HAL open science

Microenvironnements pour l'analyse biologique et l'ingéniérie des tissus

Laurent Malaquin

To cite this version:

Laurent Malaquin. Microenvironnements pour l'analyse biologique et l'ingéniérie des tissus. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), 2018. tel-01942805

HAL Id: tel-01942805

https://laas.hal.science/tel-01942805v1

Submitted on 30 Jan 2019

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.

Université de Toulouse

UNIVERSITE DE TOULOUSE III

MÉMOIRE

D'HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

Microenvironnements pour l'analyse biologique et l'ingéniérie des tissus

« De la microfluidique à la Bioimpression 3D »

Soutenue le 31 janvier 2018 par

Laurent Malaquin

Jury :

Dr. Marie Caroline Jullien, ESPCI IPGG, Paris	Rapporteur
Dr. Séverine le Gac, Université de Twente, Enschede (Pays Bas)	Rapporteur
Pr. Olivier Français, ESIEE, Noisy le Grand	Président
Dr. Clément Nizak, ESPCI, Paris	Examinateur
Pr. Louis Casteilla, STROMAlab, Toulouse	Examinateur
Dr. Georges Landa, LAAS CNRS, Toulouse	Examinateur
Pr. Christophe Vieu, LAAS CNRS, Toulouse	Invité

Sommaire

A . Introduction 11

B . Bilan Scientifique 15

B.1 Introduction 15

B.2 Capture et analyse de cellules tumorales circulantes 16

B.3 Lit fluidisé microfluidique : application à la préconcentration de biomarqueurs 21

B.3.1 Préconcentration de biomarqueurs 22

B.3.2 Application à la capture de bactéries. 26

B.4 Microfluidique digitale et pinces magnétiques : application à l'analyse de biomarqueurs 28

B.4.1 Application à l'immunodosage par ELISA 30

B.4.2 Application à l'immunodosage par agglutination 31

B.4.3 Application à la RT q PCR 32

B.4.4 Application à l'immunoprécipitation de la chromatine 32

B.4.5 Evolutions technologiques : Miniaturisation et guidage magnétique 33

B.5 Micro et nanotechnologies pour la microfluidique 34

B.5.1 Utilisation des matériaux thermoplastiques pour la microfluidique 35

B.5.2 Microstructuration et fonctionnalisation de surface 37

C . Projets de Recherche 41

Préambule 41

C.1 Axe de recherche 1 : Développement des technologies d'impression et de bioimpression 3D 44

C.1.1 Contexte et objectifs 44

C.1.2 Impression 3D haute résolution pour la fabrication de microsystèmes 47

C.1.3 BioImpression 3D pour le développement de modèles de tissus fonctionnels 51

C.2 Axe de recherche N°2 : Modèles 3D de Microenvironnements cellulaires la cancérologie et la médecine régénérative 61

C.2.1 Préambule 61

C.2.2 Le rôle du microenvironnement dans la physiopathologie de l'instestin : modélisation de la niche tumorale. 62

C.2.3 Le rôle du microenvironnement sur le développement des cellules souches dans la moelle osseuse. 66

C.3 Axe de recherche N°3 : Microfluidique et vascularisation 71

C.3.1 Contexte : Le modèle Nativeskin 72

C.3.2 Systèmes microfluidiques implantables 74

Bibliographie 78

Curriculum Vitae 85

ANNEXE I : Travaux de Doctorat « *Dispositifs ultra-sensibles pour le Nano-Adressage électrique. Application à la détection de Biomolécules » LAAS CNRS (2000-2004)* 100

ANNEXE II : Travaux de Post-Doctorat « *Assemblage dirigé de nanoparticules et applications » IBM Research Laboratory – Zurich (2004 –2006)* 103

« *Intégration de nanoparticules pour l'optique et la microfluidique» LPN CNRS – Marcoussis (2007- 2008)* 108

ANNEXE III : *Sélection de 5 publications* 111

A . Introduction

Préambule

J'ai débuté mes travaux de recherche dans le vaste monde des nanosciences et nanotechnologies dans le cadre de la thèse que j'ai effectué au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes LAAS-CNRS à Toulouse. Ces travaux, bien qu'étant principalement focalisés sur l'utilisation d'outils avancés de nanolithographie issus des technologies silicium, ont été pour moi le point de départ d'une évolution progressive et d'un intérêt sans cesse grandissant pour les questions biologiques et la médecine. Mes travaux de post doctorat, tout d'abord en Suisse dans le laboratoire d'IBM Zurich (Suisse) puis au LPN (Laboratoire de Photonique et de Nanosctructures) à Marcoussis (France), m'ont progressivement amené vers l'utilisation des technologies microfluidiques pour l'étude et l'analyse du vivant. Cette thématique a constitué le cœur de mon activité pendant 8 ans au sein du laboratoire de Physico Chimie de l'Institut Curie au sein duquel j'ai été recruté en tant que chargé de recherche CNRS. La notion de microenvironnement biologique est apparue progressivement au cours de mes travaux et elle est devenue la ligne directrice de mes activités. La microfluidique permet de créer des dispositifs miniaturisés que l'on peut considérer comme des microenvironnements propices à la manipulation de liquides biologiques, à leur traitement à des fins de détection et d'analyse ou encore l'étude de la prolifération cellulaire et de tissus vivants . C'est dans cette dernière voie que je souhaite orienter mes travaux futurs au sein du LAAS CNRS, que j'ai rejoins en 2015 afin d'aborder des enjeux majeurs dans le domaine de l'oncologie et de la médecine régénérative.

Ce manuscrit comprend deux parties: la première dressera un bilan de mes travaux antérieurs, depuis mon intégration à l'institut Curie en 2007 jusqu'à mon départ en 2015. La deuxième partie sera consacrée aux projets de recherche que j'ai mis en place depuis 2015 au LAAS CNRS.

Partie I - Bilan scientifique « Dispositifs microfluidique pour l'analyse biologique et le diagnostic »

La première partie du manuscrit est dédiée aux travaux de recherches que j'ai effectué depuis mon recrutement en tant que chargé de recherche CNRS à l'Institut Curie – UMR168 à Paris en 2007. Ces projets ont été principalement orientés vers le développement de nouvelles technologies et concepts microfluidiques pour mettre au point des dispositifs miniaturisés d'analyse (pré-concentration, capture et analyse de biomarqueurs, …) ou de diagnostic innovants (capture de cellules rares, …). Les applications visées ont été très larges, depuis la capture de cellules tumorales circulantes (CTCs), vers l'analyse de biomarqueurs protéiques, la détection de mutations génétiques et plus récemment jusqu'à la détection et la culture sur puce de bactéries. La Figure 1 donne une vision synthétique de mes principales activités durant cette période.

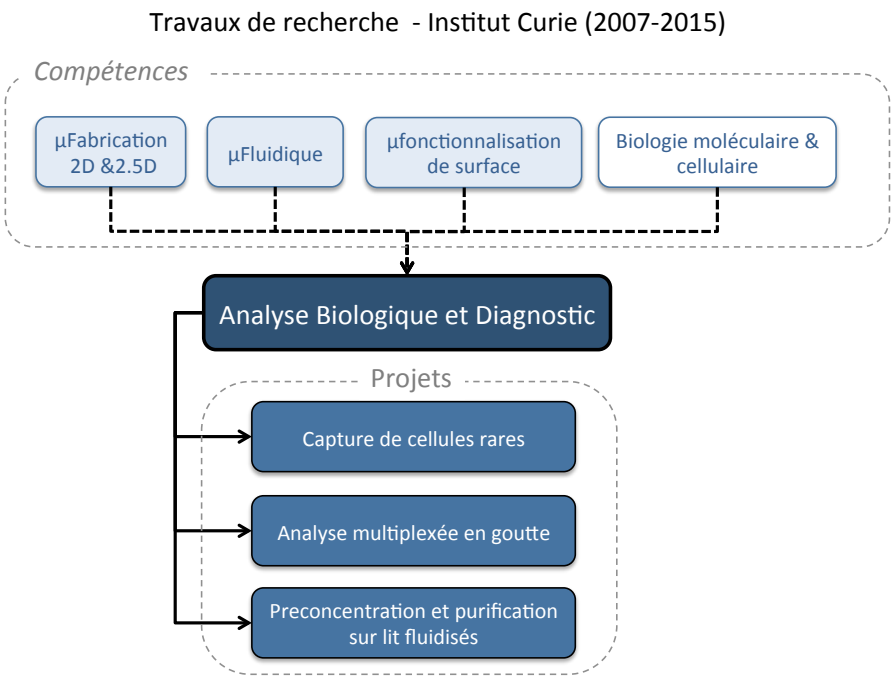


Figure 1 . Description de mes activités de recherche au sein du groupe MMBM de l'institut Curie UMR 168 (période 2007-2015)

Une partie importante de cette activité a été transversale : elle a été consacrée au développement de nouveaux matériaux et procédés de fabrication pour la réalisation de dispositifs microfluidiques. Ce travail reposait en partie sur mes compétences et mon expérience dans le domaine des micro et nano technologies et il m'a permis d'élargir ces compétences en physico chimie, notamment dans les domaines de l'hydrodynamique, du magnétisme, du mouillage et des mécanismes d'auto-assemblage. Mais au delà de ces aspects technologiques, cette expérience au sein de l'institut Curie a surtout été pour moi une formidable aventure dans le monde de la biologie et de la recherche translationnelle. Comprendre les questions biologiques, assimiler les enjeux médicaux, prendre en compte les contraintes économiques et sociales autour de ces applications ont été des préoccupations constantes à la base de mon travail de recherche. Ainsi l'ensemble des technologies et concepts que j'ai pu développer ont été optimisés et le plus souvent possible conçus pour répondre à un besoin biologique identifié, en intégrant très tôt, dès la phase de conception, toutes les contraintes liées au contexte biologique, clinique mais aussi les contraintes de mise en œuvre, de rapidité, de reproductibilité, d'accessibilité au plus grand nombre, de coût … ce contexte étant variable d'une application à l'autre. Cette démarche est complexe, longue et elle explique en partie toute les difficultés que rencontre la microfluidique et les laboratoires sur puce pour atteindre un stade de maturité suffisant et une utilisation en routine au niveau biomédical. Cette démarche illustre également la nécessité d'intégrer dans un même projet des compétences très larges en technologie, physique, chimie et bien sûr en biologie.

