car il est plus simple d'utilisation et moins toxique.

Ainsi, le protocole final pour le dépôt d'un revêtement pour imprimer sur les aimants TMP est le suivant :

— Déposer une goutte de 10 µL d'encre dissoute dans l'éthanol ;
— Attendre 5 minutes jusqu'au séchage complet ;
— Déposer une goutte de résine Ormocomp sur le substrat. La quantité totale d'Ormocomp doit être suffisante pour utiliser l'objectif x100 à huile avec la résine à la place de l'huile.

Les deux méthodes de dépôt du marqueur donnant sensiblement les mêmes résultats, elles ont toutes les deux été utilisées pour les expériences décrites dans la partie suivante.

4.3.4 Influence de la technique de séchage

Pour retirer la résine non durcie, il faut rincer les échantillons puis les sécher. Habituellement, la méthode utilisée est simplement de mettre les échantillons dans un bain d'acétone pendant 10 minutes puis les sécher sous un cristallisoir (voir partie 2.2.1.4). Une autre solution consiste à utiliser un sécheur supercritique, également à acétone : celui-ci permet normalement un rinçage de très bonne qualité. On cherche donc à comparer la qualité des structures séchées à l'aide de ces deux méthodes.

Les structures visibles figure 4.28 sont imprimées sur une couche de marqueur et séchées normalement. Elles sont bien en relief, confirmant que le marqueur améliore la qualité de l'impression. Cependant, les objets ne sont pas cubiques comme ils devraient l'être. Leurs coins sont arrondis, et la surface supérieure n'est pas du tout plane, comme si le cube avait été lissé. Ceci peut être dû à un reste de résine autour des structures (mauvais rinçage), ou bien à une mauvaise polymérisation (puissance trop élevée). Cet effet s'est répété sur plusieurs échantillons, donc le rinçage n'est sûrement pas le seul problème.

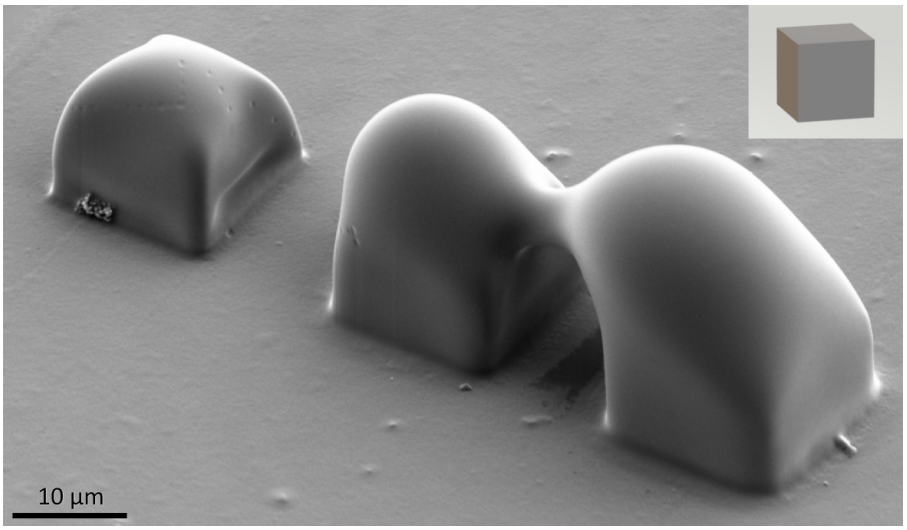


FIGURE 4.28 – Cubes imprimés sur TMP recouvert d'une couche de feutre, rincés par trempage dans l'acétone. (Image MEB)

Pour vérifier l'effet du rinçage, j'ai réitéré l'expérience en remplaçant l'étape de rinçage et de séchage habituelle par un séchage supercritique à l'acétone.

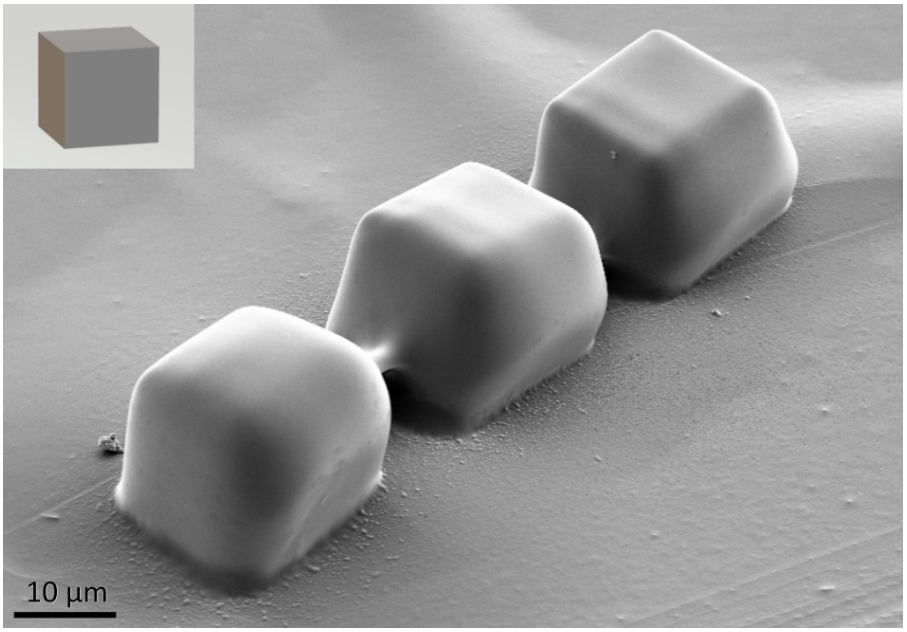


FIGURE 4.29 – Cubes imprimés sur TMP couvert d'une couche de feutre et rincés au supercritique. (Image MEB)

L'apparence des structures séchées au supercritique (fig.4.29) est meilleure que celle des échantillons précédents. On reconnaît les cubes, même si ceux-ci sont déformés, arrondis. De plus, il y a encore un lien entre les deux cubes les plus proches. cela signifie qu'il y a encore des problèmes d'impression, le rinçage super-critique n'ayant pas résolu tous les problèmes.

On en conclut donc que le séchage a peu d'influence sur la qualité des structures. Pour imprimer

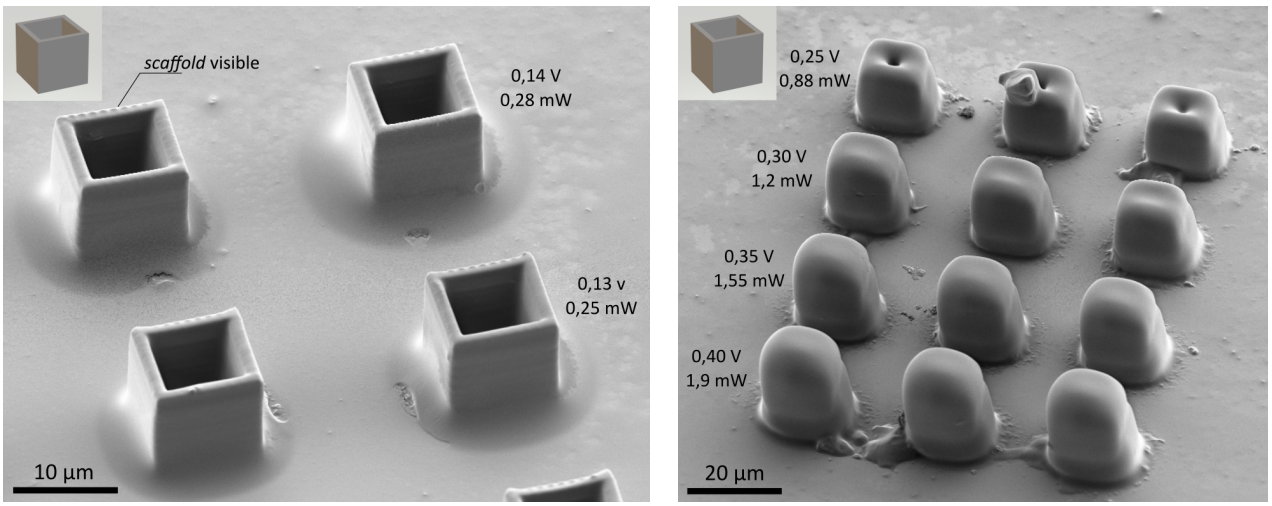
des structures de bonne qualité, il faut jouer sur d'autres paramètres.

4.3.5 Paramètres d'impression : variation de la puissance

Pour l'impression sur substrat opaque, la puissance du laser est un facteur important (voir partie 1.3.1). Des artéfacts tels que ceux de la figure 4.29 peuvent être liés à la puissance du laser lors de l'impression. En effet, quand la puissance est trop élevée pour une résine particulière, le voxel imprimé est plus grand et il y a plus de diffusion des radicaux. Pour améliorer la qualité des structures, on peut donc essayer de diminuer la puissance du laser.

4.3.5.1 Tests sur verre transparent

La figure 4.30 montre des cubes creux imprimés sur verre à différentes puissances, permettant de voir l'effet d'une trop forte puissance de laser. La figure 4.30a montre des cubes imprimés à puissances normales (0,25 et 0,28 mW pour des tensions de commande de 0,13 et 0,14 V) et la figure 4.30b à puissances élevées (de 0,878 mW/0,25 V à 1,9 mW/0,40 V). Pour toute cette partie, le temps d'exposition est de 2 ms.



(a) Cubes creux imprimés à puissances normales. (b) Cubes creux imprimés à puissances élevées.

FIGURE 4.30 – Cubes creux tests imprimés sur verre à différentes puissances. (Images MEB)

Les cubes creux imprimés à puissances normales sont bien carrés, et on peut même remarquer un défaut de slicing sur le dessus, le scaffold étant visible en haut alors qu'idéalement le dessus devrait être lisse. Les cubes imprimés avec des puissances trop élevées ne sont pas vraiment cubiques, ils sont très arrondis, et cet effet augmente avec la puissance. L'apparence de ces cubes arrondis rappelle celle des cubes imprimés sur le substrat métallique (figures 4.28 et 4.29), ce qui mène à penser que la puissance utilisée auparavant, optimale sur le verre, était effectivement trop élevée pour des substrats opaques et réfléchissants. Le laser étant réfléchi par le substrat, la puissance effective du laser pourrait en effet être plus élevée que quand on imprime sur du verre, qui laisse passer la majorité de l'intensité du laser.

