

PSE BIOPRINTING

Protocoles et Méthodes

Réalisation de l'imprimante :

Réalisation de la plaque XY :

Pour réaliser la plaque XY, on utilise des **pièces de Make-block** nous permettant de réaliser deux plaques mouvantes une selon X et une selon Y placée sur la première et perpendiculairement à celle-ci. Chacune des deux plaques est constituée d'une plaque en plexiglas sur laquelle sont fixées parallèlement deux tiges métalliques. Chaque tige coulisse sur deux poulies. Les quatre poulies sont fixées sur un bâti composé de pièces métalliques Make-Block en forme de U. La plaque se déplace à l'aide d'une courroie fixée à la **plaque de plexiglas** avec une **colle forte**. La courroie, placée parallèlement à la **tige métallique**, est entraînée par deux roues dentées. Une des deux roues dentées est entraînée par un **moteur pas à pas** de référence 42BYGHW609D4P1-X3 1,7 A 1,8° (coût unitaire de 31 €). Ce système est réalisé deux fois et la seconde plaque plus petite, est fixée à l'aide de vis sur la première plaque. Les axes de translation des deux plaques sont à 90°. Les moteurs sont contrôlés par une **carte Arduino Uno** (20€) et ils sont branchés sur les entrées 1 et 2 à l'aide d'un pont en H. Le programme de déplacement des plaques est réalisé sur ordinateur à l'aide du logiciel Arduino. Le programme est ensuite téléversé sur la carte Arduino Uno à l'aide d'un câble USB. Une fois que le programme est téléversé on débranche la carte de l'ordinateur et on la branche à un **système d'alimentation de 4 piles AA**. La plaque de translation XY obtenue nous permet un déplacement minimal selon X et Y de 0,17 mm.

→ Coût total de la plaque XY : Une centaine d'euros

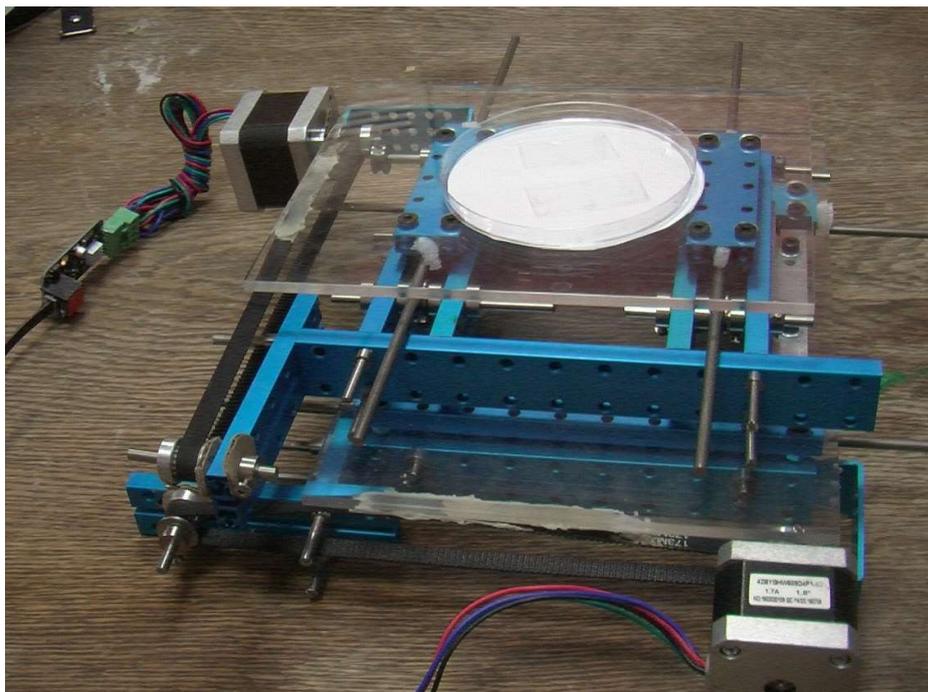


Figure 1. Plaque de translation XY

Réalisation de la tête d'imprimante :