L'institut Curie a été pour moi un formidable terrain d'apprentissage de l'interdisciplinarité. Depuis la création de l'Institut du Radium par Marie Curie, ce laboratoire n'a eu de cesse de montrer tout l'intérêt du couplage des outils et concepts issus de la physique et de la chimie pour répondre à des questions biologiques. La synergie et l'expérience que j'ai eu la chance de partager au sein de l'équipe MMBM (Microsys-

tèmes et Macromolécules pour la Biologie et la Médecine) aux cotés de JL. Viovy et Stéphanie Descroix mais aussi de partenaires cliniciens ont été des démonstrations évidentes des vertus de l'interdisciplinarité.

Partie II - Projets de recherche « Microenvironnements pour l'ingénierie des tissus »

Le projet de recherche que je mets en place depuis mon arrivée au LAAS CNRS en 2015 s'inscrit dans la même démarche interdisciplinaire. Ce projet aura pour ambition de développer de nouvelles technologies de micro et nanofabrication pour la fabrication de modèles de microenvironnements cellulaires et de tissus. Ce projet reprendra l'ensemble des compétences que j'ai pu acquérir tout au long de mon parcours. Il trouve sa motivation dans l'expérience que j'ai pu acquérir autour de techniques d'analyse et de diagnostic du cancer qui m'ont amenées peu à peu à m'intéresser à la compréhension des mécanismes à la base de la prolifération tumorale et de l'homéostasie des tissus. Comme nous le verrons dans l'axe de recherche n°2 de mon projet de recherche, ces mécanismes sont étroitement liés au microenvironnement cellulaire, c'est à dire aux interactions entre les cellules d'un tissu et l'environnement physico chimique et biologique dans lequel elles évoluent. La fabrication de modèles mimétiques, permettant de recréer les paramètres essentiels du microenvironnement, est un devenu enjeu majeur en biologie et en médecine.

De nombreux travaux ont été reportés quant au développement de techniques de structuration et de fonctionnalisation de surface permettant l'adhésion et la croissance cellulaire. Les méthodes utilisées sont généralement basées sur des techniques de structuration chimique et biologique de surface (Micro contact Printing, Lithographie, moulages de matrice, etc). La plupart de ces approches restent malheureusement limitées à la fabrication de structures en deux dimensions qui ne correspondent généralement pas à l'environnement de croissance naturel à trois dimensions des cellules et qui induisent des contraintes modifiant très sensiblement leur comportement. Les récentes avancées de la microfluidique dans le domaine des Organes sur puces ont permis la création de dispositifs de cultures cellulaires qui présentent de nombreux avantages en terme de contrôle des paramètres environnementaux et de parallélisation. Néanmoins, la microfluidique reste encore limitée à des technologies de fabrication planaires qui peinent à recréer un environnement cellulaire physiologique qui est par nature tridimensionnel.

Mes compétences dans les technologies de micro et nanofabrication m'ont assez naturellement poussé à m'intéresser aux technologies de fabrication 3D qui constituent un nouveau paradigme dans le domaine des micro et nanosystèmes. L'impression 3D et la bioimpression notamment permettent de mettre en forme des matériaux mimant la matrice extracellulaire et d'y intégrer des cellules vivantes pour créer des modèles 3D de tissus. Cette technologie sera développée dans un premier axe de recherche transversal qui viendra en soutien de deux autres axes applicatifs: l'un permettra de développer des modèles de tissus mimétiques de l'intestin et de l'os afin d'étudier les mécanismes de prolifération cancéreuse et de régénération tissulaire. L'autre, plus prospectif, a pour vocation de développer des systèmes vasculaires artificiels permettant d'assurer la viabilité à long terme de modèles de tissus. Ces trois axes de développement sont étroitement liés et ont pour vocation de converger à moyen terme vers la création de nouveaux de modèles biomimétiques de microenvironnements reproduisant l'architecture 3D et l'hétérogénéité des tissus humains avec une résolution à l'échelle de la cellule individuelle. Je souhaite que ces modèles deviennent de nouveaux outils d'étude standardisés, outils qui font encore défaut en biologie et en médecine. La Figure 2 donne une vision schématique de la structure des projets en cours de développement au LAAS CNRS.

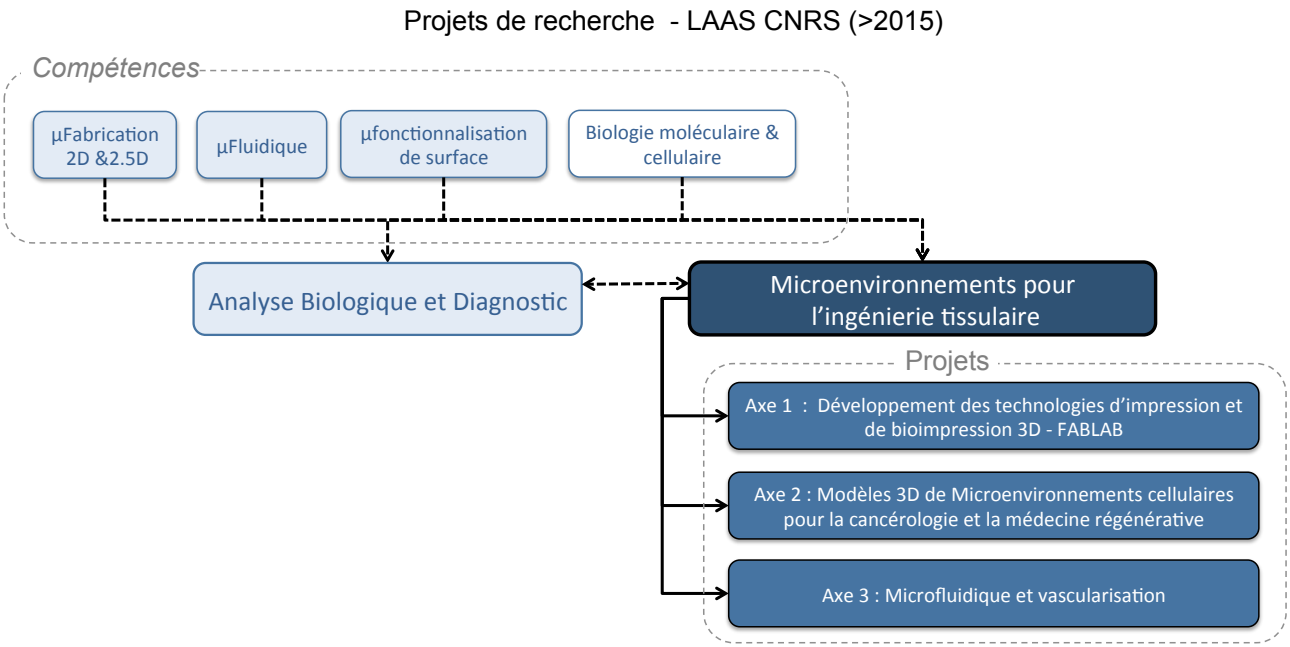


Figure 2 . Evolution de mes activités de recherche et champs de compétences pour l 'étude du microenvironnement cellulaire via le développement de technologies d'impression et de bio-impression 3D.

Le LAAS CNRS offre un terrain exceptionnel pour le développement de méthodes originales de micro et nanostructuration et dispose d'une expertise remarquable dans le domaine des nanosciences et de leur application en biologie. En parallèle, les projets de recherche que je souhaite aborder se font et continueront à se faire en étroite collaboration avec des partenaires biologiste et cliniciens. Cette collaboration doit être le terrain de partage et d'échanges quotidiens qui doivent permettre tout autant au physicien que je suis de comprendre les objectifs, les problématiques et les méthodes de travail des mes partenaires biologistes qu'à mes collègues de mieux cerner le potentiel des technologies pour développer ensemble de nouveaux outils pertinents pour la recherche fondamentale ou appliquée en biologie et en médecine.