4.3.5.2 Impression à puissances faibles sur substrats TMP opaques

Pour tester cette hypothèse, qu'imprimer avec des puissances plus faibles que d'ordinaire donnerait des meilleurs résultats, j'ai imprimé des cubes creux sur des substrats TMP recouverts de marqueur, à différentes puissances. Le but était de trouver la puissance optimale pour nos impressions.

En l'occurrence, j'ai utilisé des tensions de commande de 0,04 V, 0,07 V, 0,10 V et 0,13 V pour les cubes creux figure 4.31, voulant tester une grande plage de puissances (puissances de 0,02 mW, 0,07 mW, 0,15 mW et 0,25 mW). Pour cet échantillon, la couche sur le substrat est le feutre noir étalé avec un papier optique.

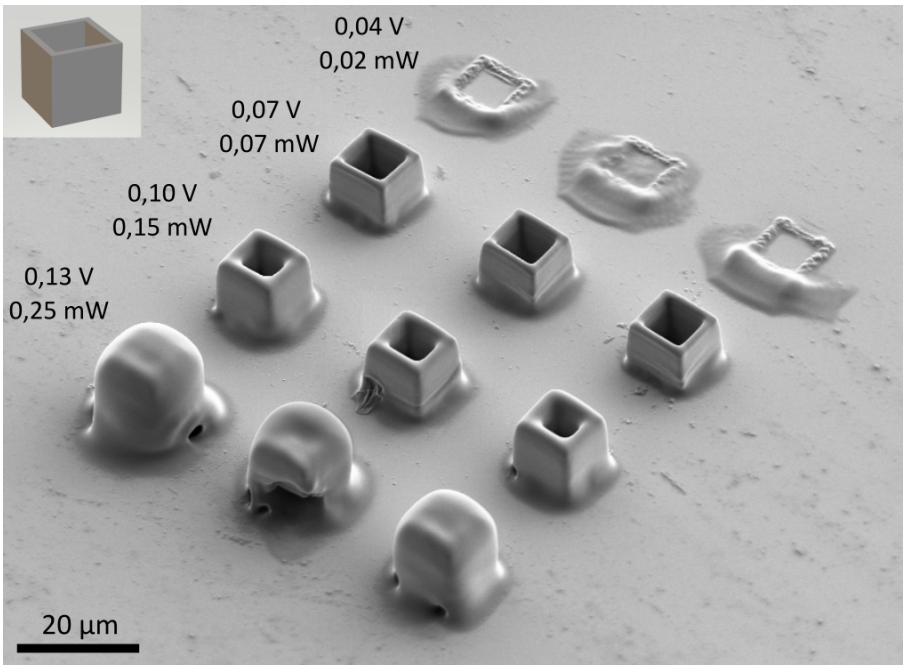


FIGURE 4.31 – Cubes creux imprimés sur substrat TMP recouvert de marqueur, à puissances variant beaucoup. (Image MEB)

Il y a de grandes différences entre les cubes imprimés lorsque l'on fait varier la puissance du laser. À 0,13 V, leur apparence est similaire à celle des cubes imprimés à trop haute puissance de la figure 4.30b, montrant bien que 0,28 mW (tension de commande de 0,14 V), qui est la puissance habituelle sur verre, est trop élevée pour imprimer sur aimants TMP. Les cubes imprimés avec une tension de commande de 0,10 V (0,15 mW) sont un peu déformés, mais sont quand même très proches du modèle 3D. Les cubes les mieux imprimés sont ceux imprimés avec une tension de commande de 0,07 V (0,07 mW). Les murs sont fins et les angles sont assez nets. Enfin, à 0,05 V (0,02 mW), il n'y a pas de structure en relief, seulement une trace sur la surface. Une hypothèse serait que le laser a une puissance trop faible pour polymériser la résine, sauf au niveau de la surface, où la puissance est doublée à cause de la réflexion, y polymérisant donc la résine.

Pour déterminer plus précisément la valeur de la puissance qui donne les impressions de meilleure qualité, j'ai imprimé un réseau de cubes avec un pas de 0,005 V, variant entre 0,07 V (0,07 mW) et 0,095 V (0,13 mW), visible figure 4.32). Ces valeurs ont été choisies car elles sont centrées autour

des puissances ayant donné des bonnes impressions lors du test précédent.

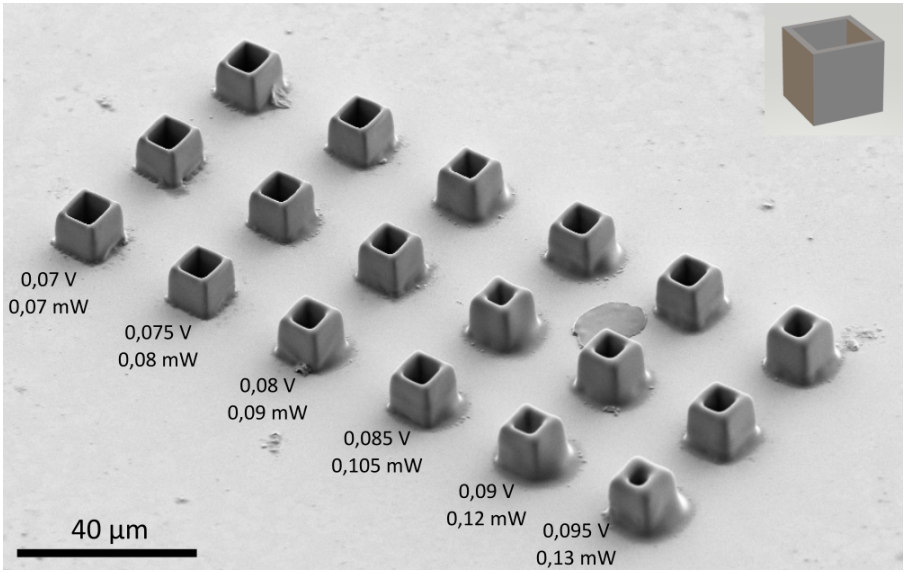


FIGURE 4.32 – Cubes creux imprimés sur substrat TMP avec revêtement marqueur, avec des tensions de commande variant entre 0,07 V et 0,095 V (pas de 0,005 V). (Image MEB)

Les cubes imprimés avec la puissance la plus faible sont à gauche sur l'image. Tous les cubes ont une qualité d'impression acceptable, mais les mieux imprimés sont ceux imprimés avec une tension de commande de 0,075 V, soit une puissance de 0,08 mW. En effet, ils sont bien définis, sans bords arrondis, et semblent fidèles au modèle original. Les cubes imprimés avec les autres puissances sont également d'assez bonne qualité, en particulier entre 0,07 mW et 0,09 mW.

Pour confirmer que cette tension de commande est optimale pour nos impressions, j'ai imprimé quatre réseaux de cubes creux identiques sur un même échantillon. Le but était de voir si on retrouvait les mêmes résultats, ainsi que de comparer les impressions avec d'autres imprimées dans les mêmes conditions, mais lancées en décalage dans le temps. En effet, étant donné que chaque cube creux est imprimé en 4 minutes, l'impression d'un réseau de 15 cubes dure environ une heure. En outre, j'ai ajouté une étape d'impression entre chaque réseau, en imprimant un cube à une vitesse plus lente et à une puissance trop faible pour imprimer, afin de séparer de 25 minutes l'impression des réseaux. Chaque réseau est donc imprimé sur le même substrat 1h30 après le précédent. Les quatre réseaux sont imprimés les uns après les autres, il y a donc un décalage dans le temps de plus de 4 heures entre les débuts d'impression du premier et du dernier réseau. Les tensions de commande utilisées varient de 0,08 V à 0,12 V (puissances de 0,09 mW à 0,21 mW), avec un pas de 0,01 V.

Sur l'image (fig. 4.33), les premiers objets imprimés sont en haut à gauche, et les derniers en bas à droite, réseau par réseau, et ligne par ligne au sein des colonnes.

Tout d'abord, on constate au premier abord que les quatre réseaux imprimés ne sont pas identiques, montrant que la durée d'attente avant l'impression a une influence sur la puissance nécessaire à une impression de qualité. Pour les cubes imprimés en premier, les plus fidèles au modèle sont ceux imprimés avec une tension de 0,08 V ou 0,09 V. Pour chaque nouvelle itération de réseau, cette tension idéale augmente, par exemple pour les cubes imprimés après 4 heures, les mieux imprimés sont ceux pour lesquels une tension de commande de 0,11 V a été utilisée.