On réalise une **tête d'imprimante cylindrique à base de Dural** comportant une cavité de 15.5 mm de diamètre en largeur et de 6.6 mm de hauteur. Sur cette cavité est fixé un **transducteur piézoélectrique** (RS, Code commande RS 622-1427, Référence fabricant: KPEG006, diamètre de 22,5mm, prix unitaire: 1,92 €). Le piézoélectrique doit être détaché précautionneusement de l'armature principale. Ce transducteur piézoélectrique ferme la cavité de manière étanche à l'aide d'un couvercle appuyant dessus et vissé sur le bas du cylindre. La pièce complète constituant la tête fait 45 mm de diamètre et 17 mm de hauteur. L'arrivée de liquide dans la cavité se fait par un canal transverse. Le bas de la cavité est prolongé d'un cylindre de 13,2 mm de diamètre ayant un trou de 1,4 mm de diamètre en son centre. Ce cylindre est amovible et nous permet de changer facilement la buse de sortie (sa taille, le type de matériau ...). La buse de sortie que nous utilisons est un **tube de Téflon de 300 µm de diamètre interne** et de longueur entre 1 et 2 cm. Il est inséré de manière à ne dépasser que de 2 mm de notre tête. La tête d'imprimante est munie d'un système de refroidissement qui est un canal cylindrique de largeur 7,3 mm entourant la cavité (pour les plans détaillés de la tête d'imprimante, voir annexe). Une fois que le transducteur piézoélectrique a été placé et les vis disposées, on utilise le mélange d'un **polymère et de son catalyseur** (*Elite double 32 vinyl polysiloxane et le « catalyst » correspondant* tous deux produits par *Zhermack*). Le mélange 1:1 en masse de ces deux produits permet la formation d'une pâte qui durcit en une vingtaine de minutes. On dispose cette pâte au niveau de la buse de sortie et du cylindre de Téflon pour éviter toute fuite et garantir l'étanchéité, ainsi que sur la partie supérieure de la tête au niveau du piézoélectrique.

→ Pour cette partie, il faut avoir accès à des machines spécifiques permettant la réalisation de la tête aux dimensions souhaitées, il est donc difficile d'évaluer le coût global de cette partie du montage.