Ces projets doivent se traduire par un rapprochement des équipes que je souhaite aussi bien culturel qu'à terme, géographique. Favoriser les échanges de ces communautés, mêler les compétences de chaque partenaire sont pour moi des aspects essentiels des projets de recherche que je souhaite développer. *«L'interdisciplinarité favorise l'imprévu, l'innovant, la sérendipité »*. Cette citation de M. Serres, résume probablement le mieux l'esprit dans lequel j'ai mené mes travaux de recherche depuis le début de ma carrière. Cette démarche interdisciplinaire est pour moi enthousiasmante tant elle est source d'innovation et d'un enrichissement permanent pour tous les membres d'une équipe de recherche.

B . Bilan Scientifique

.

B.1 Introduction

La microfluidique et tout particulièrement son application à la biologie au travers des laboratoires sur puce, sont des domaines de recherche par essence multidisciplinaires. Le développement de dispositifs microfluidiques requiert tout d'abord des compétences en hydrodynamique et éventuellement en modélisation numérique pour sa conception. Il nécessite ensuite de développer et de maîtriser des procédés permettant sa fabrication, en répondant à des exigences de prototypage rapide pour les premières phases de développement ou à des problématiques de fabrication à grande échelle et à bas coût pour leur commercialisation et leur industrialisation. Par ailleurs, compte tenu du rapport surface / volume important, le contrôle des propriétés physico chimiques des surfaces sont prépondérantes dans la plupart des applications. Elles le sont tout particulièrement en biologie où les phénomènes d'adsorption spécifiques ou non spécifiques aux parois, les mécanismes de mouillage, de transport de fluides sont des paramètres critiques pour le fonctionnement et les performances des dispositifs. Ensuite, comme nous pourrons le voir au travers des quelques exemples abordés dans ce chapitre pour des applications de préparation ou d'analyse d'échantillons biologiques, de nombreux concepts reposent sur l'utilisation de forces magnétiques, électrocinétiques, capillaires qui requièrent des compétences dans chacun des domaines associés. Enfin, les dispositifs doivent répondre à un objectif de traitement ou d'analyse d'échantillon ciblé et ne pas interférer avec les processus biologiques impliqués, qu'il s'agisse d'interaction entre biomolécules ou encore de culture cellulaire. Cette dernière partie requiert naturellement de maîtriser les concepts en biologie moléculaire et cellulaire.

Mes activités au sein de l'équipe MMBM et plus globalement de l'Institut Curie m'ont clairement montré à quel point le mariage entre des outils et des concepts issus de la chimie ou de la physique et des problématiques biologiques ou cliniques pouvait être fructueux et enthousiasmant. L' objectif principal de mon travail de recherche à l'Institut Curie a été de développer de nouvelles approches et concepts microfluidiques pour concevoir des dispositifs miniaturisés d'analyse (ex : pré-concentration, capture et analyse de biomarqueurs) ou de diagnostic (ex : capture de cellules cancéreuses, biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer). Ces activités ont eu comme dénominateur commun de répondre à des problématiques de cancérologie domaine qui, au fil des années, est devenu le cadre principal de mes recherches. Ce travail reposait sur mes compétences en microfabrication, en physico chimie, notamment dans les domaines de l'hydrodynamique, du magnétisme, du mouillage et des mécanismes d'auto-assemblage. Les concepts que nous avons développés ont donné jour à de nouveaux outils microfluidiques (microfluidique digitale et pinces magnétiques, lits fluidisés microfluidiques, intégration de particules auto-organisées) dont nous avons démontré la pertinence dans un contexte d'analyse et de diagnostic. Ce travail a été réalisé sur la base de collaborations établies au sein de l'UMR 168 ainsi qu'avec des médecins de l'hôpital de l'institut Curie avec qui j'ai pu m'intéresser à des projets de recherche translationnelle.

Cette première partie dresse un bilan synthétique de mes principales activités de recherches au sein de l'institut Curie UMR 168, depuis mon intégration au CNRS en 2007, jusqu'à mon départ en 2015. Ces projets sont toujours en cours de développement au sein de l'équipe dirigée par S. Descroix à l'IPGG équipe avec laquelle je poursuis une collaboration active. Cette collaboration évolue désormais vers le développement des dispositifs microfluidiques 3D, thème que j'aborderai dans la partie dédiée à mes projets de recherches futurs.

Des résumés de mes travaux antérieurs, en thèse puis en post-doctorat à IBM (Zurich, Suisse) et au LPN (Marcoussis, France) sont proposés dans les Annexe I et II.

B.2 Capture et analyse de cellules tumorales circulantes

Publications CV n° 14,17, 33, 36

Brevet n°10

Encadrements : A.E. Saliba (Doct.), J. Autebert (Doct.), G. Mottet (Post Doc.)

Projets: Caminems (EU, FP7), Nadine (EU, FP7), MICAD (ANR), CellO (ERC Adv.)

Environ 90% des décès causés par le cancer sont dus à des rechutes d'ordre métastatique. Ces rechutes sont généralement induites par un faible nombre de cellules cancéreuses qui s'échappent des tumeurs primaires, circulent dans le sang, s'immobilisent dans des organes éloignés de la tumeur tout en restant en état « dormant », puis se redéveloppent finalement. La communauté scientifique ne dispose que de peu d'éléments quant à la compréhension de ces mécanismes. La principale cause de cette méconnaissance est liée à l'extrême rareté de ces cellules cancéreuses circulantes (CTC) dans le sang (environ 1 cellule pour 1 million de globules blancs pour les patients déjà atteints de métastases).

De nombreuses études cliniques insistent également sur la complexité des cancers au niveau cellulaire : les études sur cellules individuelles montrent que non seulement chaque cancer est unique, mais qu'au sein d'une même tumeur, il existe une multiplicité de sous-populations cellulaires différentes, présentant des phénotypes et sans doute pour certaines des mutations variables, jouant probablement un rôle synergique dans la survie et le développement de la tumeur et présentant des propriétés différentes en termes d'invasivité et de résistance. Il est important de noter que l'hétérogénéité des cancers au niveau cellulaire à un instant donné est également présente au niveau temporel causant l'apparition de résistance aux thérapies (échappements thérapeutiques) et des progressions métastatiques. Ces mécanismes sont valables pour la tumeur primaire mais sont également présents dans les voies de prolifération métastatiques. En effet, des études récentes ont montré que le transcriptome global des cellules tumorales circulantes (CTCs) , à l'origine des métastases, est soumis à de nombreuses transitions (telles que les transitions EMT épithelio-mésanchymateuses) et que ces transitions sont corrélées avec des échappements thérapeutiques[a].

[a] E. Ozkumur et al. Sci. Transl. Med. 2013, 5(179)

De façon à pouvoir mieux comprendre la complexité de la dynamique des populations de cellules cancéreuses, le simple comptage de CTCs dans le sang ou la recherche de quelques mutations spécifiques ne sont pas suffisants pour établir un pronostic et un protocole de traitement précis. La recherche d'outils permettant de caractériser l'hétérogénéité cellulaire au sein d'une tumeur ou d'une population de cellules circulantes et d'étudier une large panoplie de biomarqueurs est essentielle.

La première application a laquelle je me suis intéressé est focalisée sur le diagnostic du cancer et plus particulièrement sur l'analyse de biomarqueurs circulants. Cette thématique a connu un essor exponentiel depuis le début des années 2000 qu'il s'agisse de l'analyse de cellules ou de biomolécules (ADN, Protéines, exosomes, …). L'apport des microsystèmes et notamment de la microfluidique dans le domaine a été considérable. La miniaturisation a permis de proposer des mécanismes de capture ou de séparation à l'échelle cellulaire voire moléculaire particulièrement efficaces. Même si cette miniaturisation et la réduction des volumes induit parfois certaines contraintes de préparation d'échantillon (purification, pré-concentration) ou de temps d'analyse du fait des larges volumes d'échantillon à analyser, la microfluidique a également apporté des avantages majeurs en termes de reproductibilité, de capacité de multiplexage et de possibilité d'automatiser l'ensemble des étapes de l'analyse. Ces deux aspects sont essentiels dans la recherche en oncologie et pour le développement d'outils de de précision performants permettant un typage et une détection précoce de la maladie.

C'est dans ce contexte que j'ai contribué, de 2007 à 2015 au développement d'un dispositif de capture intégré (EPHESIA) qui permet la détection et le typage de CTCs avec une très haute sensibilité. Ce projet d'envergure a été réalisé dans le cadre des projets Européens Caminems et Diatools (FP7) puis du projet ANR Micad et enfin du projet ERC (CellO) porté par J.L. Viovy. Grâce à une technologie basée sur l'auto-assemblage de réseaux de particules magnétiques bio-fonctionnalisées ainsi qu'à des dispositifs microfluidiques polymère (COC) permettant une manipulation précise des échantillons d'analyse, les dispositifs développés par l'équipe ont démontré la possibilité de capturer de façon spécifique des cellules tumorales circulantes directement dans des échantillons de sang de patient. Le principe de la capture est décrit sur la Figure 3. Il repose sur un procédé d'assemblage de particules micrométriques super-paramagnétiques (1-10µm) en suspension en présence d'un champ magnétique externe. En l'absence de champ, le déplacement des particules en suspension répond à un modèle brownien. Sous l'action du champ magnétique, chaque particule acquiert une aimantation et présente une polarisation magnétique. Chacun des dipôles ainsi constitués va interagir avec son voisin pour s'assembler et former spontanément des structures colonnaires orientées suivant l'axe du champ magnétique. Dans le cas de la technologie EPHESIA, ces particules sont introduites dans une chambre microfluidique à la surface de laquelle a été intégré un réseau de microstructures magnétiques. Ces structures sont utilisées comme point de nucléation et d'ancrage des particules qui s'assemblent ainsi pour former un réseau dense et parfaitement organiser de microcolonnes.