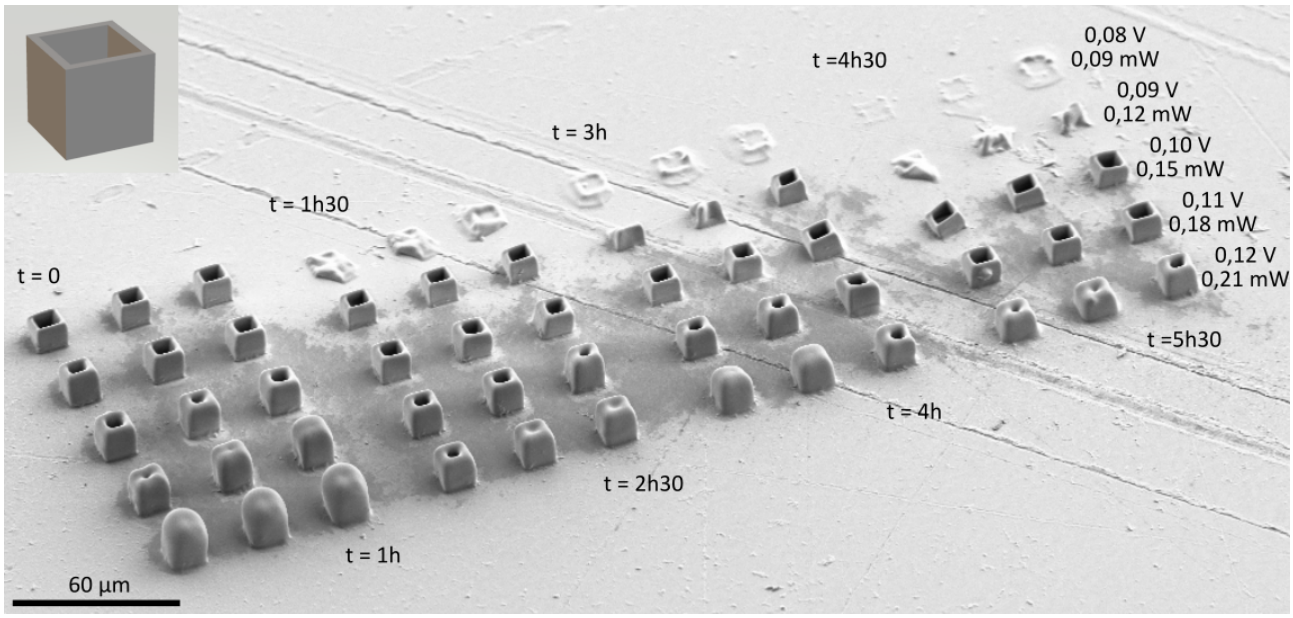


FIGURE 4.33 – Cubes creux imprimés sur substrat TMP et revêtement marqueur, sur une grande plage de temps (90 minutes entre le début de chaque réseau). Chaque réseau est imprimé en 1h environ. (Image MEB)

Ceci pourrait être lié au vieillissement de la résine (le solvant s'évaporant), ou bien à une réaction avec le revêtement de surface. Il faut donc augmenter la puissance d'impression si l'impression de plusieurs objets est trop longue pour les objets imprimés le plus tardivement. D'après ces résultats, il faut augmenter la tension de commande de 0,01 V pour chaque 1h30 de décalage.

Cependant, la plupart des objets sont imprimés rapidement, en moins d'une heure, donc ceci ne rentre pas souvent en compte ; en outre, cela peut expliquer des défauts d'impression dans certains cas. Par ailleurs, la puissance idéale pour imprimer les objets dépend aussi de la température de la pièce, celle-ci variant entre l'été et l'hiver.

Pour conclure, la puissance du laser est un paramètre décisif pour l'impression sur substrat métallique réfléchissant et opaque. Une puissance diminuée par rapport à la normale sur verre est nécessaire. Pour une impression sur aimant TMP avec revêtement marqueur, il faut utiliser une tension de commande autour de 0,08 V (soit une puissance de 0,09 mW) et un temps d'exposition de 2 ms. La valeur de la puissance peut changer légèrement suivant le modèle 3D, la température extérieure et la vétusté de la résine.

4.3.6 Impression d'objets plus complexes

L'impression des cubes creux tests étant maîtrisée, j'ai imprimé d'autres objets, de formes différentes, pour voir si la méthode d'impression fonctionnait avec tous types de modèles 3D : des cylindres creux de 10 µm et 14 µm de diamètre extérieur, un modèle de fourmi, et des cubes creux empilés pour créer une structure plus haute. Ces objets ont été choisis car chacun permet de tester un paramètre différent : le cylindre permet de tester l'impression de courbes, la fourmi est une structure complexe, et les cubes empilés sont plus grands que les autres structures testées.

Pour comparer les cylindres aux cubes, j'ai imprimé les deux sur le même échantillon, dont une image MEB est visible figure 4.34. les cubes et les cylindres ont été imprimés avec la même gamme de puissances, variant entre 0,05 mW et 0,15 mW (0,06 V à 0,10 V).

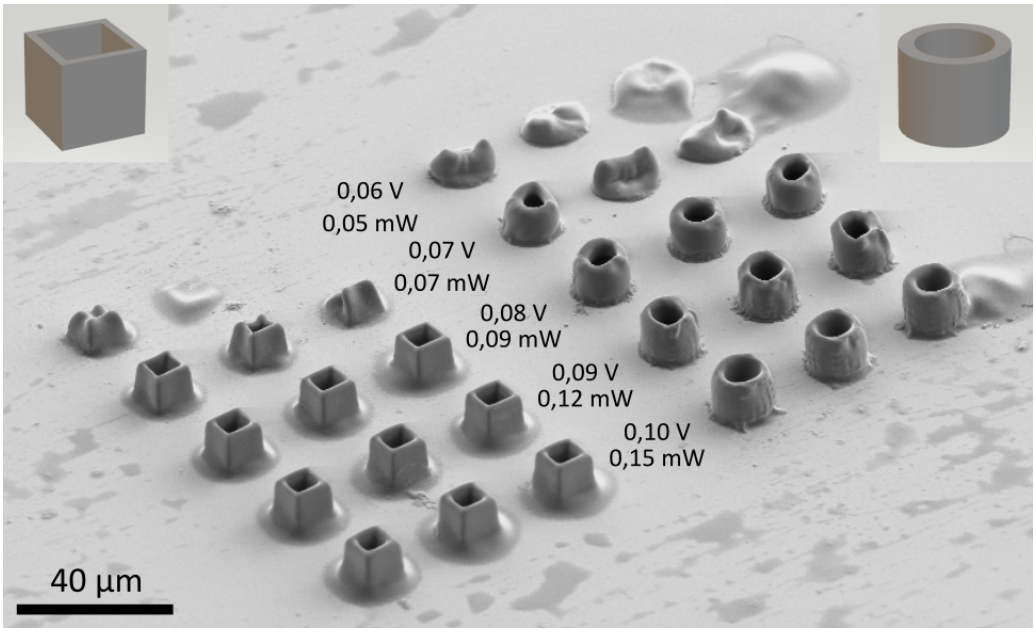


FIGURE 4.34 – Réseaux de cubes creux et cylindres creux imprimés sur substrat TMP, aux mêmes puissances, sur le même échantillon. (Image MEB)

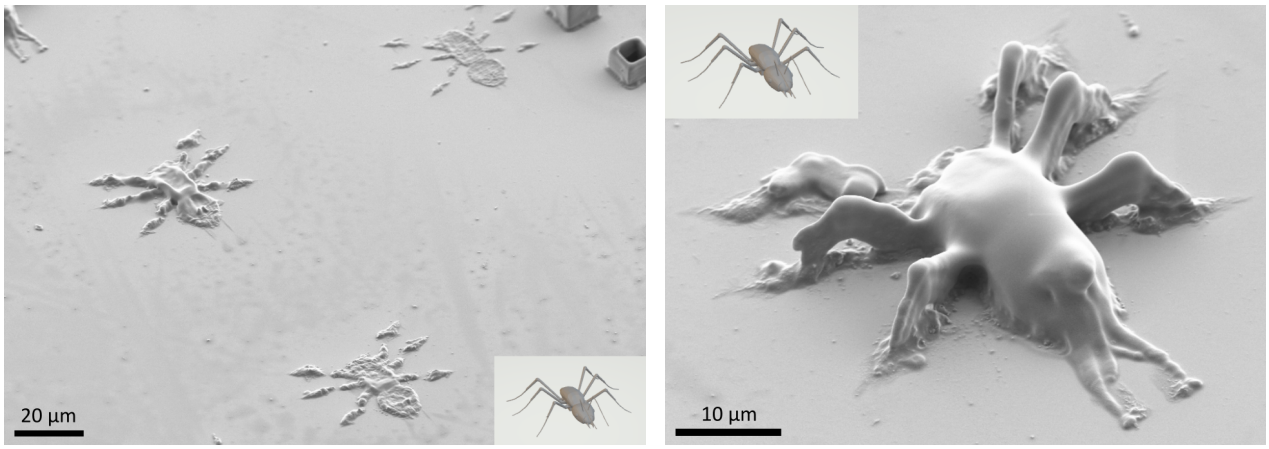
L'apparence des cylindres n'est pas aussi bonne que celle des cubes, mais à une puissance donnée, la qualité de l'impression est assez similaire pour les cubes et pour les cylindres. Par exemple, les objets imprimés à la puissance la plus faible sont tous soit effondrés soit inexistants, et ceux imprimés à la puissance la plus élevée sont tous bien imprimés.

Ensuite, pour savoir s'il était possible d'imprimer des objets plus complexes, j'ai imprimé le modèle 3D de fourmi montré en exemple d'impression (fig. 2.10), mais retourné pour pouvoir l'imprimer sur substrat opaque.

L'impression des fourmis aux puissances les plus faibles n'a laissé qu'une trace. Une seule fourmi possède du relief mais la qualité de l'impression est bien plus mauvaise que sur verre. L'impression des fourmis est assez peu reproductible et nécessite plus de travail d'optimisation, en jouant sur la puissance du laser et sur le *slicing* du modèle.

Enfin, pour lier les structures aux billes, il faut qu'elles soient assez grandes. En effet, le lien est crée à mi-hauteur de la bille, donc si celle-ci fait 30 µm, la structure doit mesurer plus de 15 µm. Les cubes utilisés jusqu'à maintenant mesurent 9 µm, car le modèle de 10 µm de coté est imprimé avec un offset de 1 µm dans le substrat.

On cherche donc à imprimer des objets plus grands. Les premiers tests durant lesquels j'ai imprimé des cubes de 30 µm de coté ne furent pas fructueux. L'hypothèse est que le laser n'est pas réfléchi de la même façon lorsqu'on l'éloigne du substrat, et donc sa puissance est trop faible pour polymériser la résine. Pour pallier ce problème, une solution est d'imprimer les structures en deux étapes : une première à puissance réduite (0,09 mW, ou 0,08 V) pour imprimer les 10 premiers



(a) Fourmis imprimées à 0,07 V (0,07 mW) et 0,08 V (0,09 mW).

(b) Fourmi imprimée à 0,09 V (0,12 mW).