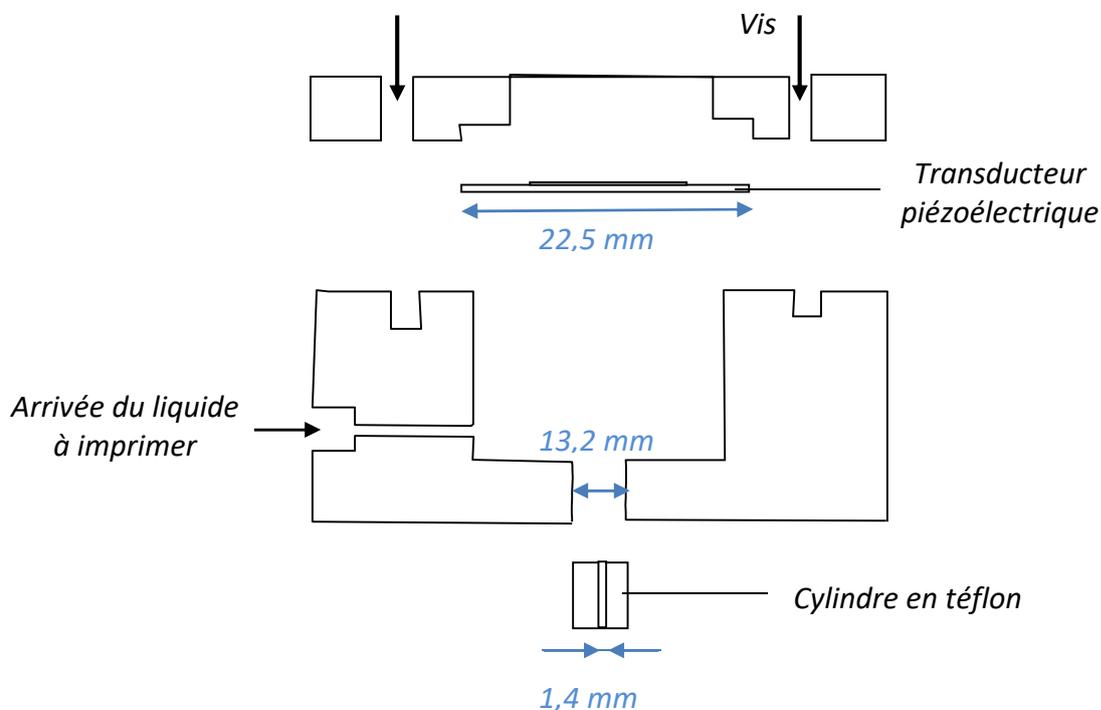


Figure 2. Schéma simplifié de la tête d'imprimante sans la circulation d'eau glacée

Réalisation d'un gel de collagène :

Le gel de collagène est réalisé à partir d'une **solution de collagène de type I, issu de tendons de queue de rat**. Nous avons utilisé deux produits fournis par Corning possédant des concentrations différentes mais ayant une formulation similaire : *Corning® Collagen I, High Concentration, Rat Tail, 100mg (Product #354249)* (concentration variant de 8 à 11 mg/mL et indiquée sur le produit) et *Corning® Collagen I, Rat Tail, 100mg (Product #354236)* (concentration de 3-4 mg/mL). Le collagène est fourni, pour ces deux produits, dans une solution aqueuse ayant une concentration molaire en acide acétique de 0,02 M et il doit être stocké au réfrigérateur, pour éviter la formation de fibres de collagène dans la bouteille de stockage. Les deux produits ont un coût respectif de 200 et 250 euros environ.

Le collagène de type I est ensuite dilué dans une **solution de PBS 1x** à une concentration de 0,9 à 1 mg/mL. La solution de PBS 1x (solution tampon permettant de maintenir un pH neutre) doit elle aussi être maintenue au réfrigérateur avant la dilution, pour éviter une polymérisation du collagène au moment du mélange. On réalise alors un dépôt de 50 µL sur une **lame de verre** à l'aide d'une **micropipette**. La lame de verre a été préalablement placée dans une boîte de Pétri dont les bords sont bordés de papier humide. Une fois le dépôt effectué, on referme la **boîte de Pétri** puis on l'étanchéfie à l'aide de **Parafilm** que l'on place tout autour de la boîte. La boîte est ainsi étanche et la présence de papier mouillé dans la boîte va permettre le maintien d'une atmosphère humide. Cette atmosphère humide permet d'éviter la formation de cristaux de PBS avant que le collagène n'ait formé de fibres. La boîte de Pétri étanche obtenue est ensuite placée dans un bain marie à 37°C pour favoriser la polymérisation du collagène. Après environ 1h, on retire la boîte du bain marie et on l'ouvre. On observe que la goutte au préalable translucide et liquide, a une apparence opaque plus laiteuse et ne coule plus. Le collagène a donc bien formé un gel. Pour vérifier la présence du gel de collagène, on ajoute une solution de **Picrosirius** sur la goutte afin de réaliser un bain. On attend 20 minutes, puis on rince doucement et à plusieurs reprises à l'aide d'une pipette contenant de l'eau distillée. Il faut faire très attention durant cette étape à ce que le gel ne se décolle pas de la lame de verre. Une fois que le rinçage est terminé, on constate que notre goutte contenant le collagène a pris une teinte rosée. Cela confirme donc la formation d'un gel de collagène. En effet, le Picrosirius se fixe le long des fibres de collagène uniquement. On observe également le gel obtenu à l'aide d'un microscope optique, pour observer l'aspect granuleux caractéristique d'un gel de collagène (figure 3).