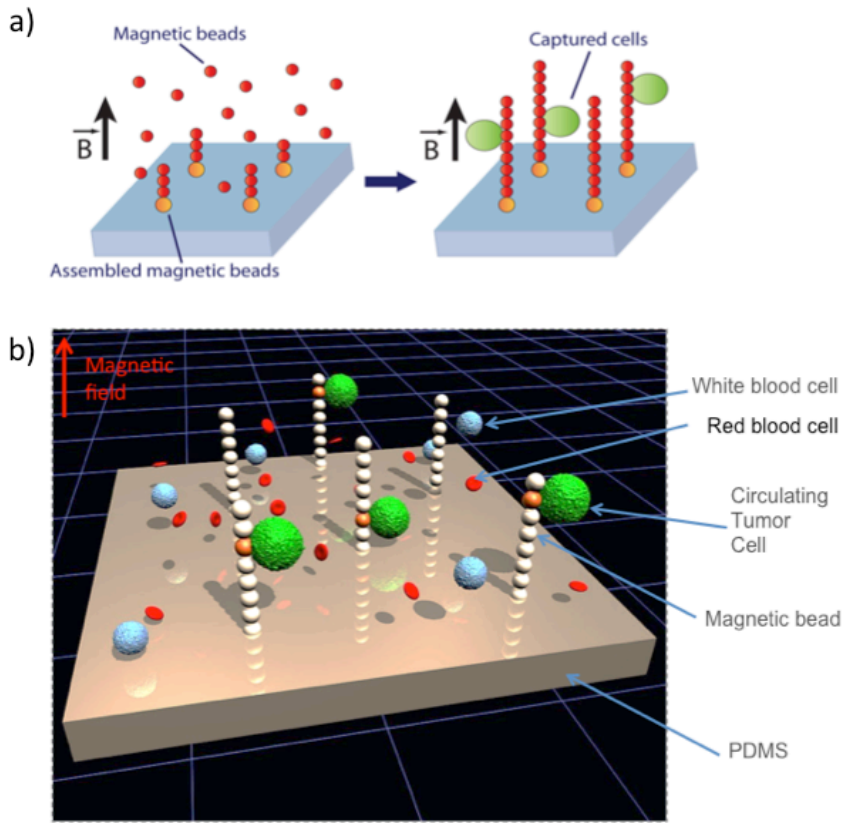


Figure 3 . a) Illustration du mécanisme d'auto assemblage de particules superparamagnétiques (Dynal, 4,5µm) en suspension sous l'action d'un champ magnétique externe. Les interactions dipolaires entre les particules conduisent à la formation de microcolonnes alignées suivant le champ magnétique b) Illustration du concept EPHESIA permettant l'assemblage de réseaux colonnaires de particules fonctionnalisées au sein d'une chambre microfluidique. Le réseau constitué permet la capture de cellules en suspension par le biais d'interaction antigène/anticorps.

La première démonstration de la fonctionnalité du dispositif a été réalisée dans le cadre de la thèse d'A.E Saliba. Les efforts de développement et de validation clinique sur des échantillons de patients se sont poursuivis dans le cadre de la thèse de J. Autebert. Durant cette période, nos activités se sont tout d'abord portées sur l'optimisation des procédés de fabrication des dispositifs microfluidiques et des méthodes d'ancrage des structures magnétiques (en lien avec la thèse de F.D Delapierre – Cf. paragraphe B.5.2). Ces travaux ont été menés sur la base des développements réalisés dans l'équipe autour de la microstructuration de polymères thermoplastiques COC par laminage et thermo-formage (Thèse de V. Taniga, Post Doctorat G. Mottet) et ont permis la fabrication d'un puce COC compatible avec la technologie EPHESIA. Ces travaux seront détaillés plus en détail dans le paragraphe B.5.1. Un travail important a également été consacré à l'optimisation des designs des chambres et microcanaux afin d'assurer, au niveau des réseaux de microcolonnes, des vitesses d'écoulement uniformes et de maximiser le débit global d'analyse afin de rendre la technologie EPHESIA compatible avec les objectifs d'analyses cliniques. Les expériences de capture cellulaire n'ont pas montré d'impact de la vitesse d'écoulement sur la vitesse de capture. En revanche, l'augmentation des vitesses d'écoulement se traduit par une augmentation des forces hydrodynamiques qui peut compromettre l'ancrage et la stabilité des microcolonnes dans le dispositif. Une augmentation de ces vitesses d'écoulement jusqu'à des valeurs de l'ordre de 1 mm/s a été possible par une modification de la technologie d'ancrage des colonnes magnétiques. Initialement basée sur une technologie de photolithographie et lift off de couches de Nickel, celle ci est désormais réalisée par assemblage dirigé de particules

magnétiques sur la surface du dispositif. D'une part, cette technologie offre des avantages majeurs en terme de coût et de temps de fabrication et d'autre part, elle permet d'intégrer un volume plus important de matériau magnétique au niveau des points d'ancrage et d'augmenter significativement les forces magnétiques résultantes. L'optimisation conjointe des designs microfluidiques et des technologies de fabrication nous ont permis d'atteindre un débit maximum d'analyse de 7mL/h, débit compatible avec les objectifs d'analyse clinique. Ces évolutions nous ont également permis de développer un puce microfluidique à bas coût en COC (CyloOlefin Copolymer), matériau validé par la FDA et compatible avec des méthodes de production industrielle. En parallèle de ces développements nous avons développé, en collaboration avec la société Fluigent, une plate-forme instrumentale automatisée permettant i) la gestion de l'injection des échantillons et réactifs nécessaires à la capture et à l'immunomarquage des cellules au sein de la puce microlfuidique ii) un comptage et une analyse automatisée des cellules après capture et marquage.

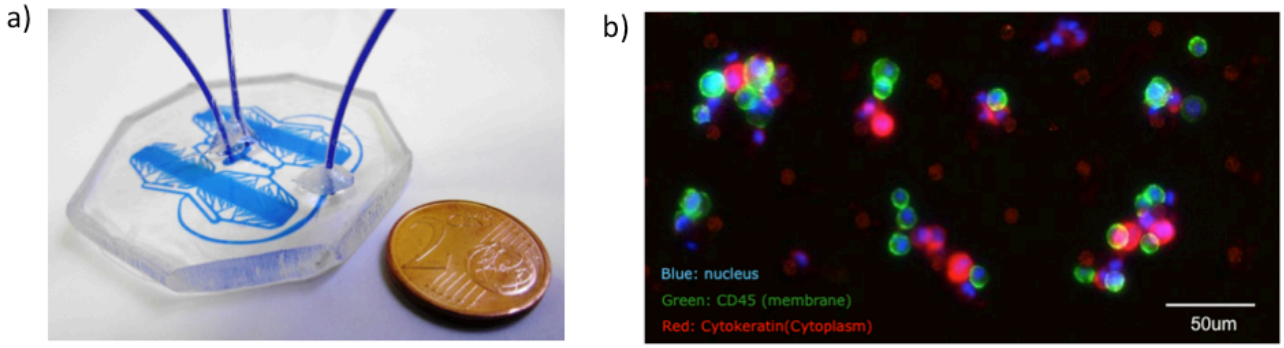
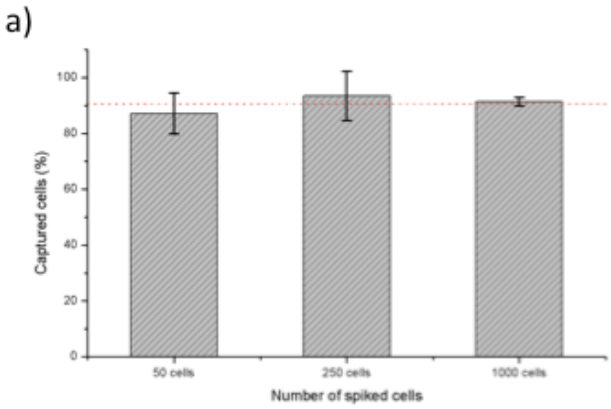


Figure 4 . a) Image d'un dispositif de capture EPHESIA réalisé en COC (Toaps Advanced). B) Image de Cellules capturées dans le dispositif EPHESIA après marquage (Dapi, CD 45, Cytokératine) à partir d'un échantillon issu d'une ponction lombaire de patiente atteinte d'un cancer du sein métastatique.