FIGURE 4.35 – Images MEB de fourmis imprimées sur substrat TMP.

microns de hauteur, puis une seconde à puissance normale (0,28 mW, ou 0,14 V), pour imprimer le haut de l'objet.

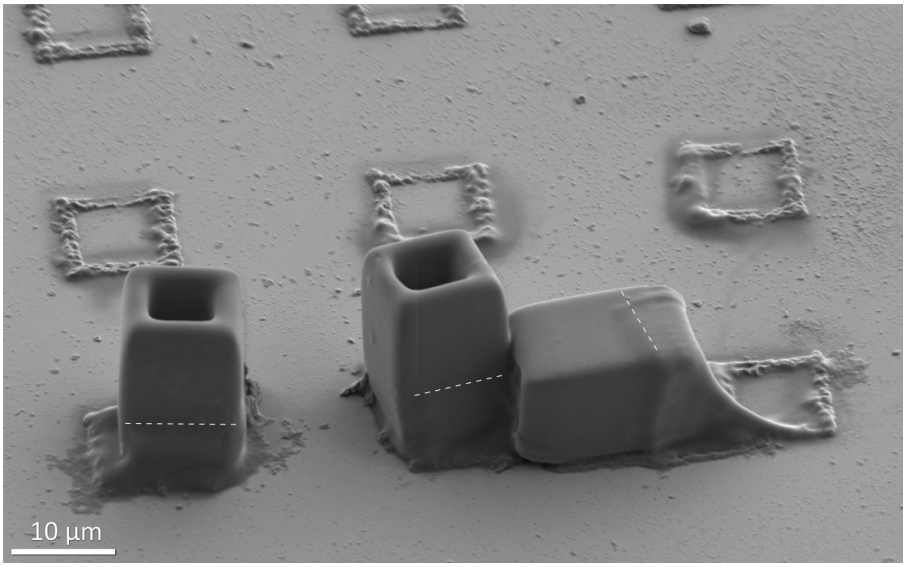


FIGURE 4.36 – Image MEB de cubes creux empilés en z, sur substrat TMP.

Pour l'échantillon figure 4.36, j'ai commencé par imprimer des cubes à différentes puissances comprises entre 0,07 mW et 0,12mW (tensions de commande de 0,07 à 0,09 V). Ensuite, j'ai imprimé une seconde itération des cubes avec un offset en z avec une tension de commande de 0,13 V (0,25 mW), le but étant de créer un pavé droit plus haut (17 µm au lieu de 9 µm). Les deux cubes sont empilés, il faut donc que les deux itérations soient viables pour que la structure entière soit bien imprimée.

Sur l'image, on voit que seuls les objets imprimés à 0,09 V (0,12mW) sont présents après rinçage. Pour les deux puissances plus faibles, le premier cube n'a pas adhéré au substrat. D'ailleurs même sur la dernière ligne, on remarque que les structures sont légèrement décalées. Sans prendre en compte

ce défaut, les structures sont assez fidèles au modèle attendu. La deuxième étape d'impression (cubes imprimés en hauteur) pourrait être faite avec une puissance un peu plus faible pour améliorer l'aspect de la surface.

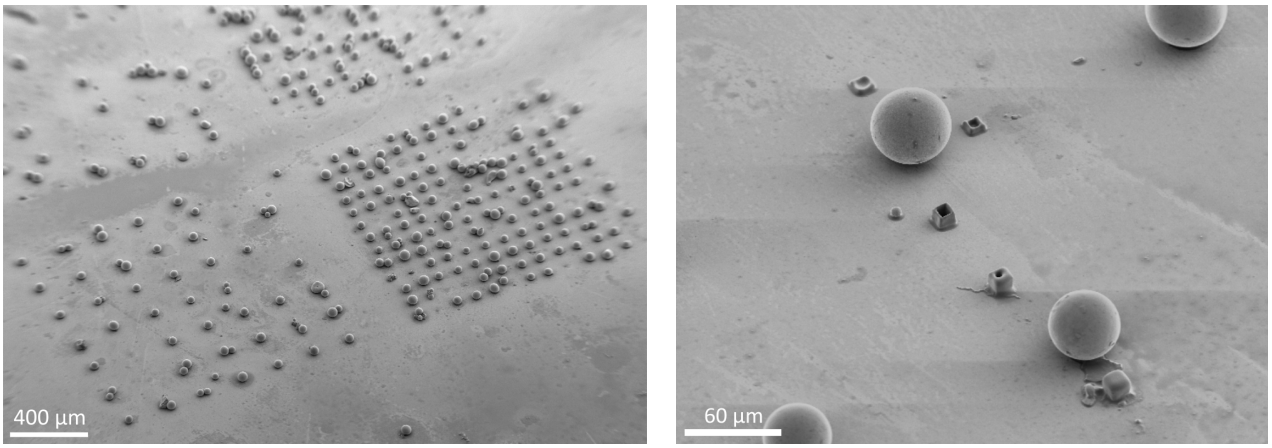
Nous avons imprimé avec succès des cylindres du même ordre de grandeur que les cubes utilisés pendant le reste du chapitre, montrant que l'impression d'objets autour de 10 µm est maîtrisée. Cependant, l'impression de structures complexes et grandes nécessite encore du développement.

4.3.7 Fabrication de structures magnétiques sur aimant TMP

L'objectif final étant de fabriquer les structures entièrement sur les aimants TMP, il faut donc construire des objets à côté des billes et les attacher à celles-ci. Ceci requiert une étape supplémentaire : jusqu'ici, le revêtement était ajouté directement sur le substrat, puis on pouvait imprimer, mais ici il faut également déposer les billes sur l'aimant TMP. Pour déposer les billes sur les pièges, le substrat est habituellement plongé dans un bain d'éthanol. On ne peut donc pas déposer le revêtement de feutre avant de placer les billes, car il serait dissout dans le bain.

Ainsi, on dépose d'abord les billes avec le protocole habituel, puis on place une goutte du revêtement à base d'encre au centre du substrat. Ce liquide est assez fluide pour se glisser entre les billes, et donc couvrir intégralement l'aimant TMP. Une conséquence est que les billes sont également revêtues d'une couche d'encre. Par ailleurs, les billes doivent rester en place pendant le dépôt de la goutte d'Ormocomp ; la solution étant assez visqueuse, il y a un risque de déplacement des billes lors du dépôt de la goutte.

Afin de vérifier que les billes restent piégées et que l'impression est possible, j'ai suivi le protocole ci-dessus sur un piège à billes, donc un aimant TMP avec le motif magnétique adapté. J'ai utilisé des billes de 30 à 50 µm de diamètre, et le même aimant TMP que pour la partie 4.2.4 (fig. 4.37).



(a) Vue de loin. Les billes sont restées piégées durant les étapes de fabrication.

(b) Impressions de cubes près de billes piégées.

FIGURE 4.37 – Images MEB de pièges à billes après impression de cubes creux.

On remarque d'abord (fig. 4.37a) que la majorité des billes sont bien piégées, elles n'ont pas bougé durant les différentes étapes du protocole, en particulier le dépôt de la goutte d'Ormocomp.

La figure 4.37b montre des cubes creux imprimés à proximité de billes piégées. Les structures les plus proches des billes n'ont pas été bien imprimées. Deux cubes sont cependant bien imprimés, donc l'impression à côté des billes est quand même envisageable.

La question qui se pose donc est : est-il possible d'imprimer plus proche de la bille, puis de fabriquer le lien entre la bille et une structure 3D complexe ? Pour y répondre, j'ai imprimé un cube proche de la bille et quadrillé en 3D tout autour de la bille. Le résultat cherché est d'avoir un quadrillage en 3D autour de la bille, et un cube creux à coté, également lié au quadrillage.

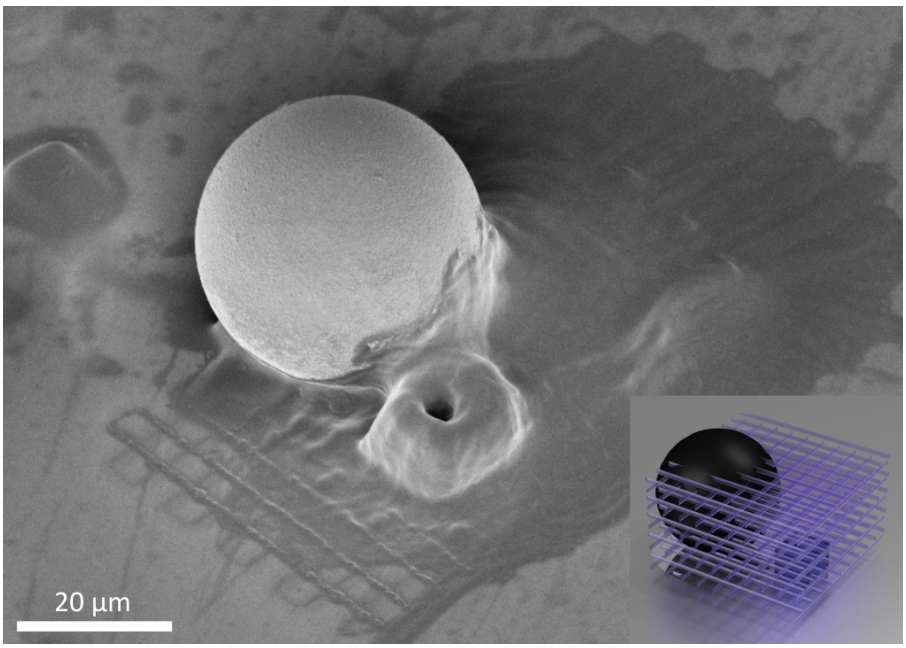


FIGURE 4.38 – Cube et grille 3D imprimés à coté d'une bille piégée (image MEB) et rendu 3D de ce qu'on voulait imprimer.