→ Coût total du protocole de réalisation du gel de collagène: 200-300 euros

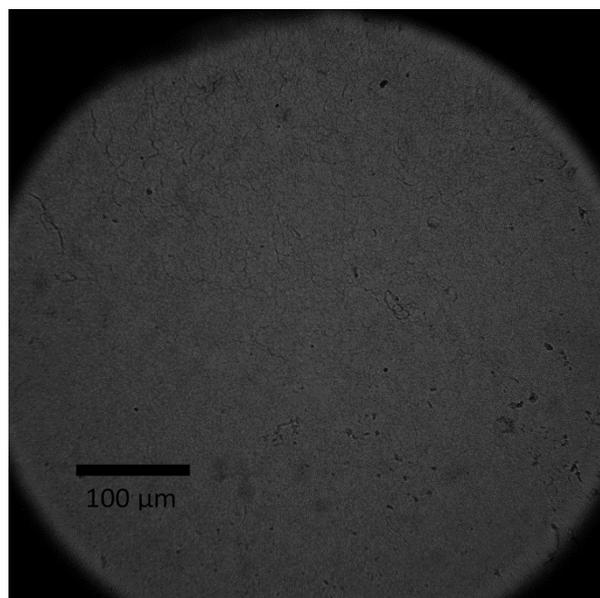


Figure 3. Gel de collagène, obtenu sous atmosphère humide et après ajout de Picrosirius, observé au microscope optique

Montage final :