Sur la base de cette plate-forme instrumentale, une large partie de mes activités sur le projet a ensuite été dédiée à la validation biologique et clinique de la technologie EPHESIA. Ce projet a impliqué l'ensemble des permanents de l'équipe, deux ingénieurs au sein de l'équipe MMBM (B. Couderc, J. Champ) ainsi que Karla Perez Toralla (doctorante). Il a été mené en étroite collaboration avec les cliniciens de l'Hôpital de L'institut Curie (Equipe de J.Y. Pierga). Un premier choix a concerné la méthode de capture des cellules et plus particulièrement le choix de marqueur cellulaire à la base de la reconnaissance des cellules tumorales circulantes. Ce choix s'est porté sur EpCAM qui un marqueur des cellules épithéliales. Une première phase de validation nous a permis d'évaluer les performances de capture de la technologie Ephesia sur la base de lignées de cellules tumorales exprimant fortement Epcam puis sur des lignées présentant des taux variables d'expression EpCam. Les résultats sont synthétisés sur la Figure 5. Ils ont été réalisés par spiking de cellules dans des échantillons de sang total suivi d'une dilution (x3) centrifugation puis séparation de globules rouges par traitement RosetteSep.[1] Les résultats ont montré un taux de capture de 99,1% avec une sélectivité de plus de 99%.



b)

Cell type	EpCAM expr.	Capture efficiency
RAJI	None	0.02%
A549	Very low	18.7%
PC3	Low	78.7%
SKBR3	High	90%
MCF7	Very high	91.3%

Figure 5 . a) Evaluation du taux de capture en fonction du nombre initial de cellules tumorales (MCF7) introduites dans un échantillon de sang (Volume 500µL, débit 2mL/h). B) Variation du taux de capture de lignées cellulaires de type MCF7, PC3 et A549 présentant des taux d'expression variables de EpCam.

Enfin une validation clinique a été réalisée en comparant les performances de la technologie EPHESIA avec une des méthodes de référence, la technologie CellSearch-Veridex, qui repose elle aussi sur une capture basée sur le marqueur Epcam et qui est utilisée en routine au niveau hospitalier. Les résultats menés en aveugles sur une cohorte de plus de 25 patients atteints de cancers de la prostate et du sein ont montré un

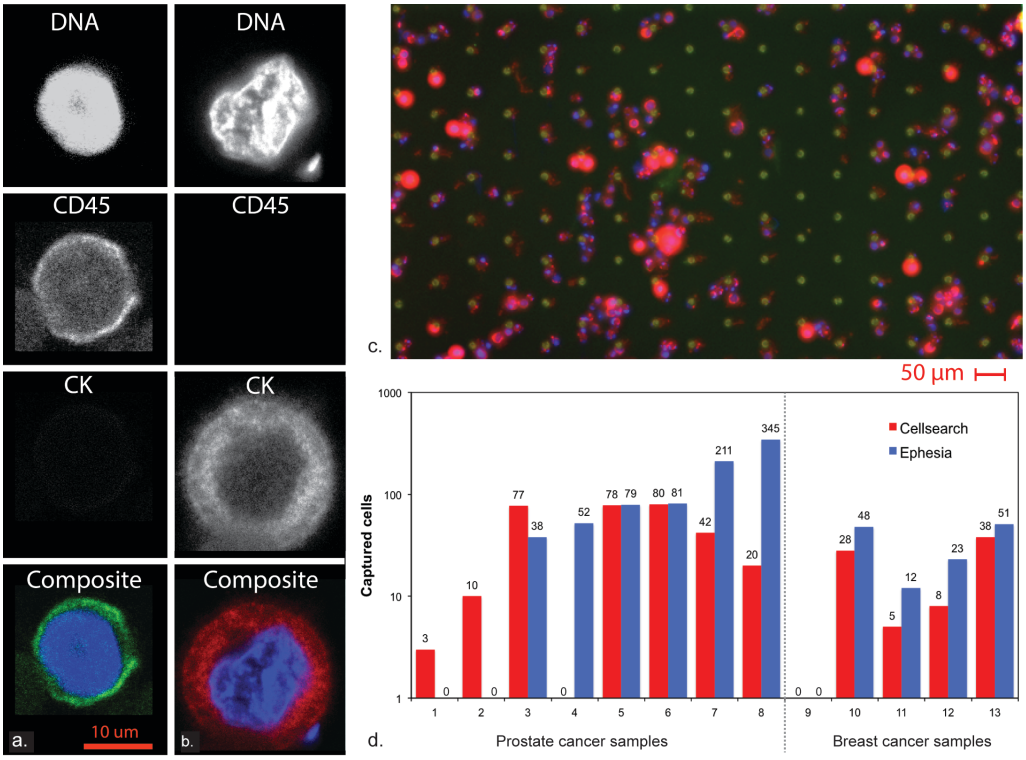


Figure 6 . Images en microscopie optique de cellules capturées après immunomarquage (Noyau, CD45, Cytokératine CK). Vue générale du réseau de colonnes après capture et marquage. Le comptage des CTCs effectué après traitement d'échantillons anonymés sur une cohorte de 8 et 5 patients atteints de cancers de la prostate et de cancer du sein montrent des niveaux de sensibilités et des quantifications comparables à la technique de référence actuelle (Cellsearch , Veridex). Les essais comparatifs ont été menés pour les deux technologies sur des volumes équivalents de 10mL.

excellent accord entre les deux technologies et nous ont permis de valider l'approche au niveau clinique. [2]

Ces résultats sont résumés sur la Figure 6. Les derniers développements de ce projet a également permis la mise au point de méthodes d'analyse et de caractérisation des cellules capturées : ces techniques impliquent le marquage immunologique, l'analyse par FISH (marquage direct de mutation dans le noyau des cellules capturées), la PLA (technique de marquage d'hétérodimères présents sur la membranes des cellules, par exemple HER2-HER3).

Même si le choix de l'anticorps EpCam est approuvé et validé dans de nombreuses approches au niveau clinique, telles que la technologies CellSearch (Veridex, Johnson et Johnson, approbation FDA), de nombreuses études ont désormais montré que le choix de l'anticorps EpCam n'assure pas une capture exhaustive de l'ensemble des CTCs d'un même échantillon. Cette observation pose plus largement la question du critère de sélection (ou de capture) d'une cellule tumorale et de façon implicite la définition même d'une cellule tumorale circulante.[3] L'hypothèse d'une modification du phénotype des CTCs notamment lors de l'activation de la transition Epithelio-Mesenchymateuse a été démontrée, confirmant ainsi la possible évolution des marqueurs de surface des cellules au cours de leur parcours dans le sang. Parmi les solutions possibles a cette limitation, il serait envisageable d'effectuer des immunocaptures sur la base de plusieurs anticorps (ex : Cytokeratine, …). Cette hypothèse est acutellement à l'étude au sein du groupe MMBM, par l'incorporation dans un même dispositf de plusieurs types de particules fonctionnalisées. Une autre approche, actuellement développée au sein de l'équipe ELiA du LAAS CNRS (A. Cerf, C. Vieu), consiste à utiliser un critère de taille ou de déformabilité des CTCs. Il semble effectivement, même si de nombreuses variabilités sont observées suivant le type de cancer, que la distribution en taille ou en déformabilité des CTCs puisse permettre de les discriminer par rapport aux autres cellules présentes dans le sang.

A court et moyen terme, bien que mes activités de recherche actuelles soient principalement centrées sur le développement de microenvironnement de culture cellulaire, je souhaite poursuivre une partie de ces activités dans le cadre d'une collaboration avec l'institut Curie et au sein du LAAS CNRS avec A. Cerf (CR), qui développe un dispositif de capture basé sur une capture et filtration en taille des cellules. Un premier objectif serait de coupler la technologie Ephesia avec les technologies de capture par taille et déformabilité en cours de développement au sein de l'équipe. Un deuxième objectif, plus prospectif serait de développer un dispositif d'analyse de cellules individuelles basé sur la microfluidique de goutte (Cf.Paragraphe B.4).

B.3 Lit fluidisé microfluidique : application à la préconcentration de biomarqueurs

Publications CV n° 2, 5

Brevets n° 2, 5

Encadrements : S. Tabnaoui (Doct.), I. Pereiro (Doct.), A. Lucile (Doct)

Projets: Nadine (2010-2015), Diatools (2010-2014), LoveFood (2012-2016)

Dans la partie précédente, nous avons mis en évidence l'intérêt de la microfluidique pour la capture spécifique de biomarqueurs à partir d'échantillons de sang total. Ces travaux nous ont permis d'aborder deux enjeux inhérents à l'analyse de biomarqueurs circulants en microsystèmes qui sont d'une part la nécessité de prétraitement des échantillons à des fins de purification et d'autre part la nécessité de préconcentrer

ces mêmes échantillons soit car ils sont à des concentrations difficilement détectables dans l'échantillon de départ soit parce que les volumes d'analyse nécessaires ne sont pas compatibles avec les débit autorisés par les dispositifs microfluidiques. Les besoins dans le domaine sont très larges et couvrent une vaste gamme d'applications qui comprennent l'analyse de traces dans l'environnement, l'analyse de biomarqueurs dans le domaine biomédical et l'analyse d'agents pathogènes ou de composés chimiques dans l'agro alimentaire. C'est dans ce contexte que je me suis intéressé au développement de modules microfluidiques intégrés capables de réaliser des opérations de capture et pré-concentration et applicables à une large gamme de biomarqueurs. Dans ce projet, notre objectif était de mettre à profit nos connaissances dans le domaine de la microfluidique, de l'auto assemblage et de la manipulation de particules pour développer de nouveaux systèmes d'extraction et de pré-concentration miniaturisés disposant d'une gamme dynamique suffisante pour l'analyse de biomarqueurs protéiques dont les concentrations varient généralement de quelques pg/mL à plusieurs mg/mL. Ces systèmes doivent également permettre l'analyse en aval des biomarqueurs isolés. Ce projet a été initié dans le cadre de la thèse de S. Tabnaoui, puis poursuivi avec la thèse de I. Pereiro que j'ai tous deux co-encadrés à l'Institut Curie. Ce projet se poursuit actuellement avec la thèse de L. Alexandre que je co-encadre également en collaboration avec S. Descroix (IPGG).