La figure 4.38 montre cet échantillon. Le cube est imprimé correctement, les murs sont épais mais ceci est certainement dû à la grille 3D, qui a été mal imprimée. Il est donc possible d'imprimer des cubes proche des billes. La grille 3D est absente, seule une trace est visible sur le substrat et sur le cube, et sur certaines parties de la bille. Ceci peut être dû à un mauvais *slicing* de la grille ou à une puissance d'impression non adaptée. Il faudrait réaliser plus de tests d'impression pour déterminer la cause du problème et le résoudre, mais nous n'avons pas pu le faire par manque de temps.

Pour conclure, l'impression 3D microscopique sur substrats TMP, donc opaques et réfléchissants nécessite des modifications importantes du protocole de fabrication, liées à la nature du substrat. Le protocole que nous avons développé consiste à couvrir le substrat d'une couche d'encre diluée dans de l'éthanol. Cette couche permet d'améliorer l'adhérence des structures au substrat et de réduire sa réflectivité. En outre, on utilise une puissance réduite par rapport à la puissance utilisée sur verre, pour améliorer l'aspect des structures. L'impression sur substrat métallique est rare et n'avait jamais été démontrée sur du tantale, surface des substrats TMP. Nous avons réussi à imprimer correctement des cubes et des cylindres de 10 µm de coté, mais l'impression de structures plus complexes et plus grandes demande encore du travail, même si nous avons eu des premiers résultats encourageants. Lier les structures aux billes n'a pas non plus montré de résultats probants, mais trop peu d'échantillons ont pu être fabriqués pour être affirmatif.

4.4 Conclusion et perspectives

Pour fabriquer nos micro-robots magnétiques en grand nombre et imprimer plus facilement des structures à plusieurs billes, nous avons développé une méthode consistant à piéger les billes magnétiques sur des substrats aimantés selon un motif (TMP). Pour ce faire, nous avons travaillé sur deux points principaux : la fabrication de pièges à billes efficaces et l'impression sur substrats TMP métalliques.

Les pièges à billes les plus efficaces, après simulations et expérimentations, sont ceux de taille similaire aux billes, ayant un taux de capture autour de 60 % en moyenne, taux qui augmente quand les pièges sont plus espacés. On utilise alors des pièges de diamètre 30 µm et des billes de diamètres compris entre 30 et 50 µm.

L'impression sur substrats TMP, couverts de tantale, a été validée pour des structures simples de petite taille ($\approx$ 10 µm), en particulier, l'impression des cubes creux est maîtrisée. Pour fabriquer des micro-structures sur ces substrats, nous avons développé une technique consistant à déposer un revêtement à base d'encre de feutre sur les substrats, puis à imprimer avec une puissance réduite.

Idéalement, à court terme, pour finir ce travail, il faudrait résoudre les problèmes d'impression de structures complexes et du lien avec la bille magnétique. Pour ce faire, la première piste serait de continuer dans la direction suivie pour l'échantillon figure 4.36, en utilisant différentes puissances pour les parties basses et hautes des structures. Quant au lien entre la bille et la structure, il faudrait tester une grande gamme de puissance et différents *slicings*.

À plus long terme, deux questions se posent :

— comment et quand aimanter les billes, qui pour l'instant n'ont été soumises qu'au champ du substrat TMP ?

— comment détacher les micro-robots du substrat ?

Ces questions sont liées, en effet, on pourrait essayer de détacher les structures grâce à leur bille magnétique, auquel cas elle devra être aimantée. Inversement, les détacher manuellement serait plus simple si les billes n'étaient pas aimantées.

Pour aimanter les billes, on pourrait utiliser le générateur de champ pulsé comme dans le chapitre 3. Cependant, la surface sur laquelle le champ est homogène est assez petite (quelques millimètres). De plus, pour les micro-robots à plusieurs billes dont chaque bille a une aimantation dans une direction différente, il faut aimanter chaque bille dans un champ orienté différemment. Une option envisagée est de créer un masque et d'utiliser la technologie TMP pour isoler les différentes billes est les aimanter les unes après les autres. Cependant, la structure en Ormocomp pourrait être abîmée par le laser.

Habituellement, on détache les micro-robots un par un avec une aiguille, mais cette approche individuelle serait inefficace sur un grand nombre de structures. On peut imaginer une autre méthode mécanique (par exemple glisser une lamelle de verre sur l'échantillon), mais il faut s'assurer de ne pas abîmer les structures.

Conclusions et perspectives

Conclusions

Nous avons ici présenté le développement de micro-robots magnétiques imprimés en 3D par polymérisation à deux photons. Deux volets ont été approfondis en parallèle :

— la conception et la fabrication d'une structure hybride Ormocomp-collagène, déformable magnétiquement à distance, imitant les conditions *in vivo* pour servir de substrat de culture cellulaire

— l'amélioration de la méthode de fabrication de nos micro-robots vers une méthode semi-automatique, permettant la fabrication de micro-robots magnétiques en série grâce au pré-positionnement des billes, et l'impression sur substrats métalliques opaques et réfléchissants.

La micro-impression 3D par 2PP permet la fabrication de micro-robots de taille inférieure au millimètre avec une résolution micrométrique pour diverses applications. Ici, nous avons fabriqué des micro-robots magnétiques en liant une structure imprimée par 2PP à une bille de NdFeB, ce qui permet leur actionnement dans un champ magnétique.

En utilisant les différents matériaux et méthodes présentés dans le chapitre 2, deux innovations quant à l'impression à deux photons ont été développées pour fabriquer nos micro-robots : l'impression de structures multi-matériaux avec de l'Ormocomp et un hydrogel de gélatine et de collagène, ainsi que l'impression sur substrats métalliques, en particulier le tantale.

Tout d'abord, on a cherché à créer un substrat de culture cellulaire courbé et déformable afin de répliquer les conditions réelles des tissus des organes *in vivo*, en particulier les villosités intestinales. Pour ce faire, nous avons conçu une structure hybride composée d'un squelette en Ormocomp lié à une bille magnétique imprimé en premier lieu, et d'une enveloppe en collagène imprimée ensuite autour du squelette. Le squelette est constitué d'un pied principal avec des contreforts obliques empêchant qu'il s'affaisse lors du dépôt du collagène, et d'un treillis améliorant sa flexion. Ces propriétés ont été choisies après des calculs analytiques, des simulations et des expérimentations. L'enveloppe en collagène est un pavé droit, dont le *slicing* a été optimisé pour limiter son gonflement tout en respectant les dimensions finales.

La deuxième étape de ce processus d'hybridation, l'impression dans la gélatine-collagène, a demandé une attention particulière car en séchant, la goutte de gélatine exerce des contraintes élevées sur les structures en Ormocomp, ce qui les déforme. Ce séchage est cependant indispensable pour avoir une bonne impression dans la gélatine, sans matériel partiellement réticulé. Ainsi, nous avons développé un protocole consistant à faire chauffer l'échantillon pendant le séchage pour empêcher la gélification et donc limiter les contraintes exercées par l'hydrogel. Enfin, nous avons fabriqué une

structure complète avec un squelette en Ormocomp, une enveloppe en gélatine-collagène et une bille de NdFeB.

En outre, nous avons étudié la déformation du treillis sous actionnement magnétique. Le squelette se déforme jusqu'à ce que la bille ait fait un demi-tour et que le treillis soit courbé en un demi-cercle. Ceci correspond également aux simulations par éléments finis. Enfin, nous avons commencé la culture cellulaire sur des structures imprimées en collagène par 2PP, et avons pu déduire que celle-ci était possible.

Le second sujet de recherche présenté ici est le développement d'une méthode de fabrication de nos micro-robots permettant une fabrication semi-automatique et facilitant la fabrication de micro-robots à plusieurs billes. En effet, le protocole original consiste à saupoudrer aléatoirement les billes magnétiques sur une lamelle de verre, il faut donc repérer (et déplacer si besoin) les billes les mieux placées avant de pouvoir imprimer la structure à proximité. On cherche donc à placer les billes précisément avant l'impression. Pour ce faire, on utilise des substrats TMP aimantés selon un motif magnétique. Après simulations et expérimentations, les pièges les plus efficaces sont ronds d'un diamètre similaire à celui des billes piégées, avec un taux de capture d'une bille unique autour de 60 %.

Cependant, l'impression sur ces substrats est complexe car leur surface est différente des lamelles de verre habituelles à la fois optiquement (surface opaque et réfléchissante) et chimiquement (tantale au lieu de silice). Pour imprimer sur ces substrats, les modifications de la méthode que nous avons développées consistent à inverser l'ordre des couches pour une impression substrat tête en bas, à déposer un revêtement à base d'encre de feutre avant l'impression, et à diminuer la puissance du laser. Grâce à ce protocole, nous avons pu imprimer des cubes et des cylindres creux de 10 par 10 µm. Quelques structures plus complexes et plus grandes ont été imprimées, mais avec moins de reproductibilité.

L'impression de micro-robots complets, soit une micro-structure accrochée à une bille, n'est pas encore validée, mais le protocole de fabrication fonctionne : on commence par piéger les billes, puis on ajoute le revêtement, avant de déposer l'Ormocomp sur les billes piégées et d'imprimer les structures.

Perspectives

Les deux volets étudiés peuvent encore être approfondis. L'actionnement de la structure hybride n'est pas encore validé, les tests actuels n'ayant été faits qu'avec le squelette en Ormocomp, sans enveloppe en gélatine. Cependant, l'enveloppe souple ne devrait pas beaucoup changer la déformation de la structure, donc les résultats obtenus devraient s'appliquer à la structure complète, que ce soit avec le pavé droit ou avec les cylindres qui imitent les villosités intestinales.

Par ailleurs, la culture cellulaire sur les structures en gélatine n'en est encore qu'à ses débuts : il faut continuer le travail sur les structures hybrides, et quand l'actionnement et la culture cellulaire seront maîtrisés, on pourra actionner les structures recouvertes de cellules et réellement étudier leur comportement dans un milieu déformable.

Grâce à notre technique d'impression hybride, on pourrait également fabriquer d'autres structures

pour d'autres applications qui nécessitent un squelette stable mais déformable et une enveloppe en hydrogel biocompatible.