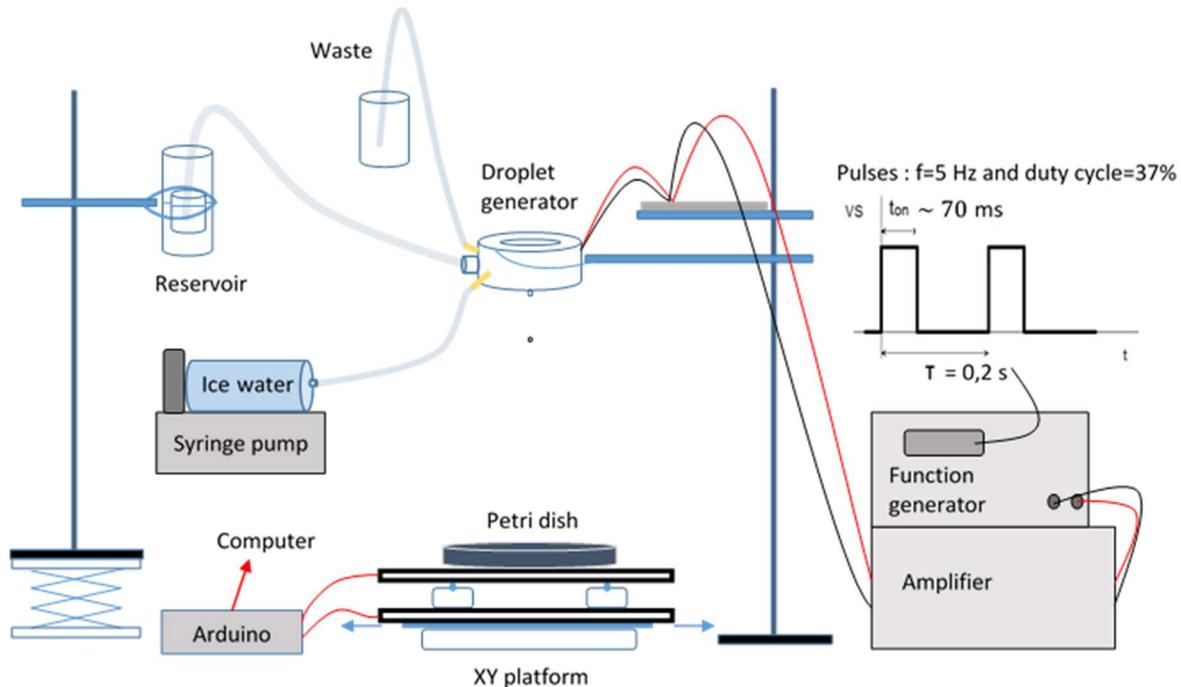
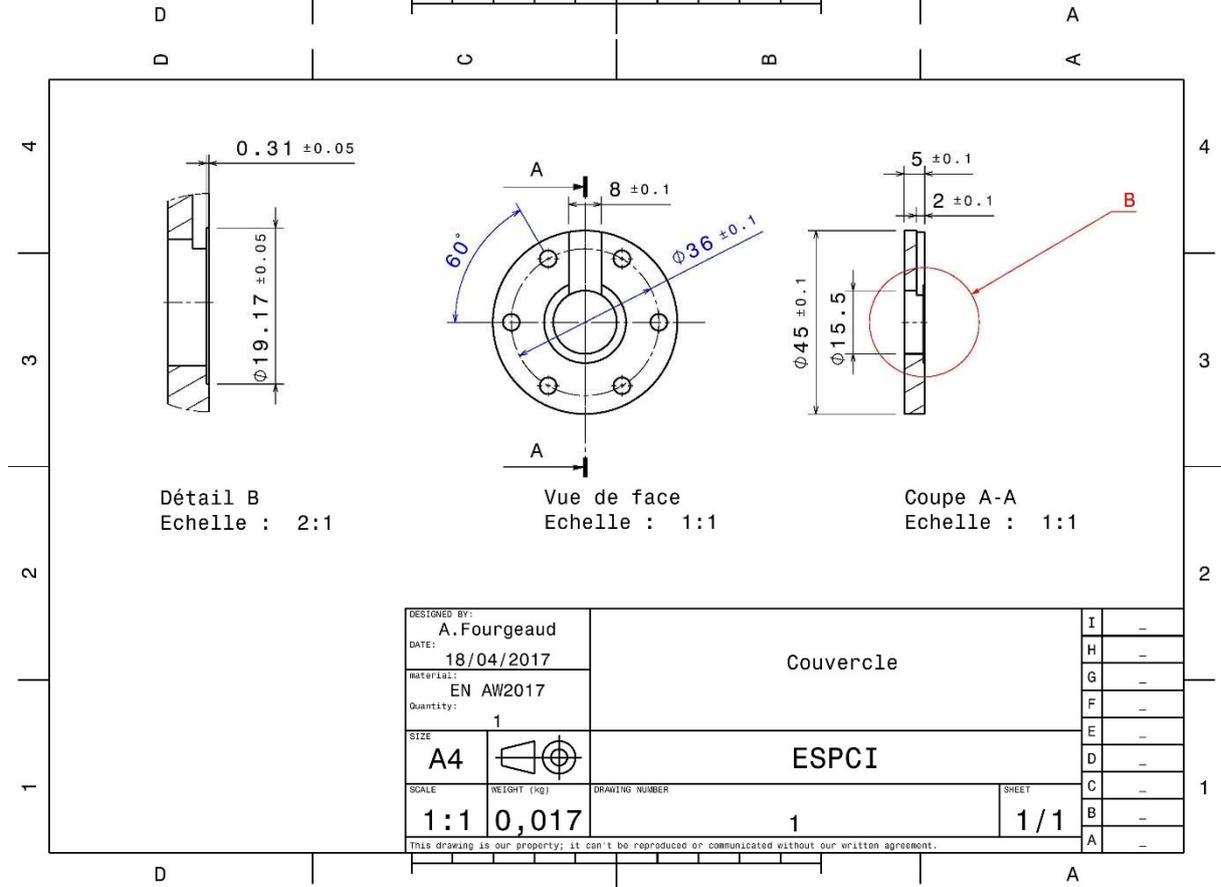