B.3.1 Préconcentration de biomarqueurs

Le développement de la microfluidique a été tout particulièrement important dans le domaine de sciences analytiques et bioanalytiques.[4] L'introduction, au début des années 90, du concept de µTAS (Micro Total Analysis System) par A. Manz démontre d'une part la possibilité de manipuler avec une haute précision, rapidité et répétabilité de faibles volumes de liquides et d'autre part d'intégrer dans des dispositifs miniaturisés l'ensembles des opérations nécessaires à l'analyse et ce, de façon automatisée.

La recherche protéomique est un domaine d'étude très actif qui motive de nombreux développements dans le domaine de la microfluidique. Les laboratoires sur puce offrent des performances et des gains potentiels en terme de volumes, de performances, de quantité d'échantillon nécessaire et de temps d'analyse qui permettraient de révolutionner les techniques d'analyses actuelles. Toutefois, parmi les fonctions majeures indispensables à l'analyse sur puce les étapes d'extraction et de pré-concentration restent les plus critiques. Elles permettent d'une part de « simplifier » un échantillon d'analyse en isolant de façon spécifique le biomarqueur d'intérêt et d'autre part d'abaisser la limite de détection des méthodes d'analyse. Cependant, ces étapes demeurent également les plus difficiles à intégrer en microfluidique. De nombreuses approches ont été proposées dans la littérature[5,6]. Elles incluent (cette liste n'est pas exhaustive) la préconcentration electrocinétique, la focalisation iso électrique (IEF), l'isotachophorèse (ITP), la préconcentration sur membranes ou encore la pré-concentration par affinité. Cette dernière approche regroupe des techniques d'extraction sur phase solide obtenue par interaction spécifique ou non spécifique d'un analyte d'intérêt sur une surface telle qu'une paroi de dispositif microfluidique [7,8], un monolithe [9]ou encore sur la surface d'une microparticule. L'interaction peut être spécifique par le biais d'anticorps, d'aptamères, d'oligonucléotides ou bien non-spécifique par le biais d'interactions hydrophobes ou éléctrostatiques. L'utilisation de microparticules (ex : silice, polymère) est particulièrement avantageuse en microfluidique. Celles ci sont disponibles commercialement, avec une large gamme de taille et de fonctionnalisation et sont facilement manipulables en suspension. Une première approche consiste à générer des lits compactés de particules par confinement géométrique ou agglomération. Cette approche, bien que relativement simple à mettre en œuvre, souffre de limitations majeures : d'une part , il est nécessaire d'introduire au sein du dispositif des microstructures ou de générer des constrictions géométriques pour immobiliser la particules qui induisent des contraintes de coût et de complexité de fabrication. D'autre part

il est relativement difficile de contrôler la distribution des billes dans l'espace, phénomène qui s'accroît notamment pour des particules de faibles dimensions.

L'utilisation de billes magnétiques, notamment super paramagnétiques permet d'effacer la plupart des ces limites. L'induction d'un champ magnétique au sein d'un dispositif microfluidique et la génération d'un gradient de champ permet de générer des forces $\boldsymbol{F} = (\boldsymbol{m}.\boldsymbol{\nabla B})$ suffisante pour leur manipulation en suspension (***m*** moment magnétique des particules, ***B*** champ magnétique). De par leur forte susceptibilité magnétique de telles particules peuvent être manipulées à l'aide d'aimant permanent externes, de microaimants intégrés ou encore d'électroaimants. L'utilisation d'aimants permanents externe est simple mais elle restait jusqu'à présent limitée pour contrôler la porosité des milieux générés. Une solution consiste à créer des champs et gradients de champs localisés par l'utilisation de réseaux d'aimants ou de micro-aimants intégrés [10,11,12] au prix de procédés de fabrication plus complexes et de la nécessaire utilisation de déplacements mécaniques pour moduler temporellement le champ. A contrario, l'utilisation d'électroaimants intégrés ou externes facilite l'automatisation et le contrôle temporel de forces magnétiques [13,14] par exemple pour réaliser des opérations de mélanges mais les faibles champs générés limitent la quantité de particules manipulées et les performances de capture.

Enfin, et cette remarque est applicable à tous les systèmes mentionnés, une contrainte inhérente à l'utilisation de particules magnétiques est la nécessité de générer des forces magnétiques suffisamment fortes pour contrebalancer les forces hydrodynamiques induites par l'écoulement des fluides et maintenir la stabilité des assemblages. Nous avons abordé ce problème dans la partie précédente dédiée à la technologie EPHESIA. Il est intéressant de noter que cette technologie permet également la création de réseaux de capture mais la nécessité de générer des réseaux de faible densité pour préserver la stabilité des colonnes se traduirait par une capacité et une efficacité de capture très insuffisantes pour les applications visées.

Sur la base d'expériences préliminaires réalisées lors de la thèse de A. Le Nel, nous avons pu développer un nouveau dispositif inspiré d'un procédé industriel : les lits fluidisés. Ces systèmes sont créés en introduisant, dans un réservoir macroscopique des particules solides. Sous l'effet de leur poids ces particules sédimentent rapidement au fond du réservoir. Un système d'injection de fluide situé au bas du réservoir est alors utilisé pour générer un écoulement, qui lorsque il atteint une vitesse suffisante, génère une force hydrodynamique qui compense le poids des particules et induit une transition depuis un état compacté vers un état fluidisé. Dans ce régime, les particules sont mobiles dans le réservoir et l'effet de mélange généré permet de favoriser les échanges entre le deux phases. Par ailleurs, l'augmentation de la porosité se traduit, pour une pression d'injection donnée, par une diminution de la résistance hydrodynamique et une augmentation du débit de fluide au sein du lit. La transposition directe du concept de lit fluidisé tel que décrit ci-dessous n'est pas possible en microfluidique : du fait de la réduction importante de la taille *d* des particules à l'échelle micrométrique (et de la réduction en d^3 du volume de ces dernières), le poids au niveau de chaque particule (de l'ordre de 10^{-15}N pour une particule polymérique de 4,5µm de diamètre) ne permet pas de compenser les forces hydrodynamiques induites par les écoulements de fluide (dans le cas de l'eau, de l'ordre de 10^{-11}N pour une vitesse de flux de 1mm/s) et maintenir la stabilité du lit.

Dans notre approche, nous avons souhaité remplacer les forces de gravité par des forces magnétiques. L'utilisation d'aimant permanent externe permet de générer des champs > 200mT sur l'ensemble d'un dispositif microfluidique centimétrique, qui couplé à des particules super paramagnétiques (ex : Dynabeads 4,5µm) permet de générer des forces de 10^{-11}N, du même ordre de grandeur que les forces hydrodynamiques. Une longue phase de simulation, d'optimisation du design et de validation nous a conduit jusqu'à

la géométrie décrite dans la Figure 7. Les images montrent le fonctionnement d'un lit fluidisé dans lequel ont été introduit 1 mg de particules (Dynabeads, 2,8µm). Un aimant permanent (Neodyme) est placé dans l'axe longitudinal de la chambre microfluidique principale. De façon assez remarquable, le lit fluidisé microfluidique montre un comportement très proche des lits fluidisés macroscopiques : à faible pression imposée les particules forment un lit compact caractérisé par une faible porosité et forte résistance hydrodynamique et un faible débit. Au dessus d'une valeur seuil de pression, un changement de régime est clairement observé avec une fluidisation des particules, une soudaine expansion du lit fluidisé (et une augmentation de porosité) et une augmentation de débit. Un flux de particules est observé depuis le point d'injection vers la fin du lit fluidisé alors qu'un mouvement de recirculation vers le point d'injection apparait près des parois. Ce phénomène de recirculation garanti la stabilité du lit fluidisé et aucune perte de particule n'est observée jusqu'à des débits de plusieurs µL/min. De nombreuses études (ex : PIV, microscopie, mesures hydrodynamiques, simulation numérique) ont été réalisées pour caractériser les phénomènes physiques impliqués dans les transitions de régimes et optimiser les paramètres hydrodynamique du lit , notamment pour maximiser les débit d'injections. Ainsi, les forces magnétiques offrent l'opportunité d'étendre le principe du lit fluidisé aux systèmes miniaturisés, et à notre connaissance, ce système constitue la première réalisation d'un lit fluidisé stabilisé magnétiquement en microfluidique.[15] Une part importante de mes recherches a été consacrée aux premières preuves de concept expérimentales ainsi qu'à l'optimisation des dispositifs sur la base de simulations hydrodynamiques et magnétiques, pour mieux comprendre et améliorer les performances des dispositifs en terme d'homogénéité, de débit et de robustesse. Les dispositifs actuels permettent d'assurer un débit de liquide compatible avec des applications biologiques (> 1mL/h) sans que les forces hydrodynamiques ne compromettent la stabilité de l'assemblage.