Une autre piste plus éloignée pour fabriquer des substrats en gélatine à plus grande échelle serait d'utiliser une autre technologie d'impression 3D, en l'occurrence la DLP (Digital Light Processing). Celle-ci permet l'impression couche par couche grâce à un réseau de LEDs UV, avec une résolution voisine de quelques dizaines de microns. La vitesse de fabrication est ainsi fortement réduite. L'utilisation de la DLP avec la résine gélatine-collagène est développée en ce moment au LiPhy.

Quant à l'impression sur substrats TMP pour fabriquer des micro-robots magnétiques, il faut travailler sur l'impression de structures plus grandes que 10 µm, en continuant dans la direction dans laquelle nous sommes partis : imprimer les structures en plusieurs fois, le bas de la structure en premier à puissance faible, puis le reste à puissance plus élevée. Ensuite, il faut également résoudre le problème d'impression du lien entre la bille et la structure. Pour ce faire, les premières pistes à suivre sont de tester une large gamme de puissance et différents *slicings* pour le lien.

Quand l'impression de tous types de micro-robots sera maîtrisée, il faudra aimanter les billes à saturation et détacher les structures du substrat. Ces deux tâches sont liées, car la première qui est réalisée a une influence sur la seconde. Par exemple, si on aimante les billes en premier, les structures seront plus difficiles à détacher manuellement, mais plus simples à décrocher en utilisant la force magnétique des billes ; mais si on détache les structures, il est difficile d'aimanter ensuite les billes dans une direction précise. De plus, pour les micro-robots à plusieurs billes dont les billes ont des aimantations orientées différemment, il faut aimanter chaque bille dans un champ différent. Ainsi, il faudra tester différentes combinaisons de méthodes d'aimantation et de décrochage des micro-robots.

Les micro-robots finaux pourront être utilisés pour diverses applications. Par exemple, nous avons développé lors de mon stage de master avec la méthode initiale une micro-pince pouvant se déplacer, s'ouvrir et se fermer (fig. C.1), permettant par exemple le déplacement de petits objets tels que des cellules. Des pinces pourraient être fabriquées bien plus facilement avec cette méthode.

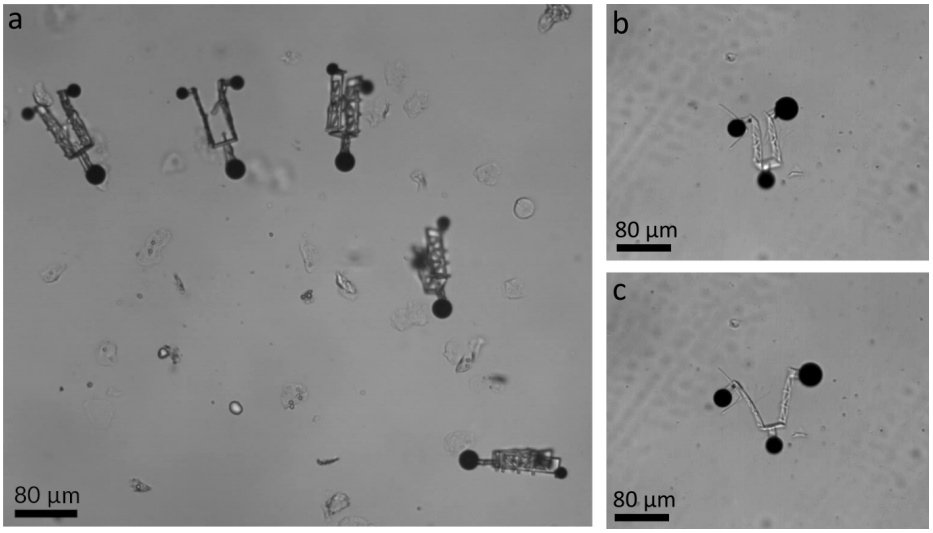


FIGURE C.1 - Micro-pince actionnée dans un champ magnétique. a. Déplacement par roulement. b Fermeture de la pince. c. Ouverture de la pince. Images au microscope optique.

Annexe A

Protocole de fabrication des structures hybrides Ormocomp-gélatine

- Fabrication des squelettes
  - Saupoudrer des billes de NdFeB non-aimantées, de diamètre compris entre 30 et 50 µm sur une lamelle de verre. S'assurer qu'elles sont distantes de quelques centaines de microns.
  - Déposer une goutte d'Ormocomp sur les billes.
  - Trouver quelques billes bien placées les unes par rapport au autres, d'une distance de 200 à 500 µm entre elles
  - Faire le zéro de la platine grande course au niveau du point le plus à gauche d'une bille, et déterminer les coordonnées des autres billes par rapport à la première.
  - Refaire le zéro de la platine grande course à -102 µm en x et - 27 µm en y, pour prendre en compte la position du treillis par rapport à la bille.
  - Lancer l'impression normalement et accrocher les billes aux structures.
  - Rincer dans un bain d'acétone 10 minutes, en plaçant la lamelle vers le bas en appui sur un petit objet, pour que les billes non attachées tombent au fond du bain par gravité.
  - Sécher les structures sous un cristallisoir retourné pendant 20 à 30 minutes.
- Dépôt de la goutte de gélatine-collagène
  - Faire chauffer l'hydrogel au bain-marie.
  - Dessiner un point sous l'échantillon au niveau des squelettes avec un marqueur. Un microscope peut être utilisé pour faciliter la tâche.
  - Placer l'échantillon sur une plaque chauffant à 50°C pendant 5 minutes.
  - Avec une micropipette, déposer une goutte de 50 µL au niveau de la marque.
  - Laisser la gélatine durcir pendant 30 minutes, puis diminuer la température à 35°C pour 10 minutes.
  - Éteindre la plaque chauffante et laisser l'échantillon reposer encore 30 minutes, pour s'assurer que la gélatine soit prête à l'impression.
  - Nettoyer la marque avec de l'éthanol.
- Fabrication des pavés
  - Placer l'échantillon sur le porte-échantillon dans la même orientation qu'auparavant.
  - Faire le zéro au niveau du coin supérieur gauche du premier squelette.
  - Lancer l'impression des pavés avec les mêmes coordonnées que la première impression. Si

la plaque n'est pas parfaitement alignée, il vaut mieux imprimer les pavés séparément.

— Rincer normalement dans du PBS à 40°C pendant 30 à 40 minutes

Bibliographie

[1] Shoji Maruo, Osamu Nakamura, and Satoshi Kawata. Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. *Optics Letters*, 22(2) :132, Jan 1997.

[2] Timo Gissibl, Simon Thiele, Alois Herkommer, and Harald Giessen. Two-photon direct laser writing of ultracompact multi-lens objectives. *Nature Photonics*, 10(8) :554–560, Aug 2016.

[3] Prakriti Tayalia, Cleber R. Mendonca, Tommaso Baldacchini, David J. Mooney, and Eric Mazur. 3D Cell-Migration Studies using Two-Photon Engineered Polymer Scaffolds. *Advanced Materials*, 20(23) :4494–4498, 2008.

[4] Boudewijn van der Sanden, Laetitia Gredy, Didier Wion, and Olivier Stephan. 3d two-photon polymerization of smart cell gelatin – collagen matrixes with incorporated ruthenium complexes for the monitoring of local oxygen tensions. *Acta Biomaterialia*, 130 :172–182, Aug 2021.

[5] Hong Xia, Juan Wang, Ye Tian, Qi-Dai Chen, Xiao-Bo Du, Yong-Lai Zhang, Yan He, and Hong-Bo Sun. Ferrofluids for fabrication of remotely controllable micro-nanomachines by two-photon polymerization. *Advanced Materials*, 22(29) :3204–3207, 2010.

[6] Jiyun Kim, Su Eun Chung, Sung-Eun Choi, Howon Lee, Junhoi Kim, and Sunghoon Kwon. Programming magnetic anisotropy in polymeric microactuators. *Nature Materials*, 10(10) :747–752, August 2011.

[7] Victor Vieille, Roxane Pétrot, Olivier Stéphan, Guillaume Delattre, Florence Marchi, Marc Verdier, Orphée Cugat, and Thibaut Devillers. Fabrication and magnetic actuation of 3D-microprinted multifunctional hybrid microstructures. *Advanced Materials Technologies*, 5(10) :2000535, August 2020.

[8] Alison Abbott. Biology's new dimension. *Nature*, 424(6951) :870–872, August 2003.

[9] Danielle Baptista, Liliana Teixeira, Clemens van Blitterswijk, Stefan Giselbrecht, and Roman Truckenmüller. Overlooked ? Underestimated ? Effects of substrate curvature on cell behavior. *Trends in Biotechnology*, 37(8) :838–854, Aug 2019.

[10] F. Dumas-Bouchiat, L. F. Zanini, M. Kustov, N. M. Dempsey, R. Grechishkin, K. Hasselbach, J. C. Orlianges, C. Champeaux, A. Catherinot, and D. Givord. Thermomagnetically patterned micromagnets. *Applied Physics Letters*, 96(10) :102511, March 2010.

[11] Sima Rekštytė, Albertas Žukauskas, Vytautas Purlys, Yuri Gordienko, and Mangirdas Malinauskas. Direct laser writing of 3D polymer micro/nanostructures on metallic surfaces. *Applied Surface Science*, 270 :382–387, 2013.

[12] Ben Wang, Kostas Kostarelos, Bradley J. Nelson, and Li Zhang. Trends in micro-/nanorobotics : Materials development, actuation, localization, and system integration for biomedical applications. *Advanced Materials*, 33(4) :2002047, 2021.

[13] Metin Sitti. Miniature soft robots — road to the clinic. *Nature Reviews Materials*, 3(6) :74–75, Jun 2018.

[14] Jack W Judy. Microelectromechanical systems (MEMS) : fabrication, design and applications. *Smart Materials and Structures*, 10(6) :1115–1134, nov 2001.

[15] Nicolas Bertin, Tamsin Spelman, Olivier Stéphan, Laetitia Gredy, Michel Bouriau, Eric Lauga, and Philippe Marmottant. Propulsion of bubble-based acoustic microswimmers. *Physical Review Applied*, 4, Dec 2015.