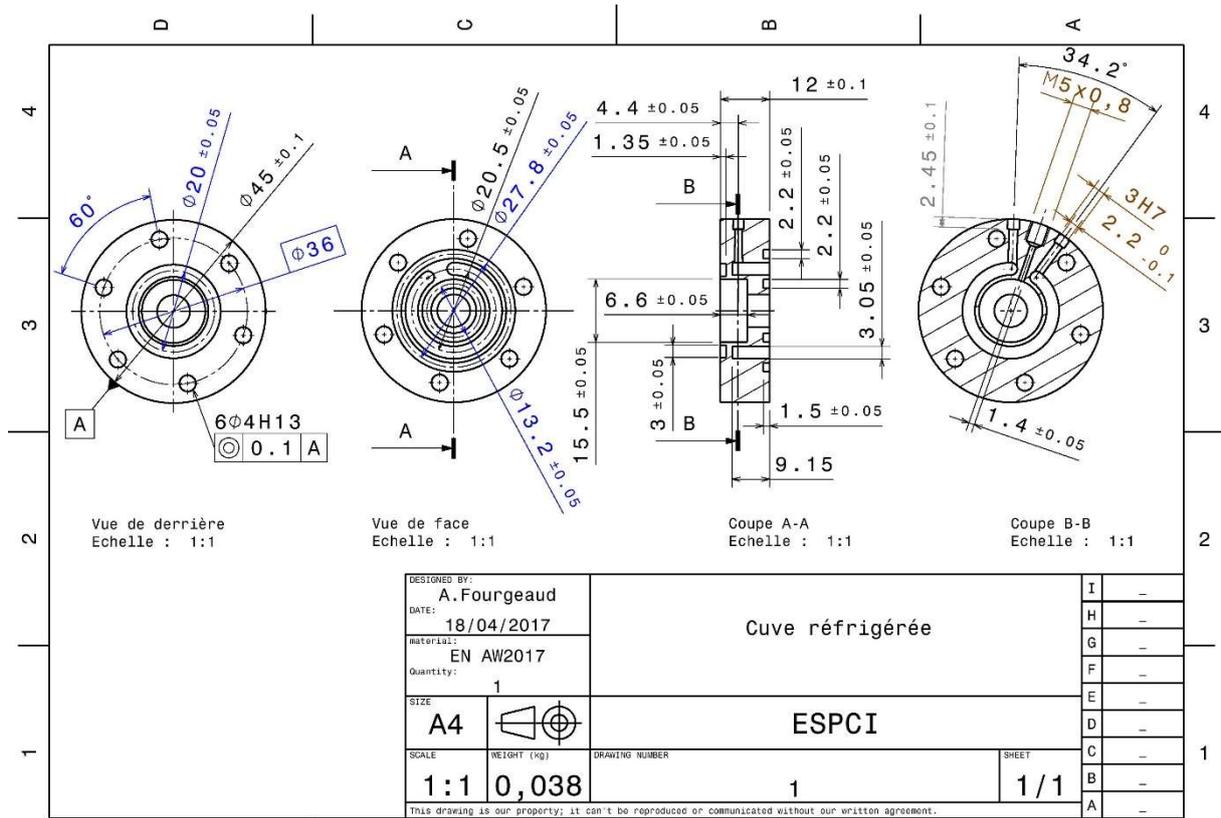
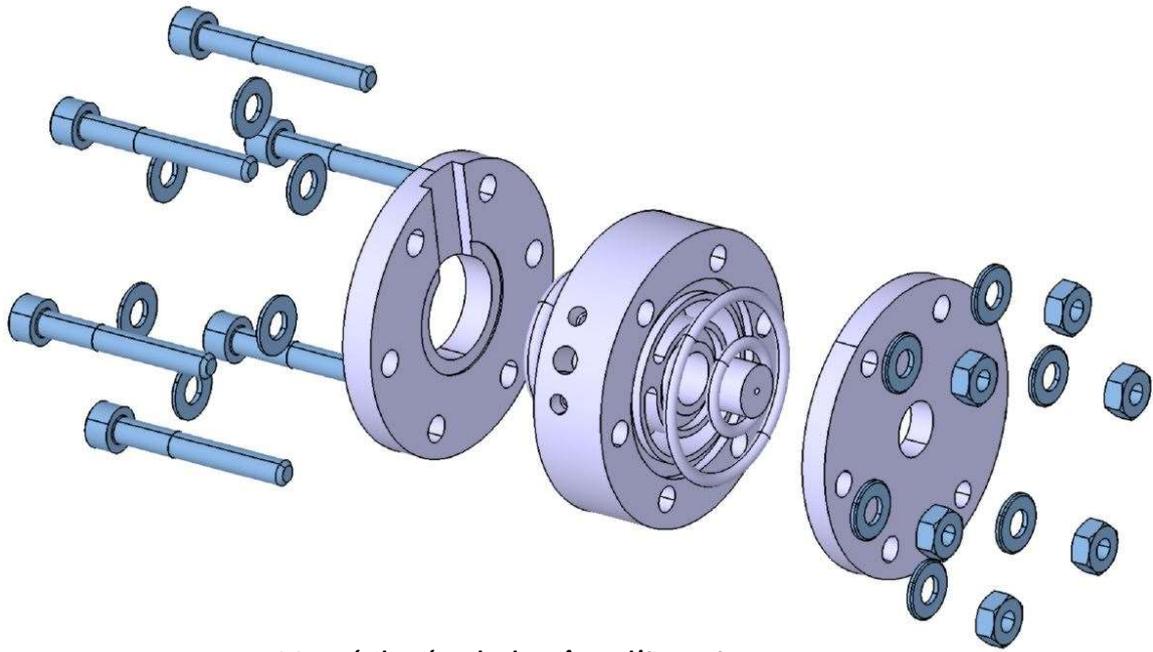