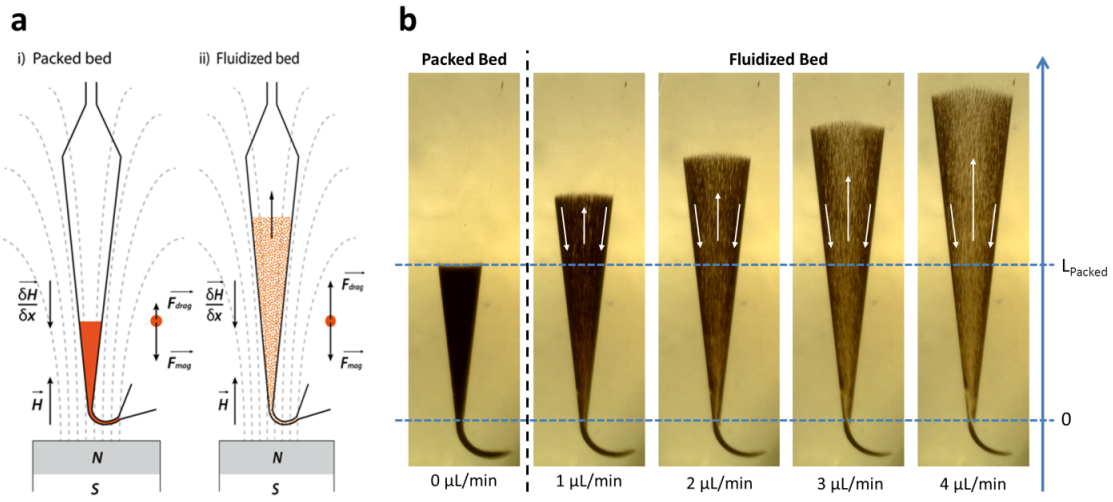


Figure 7 . a) Principe du lit fluidisé magnétique : une force magnétique est utilisée pour confiner des particules magnétiques soumises à un flux hydrodynamique. b) Image d'un dispositif microfluidique PDMS. Des particules super-paramagnétiques (Dynal 2,8 um) recirculent dans un canal de géométrie conique. L'expansion du lit augmente avec le débit de liquide.

Ce nouveau système autorise une forte densité en particules (nécessaire pour une capacité de capture élevée), une agitation hydrodynamique (pour accroître la cinétique de capture et son efficacité) et un flux élevé (permettant la concentration d'analytes très dilués).

Ces travaux nous ont permis de valider un nouveau concept de dispositif de préconcentration que nous avons souhaité valider dans plusieurs applications dédiées au dosage d'immunomarqueurs. Une première preuve de concept est donnée sur la Figure 8 à l'aide de particules super-paramagnétiques fonctionnalisées. Cette approche a été validée dans le cas d'un immuno-dosage-modèle (IgG/anti-IgG), par l'emploi d'une stratégie de type stop-and-go qui permet de bénéficier pleinement de la nature dynamique des particules magnétiques. Le système permet un enrichissement continu en analytes lors de l'injection d'un échantillon, puis après incubation d'un éluant, le relargage de l'analyte dans un volume faible de quelques µL. Des facteurs de préconcentration > 800 ont été démontrés, avec une sensibilité de détection (LOD) de 1 ng/mL soit (~ 6.5 pM).

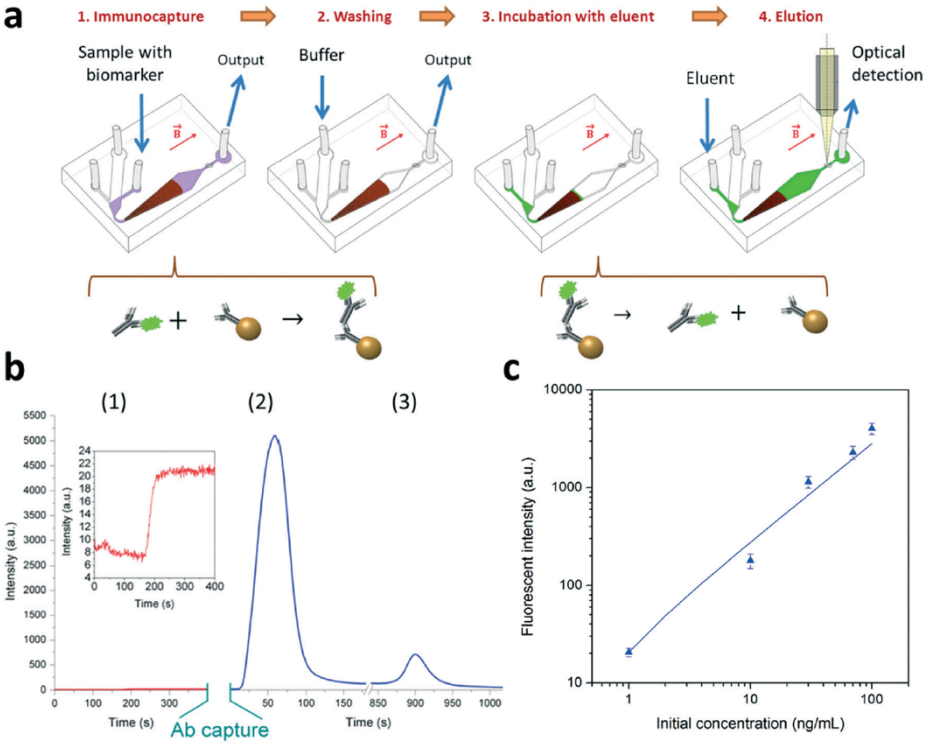


Figure 8 . (a) Protocole utilisé pour la pré-concentration et l'extraction de modèles de biomarqueurs par immunocapture et élution. (b) Des mesures en fluorescence au sein du dispositif microfluidique montrent la capture et élution d'un proteine à une concentration initiale de 10ng/mL dans un échantillon de 200µL : 1) Niveau de fluorescence dans un dispositif vide 2) Premier pic d'élution 3) Deuxième pic d'élution. c) Courbes de calibration obtenu pour une gamme de concentration initiale de 1 à 100ng/mL

Un brevet a été déposé sur le principe du lit fluidisé magnétique (Brevet n°1). Ce brevet est actuellement exploité au sien de la startup Inorevia, que j'ai co-fondé avec J.L. Viovy, S. Descroix, J. Autebert et A. Bendali en 2016.

Outre son application au sein du projet Nadine pour la détection de biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer, cet outil microfluidique a également été exploité dans le cadre des projets Napes pour la détection d'échantillons environnementaux et LoveFood pour l'analyse dans le domaine de l'agro alimentaire.

B.3.2 Application à la capture de bactéries.

Les résultats précédents montrent l'efficacité du système pour la capture de biomarqueurs moléculaires. De par sa nature dynamique, nous avons pu observer que le lit fluidisé microfluidique n'est que très peu sensible aux effets de colmatage qui sont généralement à craindre lorsque la rétention s'opère sur un milieu poreux statique. Cette observation nous amène naturellement à évaluer les performances d'un tel dispositif pour la capture et la pré-concentration de marqueurs de plus grandes dimensions. Parmi les biomarqueurs d'intérêt, nous pouvons penser en premier lieu à des cellules circulantes. De par la haute densité particulaire du système (faible porosité) ce système offre un efficacité de capture à priori supérieure au système Ephesia décrit précédemment mais il ne permettrait pas de réaliser les opérations de comptage, marquage et caractérisation nécessaires à l'analyse cellulaire. Une deuxième application a été réalisée dans le cadre du projet LoveFood pour la détection d'agents pathogènes. Ce dernier domaine d'application est reconnu par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme menace globale pour la santé humaine. Le seul cas des maladies infectieuses liées à l'alimentation compte plus de 600 millions de cas pour 400 000 décès chaque année. Le développement de méthodes rapides et bas coûts pour la détection précoce de pathogènes est un problème de santé publique et économique majeur. Le coût et la complexité des méthodes actuelles les rendent malheuresement difficiles à appliquer pour répondre efficacement à cette problématique. Elles restent également difficiles à déployer au niveau local, près des sources de production, pour permettre une détection rapide. La méthode de référence reste la culture sur plaque qui malgré sa sensibilité et spécificité, requiert des temps d'analyse de plusieurs heures et un personnel expérimenté. D'autres techniques telles que l'analyse de propriétés métaboliques, l'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF), l'analyse d'anticorps (cytométrie de flux, tests ELISA, …), l'analyse d'acide nucléiques (PCR, biopuces, …) ont été validées mais elles présentent un coût et un degré de complexité qui limite fortement leur utilisation. La microfluidique semble ouvrir des perspectives particulièrement intéressantes face aux questions de coûts, de portabilité et d'automatisation que nous venons d'aborder. De récentes réalisations ont démontré des sensibilités inférieures à 100 cfu (Colony forming unit) pour des bactéries de type Salmonelle[16,17] mais la nécessité d'inclure des étapes de pré-traitement et le manque de reproductibilité des approches dans le cas d'échantillons complexes restent particulièrement limitant.