[16] Daniel Ahmed, Mengqian Lu, Amir Nourhani, Paul E. Lammert, Zak Stratton, Hari S. Muddana, Vincent H. Crespi, and Tony Jun Huang. Selectively manipulable acoustic-powered microswimmers. *Scientific Reports*, 5(1) :1–8, May 2015.

[17] Kwok Ho Lam, Hsiu-Sheng Hsu, Ying Li, Changyang Lee, Anderson Lin, Qifa Zhou, Eun Sok Kim, and Kirk Koping Shung. Ultrahigh frequency lensless ultrasonic transducers for acoustic tweezers application. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(3) :881–886, October 2012.

[18] J P Mills, Lan Qie, Ming Dao, C.T. Lim, and Srishti Suresh. Nonlinear elastic and viscoelastic deformation of the human red blood cell with optical tweezers. *Mechanics & chemistry of biosystems : MCB*, 1 :169–80, 10 2004.

[19] Tao Luo, Lei Fan, Rong Zhu, and Dong Sun. Microfluidic single-cell manipulation and analysis : Methods and applications. *Micromachines*, 10(2) :104, February 2019.

[20] Eric Diller and Metin Sitti. Three-dimensional programmable assembly by untethered magnetic robotic micro-grippers. *Advanced Functional Materials*, 24(28) :4397–4404, 2014.

[21] Xiang-Zhong Chen, Marcus Hoop, Fajer Mushtaq, Erdem Siringil, Chengzhi Hu, Bradley J. Nelson, and Salvador Pané. Recent developments in magnetically driven micro- and nanorobots. *Applied Materials Today*, 9 :37–48, Dec 2017.

[22] Mahmut Selman Sakar, Edward B. Steager, Dal Hyung Kim, Min Jun Kim, George J. Pappas, and Vijay Kumar. Single cell manipulation using ferromagnetic composite microtransporters. *Applied Physics Letters*, 96(4) :043705, January 2010.

[23] Islam S. M. Khalil, Herman C. Dijkslag, Leon Abelmann, and Sarthak Misra. MagnetoSperm : A microrobot that navigates using weak magnetic fields. *Applied Physics Letters*, 104(22) :223701, Jun 2014.

[24] Xiaohui Yan, Qi Zhou, Melissa Vincent, Yan Deng, Jiangfan Yu, Jianbin Xu, Tiantian Xu, Tao Tang, Liming Bian, Yi-Xiang J. Wang, Kostas Kostarelos, and Li Zhang. Multifunctional biohybrid magnetite microrobots for imaging-guided therapy. *Science Robotics*, 2(12) :eaaq1155, 2017.

[25] Paul Langevin. Sur la théorie du magnétisme. *J. Phys. Theor. Appl.*, 4(1) :678–693, 1905.

[26] Mariana Medina-Sánchez, Lukas Schwarz, Anne K. Meyer, Franziska Hebenstreit, and Oliver G. Schmidt. Cellular cargo delivery : Toward assisted fertilization by sperm-carrying micromotors. *Nano Letters*, 16(1) :555–561, December 2015.

[27] Jiachen Zhang and Eric Diller. Tetherless mobile micrograsping using a magnetic elastic composite material. *Smart Materials and Structures*, 25(11) :11LT03, Nov 2016.

[28] Hong Wang and Martin Pumera. Fabrication of micro/nanoscale motors. *Chemical Reviews*, 115(16) :8704–8735, 2015. PMID : 26234432.

[29] Tianlong Li, Jinxing Li, Konstantin I. Morozov, Zhiguang Wu, Tailin Xu, Isaac Rozen, Alexander M. Leshansky, Longqiu Li, and Joseph Wang. Highly efficient freestyle magnetic nanoswimmer. *Nano Letters*, 17(8) :5092–5098, Aug 2017.

[30] Yang Lin and Jie Xu. Microstructures fabricated by two-photon polymerization and their remote manipulation techniques : Toward 3D printing of micromachines. *Advanced Optical Materials*, 6(8) :1701359, 2018.

[31] Fatemeh Rajabasadi, Lukas Schwarz, Mariana Medina-Sánchez, and Oliver G. Schmidt. 3D and 4D lithography of untethered microrobots. *Progress in Materials Science*, 120 :100808, Jul 2021.

[32] Li Zhang, Jake J. Abbott, Lixin Dong, Bradley E. Kratochvil, Dominik Bell, and Bradley J. Nelson. Artificial bacterial flagella : Fabrication and magnetic control. *Applied Physics Letters*, 94(6) :064107, February 2009.

[33] Matthew M. Hawkeye and Michael J. Brett. Glancing angle deposition : Fabrication, properties, and applications of micro- and nanostructured thin films. *Journal of Vacuum Science & Technology A : Vacuum, Surfaces, and Films*, 25(5) :1317, 2007.

[34] X. Wang et al. 3D printed enzymatically biodegradable soft helical microswimmers. *Advanced Functional Materials*, page 1804107, 2018.

[35] Soichiro Tottori, Li Zhang, Famin Qiu, Krzysztof K. Krawczyk, Alfredo Franco-Obregón, and Bradley J. Nelson. Magnetic helical micromachines : Fabrication, controlled swimming, and cargo transport. *Advanced Materials*, 24(6) :811–816, 2012.

[36] T.-Y. Huang et al. 3D printed microtransporters : Compound micromachines for spatiotemporally controlled delivery of therapeutic agents. *Advanced Materials*, 27 :6644–6650, 2015.

[37] Robert D. Burke, Robert L. Myers, Tracy L. Sexton, and Craig Jackson. Cell movements during the initial phase of gastrulation in the sea urchin embryo. *Developmental Biology*, 146(2) :542–557, 1991.

[38] Alana M. Chin, David R. Hill, Megan Aurora, and Jason R. Spence. Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 66 :81–93, Jun 2017.

[39] Sophia Masterton and Mark Ahearne. Mechanobiology of the corneal epithelium. *Experimental Eye Research*, 177 :122–129, December 2018.

[40] Eleni Palaiologou, Wendy Chiu, Rodolfo Ribeiro de Souza, Patricia Goggin, Emma Lofthouse, Jane Cleal, Anton Page, and Rohan Lewis. High resolution three dimensional imaging of placental villi using serial block face scanning electron microscopy. *Placenta*, 45 :84, September 2016.

[41] Hyun Jung Kim and Donald E. Ingber. Gut-on-a-chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integrative Biology*, 5(9) :1130, 2013.

[42] Yanan Zhang, Peng Wu, Romain Jeantet, Didier Dupont, Guillaume Delaplace, Xiao Dong Chen, and Jie Xiao. How motility can enhance mass transfer and absorption in the duodenum : Taking the structure of the villi into account. *Chemical Engineering Science*, 213 :115406, Feb 2020.

[43] Lotte Bruens, Saskia I.J. Ellenbroek, Jacco van Rheenen, and Hugo J. Snippert. In vivo imaging reveals existence of crypt fission and fusion in adult mouse intestine. *Gastroenterology*, 153(3) :674–677.e3, September 2017.

[44] Herbert F Helander and Lars Fändriks. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 49(6) :681–689, Jun 2014.

[45] Physio Ch 5-4, Les structures de la digestion. http://coproweb.free.fr/pagphy/physioan/ch5s4.htm.

[46] Mariano SH Di Fiore and Ida G Schmidt. *An atlas of human histology*. Number C QM 557. D543 1967. Lea & Febiger Philadelphia, 1967.

[47] Sylvia Anderson Price and Lorraine McCarty Wilson. *Pathophysiology : clinical concepts of disease processes*. McGraw-Hill, New York, 2nd ed. edition, 1982.

[48] The movements of the villi of the small intestine. *Journal of the American Medical Association*, LXIII(24) :2137, December 1914.

[49] C. E. King and Lloyd Arnold. The activities of the intestinal mucosal motor mechanism. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 59(1) :97–121, February 1922.

[50] Yanxing Wang and James G. Brasseur. Three-dimensional mechanisms of macro-to-micro-scale transport and absorption enhancement by gut villi motions. *Physical Review E*, 95(6), June 2017.

[51] Dongeun Huh, Geraldine A. Hamilton, and Donald E. Ingber. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology*, 21(12) :745–754, Dec 2011.

[52] Denise Marrero, Ferran Pujol-Vila, Daniel Vera, Gemma Gabriel, Xavi Illa, Aleix Elizalde-Torrent, Mar Alvarez, and Rosa Villa. Gut-on-a-chip : Mimicking and monitoring the human intestine. *Biosensors and Bioelectronics*, 181 :113156, June 2021.

[53] Justine Creff, Laurent Malaquin, and Arnaud Besson. In vitro models of intestinal epithelium : Toward bioengineered systems. *Journal of Tissue Engineering*, 12 :204173142098520, Jan 2021.

[54] Laurent Pieuchot, Julie Marteau, Alain Guignandon, Thomas Dos Santos, Isabelle Brigaud, Pierre-François Chauvy, Thomas Cloatre, Arnaud Ponche, Tatiana Petithory, Pablo Rougerie, Maxime Vassaux, Jean-Louis Milan, Nayana Tusamda Wakhloo, Arnaud Spangenberg, Maxence Bigerelle, and Karine Anselme. Curvotaxis directs cell migration through cell-scale curvature landscapes. *Nature Communications*, 9(1), Dec 2018.

[55] Caterina Tomba, Valeriy Luchnikov, Luca Barberi, Carles Blanch-Mercader, and Aurélien Roux. Epithelial cells adapt to curvature induction via transient active osmotic swelling. *Developmental Cell*, 57(10) :1257–1270.e5, May 2022.

[56] Dongeun Huh, Benjamin D. Matthews, Akiko Mammoto, Martin Montoya-Zavala, Hong Yuan Hsin, and Donald E. Ingber. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5986) :1662–1668, Jun 2010.

[57] Jong Hwan Sung, Jiajie Yu, Dan Luo, Michael L. Shuler, and John C. March. Microscale 3D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal tract model. *Lab Chip*, 11(3) :389–392, 2011.