Figure 4. Schéma global du bioprinter

On commence par remplir la cavité de la tête d'imprimante en insérant le liquide que nous voulons imprimer à l'aide d'une seringue et d'un tuyau. On retourne la tête vers le haut en continuant à appuyer sur la seringue pour faire sortir le liquide et ainsi s'assurer qu'il n'y a pas de bulles d'air formées dans la cavité. On place ensuite l'extrémité du tuyau dans le réservoir en s'assurant de ne pas avoir formé de bulles d'air dans le tuyau. Le remplissage de la cavité se fera alors par pression hydrostatique. Puis, on réalise un réglage fin à l'aide de la plaque de translation verticale du réservoir de sorte à obtenir la différence de hauteur minimale entre la buse de la tête d'imprimante et le niveau du réservoir sans que la goutte ne tombe. La goutte est alors à la limite de tomber. On allume alors le **générateur basse fréquence** (*RIGOL DG1022*, prix : environ 400 €) qui émet des impulsions à une fréquence de 5 Hz et avec un duty cycle de 37%. Ce signal est amplifié par un **amplificateur** (*TIRA power amplifier type BAA 500*, prix: plus de 1000 €, partie la plus chère du montage) jusqu'à une tension de 40 V. C'est ce signal qui alimente le piézoélectrique. Le piézoélectrique est placé au-dessus de la cavité remplie de liquide et génère une goutte identique à chaque impulsion. La goutte tombe sur la plaque XY en mouvement qui dessine la forme souhaitée. Nous avons réussi à faire fonctionner ce système avec de l'eau mais nous n'avons pas réussi à le faire fonctionner de façon fiable et efficace avec notre solution de collagène. Cependant, le montage réalisé est adaptable à une utilisation avec notre solution de collagène. En effet, le système de refroidissement à l'aide d'eau glacée et alimenté par le **pousse-seringue** permet de maintenir une température proche de 0°C dans la tête d'imprimante. De plus, le réservoir est également maintenu à 0°C à l'aide d'un bain d'eau glacée. Le maintien à une température proche de 0°C permet d'empêcher la polymérisation de la solution de collagène dans le PBS pendant quelques heures ce qui nous laisserait le temps d'imprimer la matrice de collagène souhaitée. Une fois le dépôt de collagène réalisé, on pourrait alors appliquer directement le protocole de réalisation du gel de collagène développé ci-dessus.

ANNEXES





Vue éclatée de la tête d'imprimante