[58] Sebastien J.P. Callens, Rafael J.C. Uyttendaele, Lidy E. Fratila-Apachitei, and Amir A. Zadpoor. Substrate curvature as a cue to guide spatiotemporal cell and tissue organization. *Biomaterials*, 232 :119739, February 2020.

[59] Justine Creff, Rémi Courson, Thomas Mangeat, Julie Foncy, Sandrine Souleille, C. Thibault, Arnaud Besson, and Laurent Malaquin. Fabrication of 3D scaffolds reproducing intestinal epithelium topography by high-resolution 3D stereolithography. *Biomaterials*, 221 :119404, November 2019.

[60] S. Kawata, H.-B. Sun, T. Tanaka, and K. Takada. Finer features for functional microdevices. *Nature*, 412 :697, 2001.

[61] Irène Wang, Michel Bouriau, Patrice L. Baldeck, Cécile Martineau, and Chantal Andraud. Three-dimensional microfabrication by two-photon-initiated polymerization with a low-cost microlaser. *Opt. Lett.*, 27(15) :1348–1350, Aug 2002.

[62] Kwang-Sup Lee, Ran Hee Kim, Prem Prabhakaran, Dong-Yol Yang, Tae Woo Lim, and Sang Hu Park. Two-photon stereolithography. *Journal of Nonlinear Optical Physics & Materials*, 16(01) :59–73, March 2007.

[63] Vassilis Karageorgiou and David Kaplan. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27) :5474–5491, 2005.

[64] Sang Hu Park, Tae Woo Lim, Dong-Yol Yang, Hong Jin Kong, Joo Yeon Kim, and Kwang-Sup Lee. Direct laser patterning on opaque substrate in two-photon polymerization. *Macromolecular Research*, 14(2) :245–250, Apr 2006.

[65] Arseniy I. Kuznetsov, Andrey B. Evlyukhin, Manuel R. Gonçalves, Carsten Reinhardt, Anastasia Koroleva, Maria Luisa Arnedillo, Roman Kiyan, Othmar Marti, and Boris N. Chichkov. Laser fabrication of large-scale nanoparticle arrays for sensing applications. *ACS Nano*, 5(6) :4843–4849, 2011. PMID : 21539373.

[66] S. Rekštytė, T. Jonavičius, and M. Malinauskas. Direct laser writing of microstructures on optically opaque and reflective surfaces. *Optics and Lasers in Engineering*, 53 :90–97, 2014.

[67] Emely Marie Harnisch, Tommy Venek, Svenja Nohr, Niels König, and Robert Schmitt. Temperature calculation in metal substrates during two-photon polymerization. *Optical Materials Express*, 9(1) :269, Jan 2019.

[68] Qin Hu, Graham A. Rance, Gustavo F. Trindade, David Pervan, Long Jiang, Aleksandra Foerster, Lyudmila Turyanska, Christopher Tuck, Derek J. Irvine, Richard Hague, and Ricky D. Wildman. The influence of printing parameters on multi-material two-photon polymerisation based micro additive manufacturing. *Additive Manufacturing*, 51 :102575, March 2022.

[69] Sascha Engelhardt. 3d-microfabrication of polymer-protein hybrid structures with a Q-switched microlaser. *Journal of Laser Micro/Nanoengineering*, 6(1) :54–58, Mar 2011.

[70] Sascha Engelhardt, Eva Hoch, Kirsten Borchers, Wolfdietrich Meyer, Hartmut Krüger, Günter E M Tovar, and Arnold Gillner. Fabrication of 2D protein microstructures and 3D polymer–protein hybrid microstructures by two-photon polymerization. *Biofabrication*, 3(2) :025003, Jun 2011.

[71] Frederik Mayer, Stefan Richter, Johann Westhauser, Eva Blasco, Christopher Barner-Kowollik, and Martin Wegener. Multimaterial 3D laser microprinting using an integrated microfluidic system. *Science Advances*, 5(2), February 2019.

[72] J. J. Croat, J. F. Herbst, R. W. Lee, and F. E. Pinkerton. High-energy product Nd-Fe-B permanent magnets. *Applied Physics Letters*, 44(1) :148–149, Jan 1984.

[73] M. Sagawa, S. Fujimura, N. Togawa, H. Yamamoto, and Y. Matsuura. New material for permanent magnets on a base of Nd and Fe. *Journal of Applied Physics*, 55(6) :2083–2087, Mar 1984.

[74] T.G. Woodcock, Y. Zhang, G. Hrkac, G. Ciuta, N.M. Dempsey, T. Schrefl, O. Gutfleisch, and D. Givord. Understanding the microstructure and coercivity of high performance NdFeB-based magnets. *Scripta Materialia*, 67(6) :536–541, Sep 2012.

[75] Ormocomp datasheet from the Microresist website. https://www.microresist.de/en/?jet_download=2477.

[76] Olivier Stephan and Laetitia Gredy. Composition photosensible activable par absorption multiphotonique pour fabrication tridimensionnelle. (FR3049606B1), 2018.

[77] Magnetic powder datasheet (MQP-S-11-9-20001), from the magnequench website. https://mqitechnology.com/product/mqp-s-11-9-20001/?pname=MQP-S-11-9&ppart=20001.

[78] Tomasz Skrzypek, Jose Valverde Piedra, Henryk Skrzypek, Jarosław Woliński, Waldemar Kazimierczak, Sylwia Szymanczyk, Marta Pawlowska, and Romuald Zabielski. Light and scanning electron microscopy evaluation of the postnatal small intestinal mucosa development in pigs. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 56 Suppl 3 :71–87, 07 2005.

[79] Kan Yue, Grissel Trujillo de Santiago, Mario Moisés Alvarez, Ali Tamayol, Nasim Annabi, and Ali Khademhosseini. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*, 73 :254–271, December 2015.

[80] Sanjay Govindjee. *Engineering Mechanics of Deformable Solids*, chapter 8, Bending of beams. Oxford University Press, October 2012.

[81] Charalampos Schizas and Dimitris Karalekas. Mechanical characteristics of an Ormocomp® biocompatible hybrid photopolymer. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(1) :99 – 106, 2011.

[82] H G Hall, D A Farson, and M J Bissell. Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay : a morphogenetic model in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(15) :4672–4676, August 1982.

[83] Lucy Erin O'Brien, Mirjam M. P. Zegers, and Keith E. Mostov. Building epithelial architecture : insights from three-dimensional culture models. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(7) :531–537, July 2002.

[84] Rostislav Grechishkin, Sergey Chigirinsky, Mikhail Gusev, Orphée Cugat, and Nora M. Dempsey. Magnetic Imaging Films. In *Magnetic Nanostructures in Modern Technology*, pages 195–224. Springer Netherlands, 2008.

[85] L.A. Dorosinskii, M.V. Indenbom, V.I. Nikitenko, Yu.A. Ossip'yan, A.A. Polyanskii, and V.K. Vlasko-Vlasov. Studies of HTSC crystal magnetization features using indicator magnetooptic films with in-plane anisotropy. *Physica C : Superconductivity*, 203(1) :149–156, 1992.

[86] Datasheet du marqueur Bic Mark-it. https://content.oppictures.com/master_images/master_pdf_files/bicgpm11rd_sds.pdf.

Résumé

Les micro-robots magnétiques sont des structures 3D de taille inférieure au millimètre à actionnement magnétique, d'intérêt croissant pour des applications biologiques. Ici, nous nous intéressons au développement et à l'impression 3D de micro-robots magnétiques grâce à la polymérisation à deux photons pour la manipulation de cellules à distance.

Deux sujets principaux ont été étudiés au cours de cette thèse. Tout d'abord, on cherche à développer un substrat de culture cellulaire imitant la paroi intestinale afin d'étudier la réponse de cellules à des changements de courbure. Pour ce faire, on imprime une micro-structure hybride que l'on déforme par actionnement magnétique. L'hybridation de deux matériaux dans la structure même permet de tirer avantage de leur propriétés respectives : le squelette interne est en Ormocomp (résine polymère), il apporte une structure stable, l'enveloppe en gélatine-collagène est souple et permet la culture de cellules. Enfin, on accroche une bille de NdFeB permettant de déformer la structure dans un champ magnétique.

Par ailleurs, la méthode de fabrication originelle de nos micro-robots ne permet pas l'impression en grand nombre car les billes sont réparties aléatoirement sur le substrat. Pour l'améliorer, il faut pré-positionner les billes, pour pouvoir automatiser le processus de fabrication. On a donc fabriqué des pièges magnétiques permettant de placer les billes à des endroits choisis. L'impression sur ces pièges à billes métalliques est plus complexe que l'impression habituelle sur verre : en optimisant la puissance du laser et en ajoutant un traitement de surface sur les substrats, nous avons développé une méthode d'impression sur substrats opaques et réfléchissants.

Abstract

Magnetic microrobots are magnetically actuated sub-millimeter 3D structures of increasing interest for biological applications. Here, we are interested in the development and 3D microprinting of magnetic microrobots using two-photon polymerization for remote cell manipulation.

Two main topics have been studied during this thesis. First, we aim to develop a cell culture substrate mimicking the intestinal wall in order to study the response of cells to changes in curvature. To do so, we print a hybrid micro-structure which is deformed by magnetic actuation. The hybridization of two materials in the structure itself allows to take advantage of their respective properties : the internal skeleton is made of Ormocomp (polymer resin), it brings a stable structure, the envelope made of gelatin-collagen is flexible and allows the culture of cells. Finally, a NdFeB bead is attached to the skeleton to deform it in a magnetic field.

Moreover, the original manufacturing method of our micro-robots does not allow the printing in large numbers because the beads are randomly distributed on the substrate. To improve it, we need to pre-position the beads, in order to automate the manufacturing process. Therefore, magnetic traps have been made to place the beads at selected locations. Printing on these metal bead traps is more complex than the usual printing on glass : by optimizing the laser power and adding a surface treatment on the substrates, we have developed a method of printing on opaque and reflective substrates.