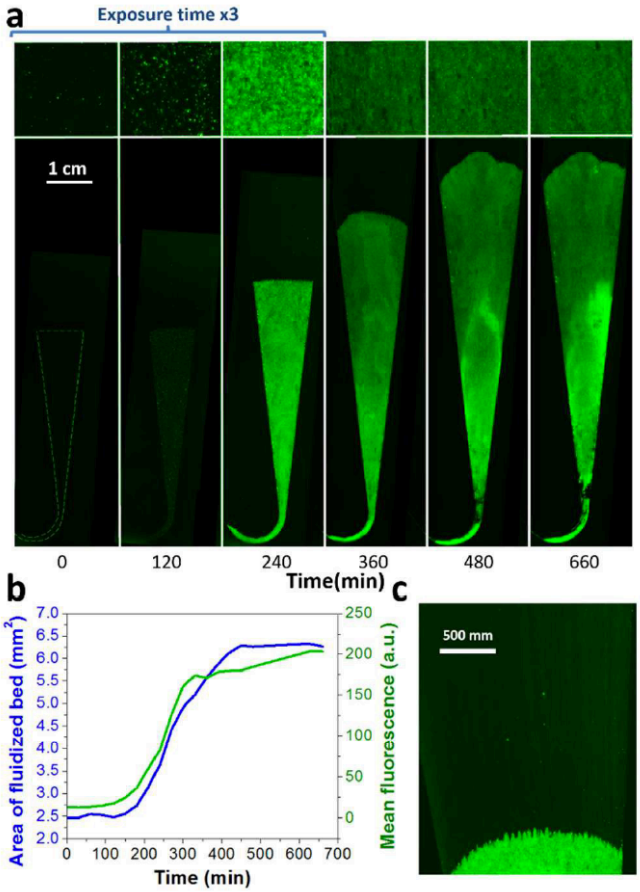


Figure 9 . Images montrant la capture de bactéries Salmonella Typhimurium Fluorescentes (GFP) initialement suspendues à 10^5 cfu/mL dans 50µL de PBS puis leur mise en culture par perfusion de milieu de culture (LB) à 0,15µL/min. Des images en fluorescence ont été prises toutes les 120 min (a). L'augmentation de l'aire du lit traduit la prolifération des bactéries (b). Après 300 min, des bactéries sont relarguées du fait de la saturation des sites de capture presents dans le lit.

Dans le cadre des travaux de thèse I. Pereiro et L. Alexandre et du post doctorat de A. Bendali des premiers tests de capture spécifiques de bactéries à l'aide du lit fluidisé microfluidique ont été réalisés à l'aide de particules fonctionnalisées pour la capture de Salmonelle. D'une part, ces expériences ont confirmé la stabilité du lit lors de l'injection de bactéries ainsi que la capture spécifique de bactéries avec des taux de capture > 70 % dans des échantillons réels de lait. La gamme dynamique couvre une gamme de 10^2 à 10^4 cfu/mL. D'autre part, ces expériences ont également montré un comportement remarquable : après la phase de capture, la perfusion d'un milieu de culture au sein du lit fluidisé se traduit, après des temps d'injection de l'ordre de 2h, par une expansion significative du volume du lit (Figure 9). Cette augmentation est directement liée à la prolifération des bactéries au sein du lit fluidisé qui se comporte alors comme réacteur de culture.

Des études complémentaires ont montré qu'il est possible de relier directement la cinétique d'expansion du lit fluidisé avec le nombre de bactéries initialement capturées. Ce résultat a été confirmé pour plusieurs types de bactéries (Salmonella Typhimurium, Enterobacter cloacae, Escherichia coli) avec des sensibilités de détection <10cfu/mL dans des échantillons de lait réels. Ces performances remarquables montrent d'une part la sensibilité de la capture mais aussi la possibilité de réaliser une détection sans marquage par un simple contrôle visuel de l'aire du lit fluidisé (Figure 10).

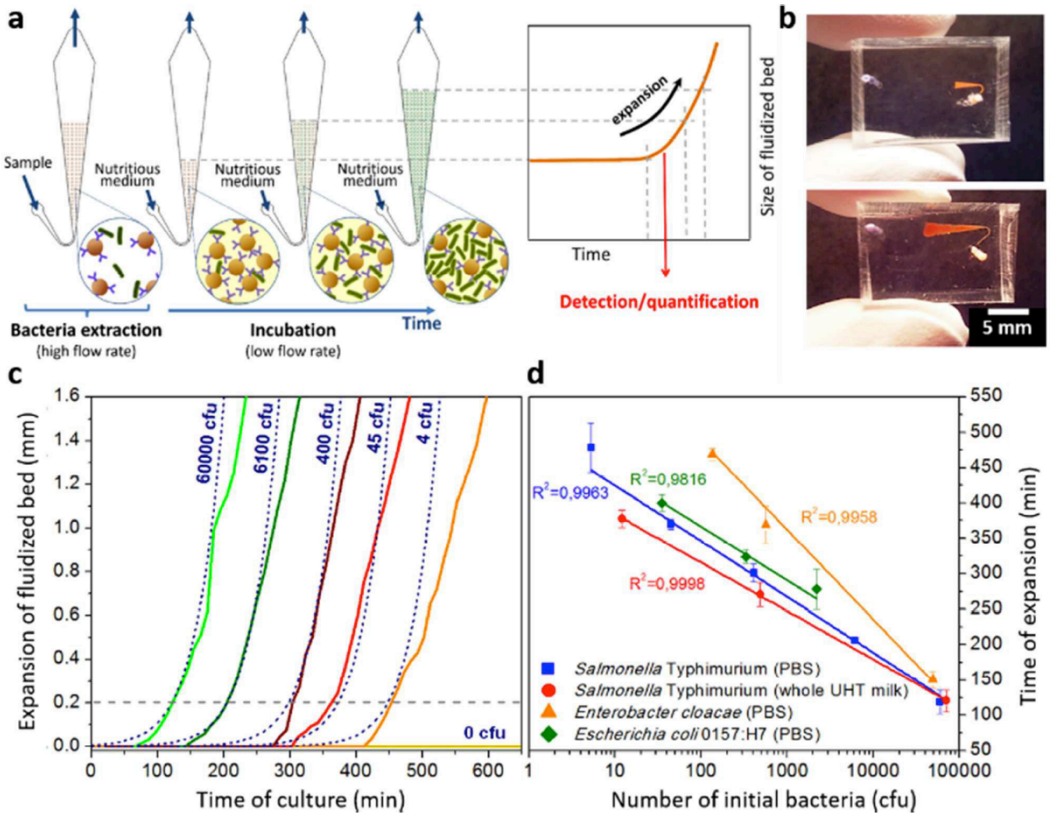


Figure 10 . (a) Illustration du processus de capture, mise en culture des bactéries au sein d'un lit fluidisé. (b) L'expansion du lit induite par la prolifération des bactéries est détectable par simple contrôle visuel. (c-d) Mesure du taux d'expansion du lit fluidisé et du seuil (temporel) d'expansion au cours du processus de mise en culture pour plusieurs concentrations initiales (60000-4cfu pour un échantillon de 50µL)

A mon sens, ces résultats illustrent particulièrement bien les opportunités offertes par la microfluidique pour la création de dispositifs de détection et d'analyse simples, portables, bas coût. Au delà de cette validation, même si la route depuis les phases de conception, de validation, de caractérisation jusqu'à la démonstration d'une application analytique est longue et parfois complexe, ces résultats illustrent également les opportunités considérables offertes par une approche interdisciplinaire à l'interface de de la physique (hydrodynamique, magnétisme, …) de la chimie (traitements de surface, fonctionnalisation, …) et de la biologie.

B.4 Microfluidique digitale et pinces magnétiques : application à l'analyse de biomarqueurs

Publications CV n°4,7,11,15,23,24

Brevet n° 6

Projets : Digidiag (ANR), CellO (ERC), Nadine (FP7)

Création de la startup INOREVIA

Encadrements : D. Ferraro (Post Doc.), B. Teste (Post Doc.), S. Begolo (Doct.), A. Ali Cherif (Doct.)

La microfluidique de goutte (ou microfluidique biphasique) offre de nombreux avantages pour des applications d'analyse biomédicale où les questions de contamination, de faible volume et haut débit sont des éléments clefs. En comparaison de la microfluidique monophasique, la microfluidique de goutte permet de compartimentaliser des échantillons de liquides dans une phase non miscibles, en d'autres termes de créer des micro-réservoirs indépendants dont les volumes peuvent être inférieurs au nL voire au pL. Ces microréservoirs peuvent être transportés sur de grandes distances sans dispersion ni contamination. Une démonstration remarquable de l'intérêt de la microfluidique de goutte a été apportée par la société Raindance au début des années 2000 par la création d'une plate forme de PCR digitale. Cette approche permet de segmenter un échantillon à analyser en un ensemble de gouttes indépendantes, se comportant comme un micro-réservoirs de faibles volumes dans lequel des biomarqueurs d'intérêt (en l'occurrence des oligonucléotides) sont confinés. Du fait de la réduction considérable des volumes et de la possibilité de jouer sur des effets de dilution, chacune des gouttes contient en moyenne 0 ou 1 oligonucléotide qui sera ensuite amplifié par PCR. Cette stratégie permet ainsi d'augmenter la sensibilité de la détection jusqu'à la molécule unique, de limiter le bruit de fond dans la phase d'amplification tout en permettant une quantification sur une très large gamme dynamique.

D'un point de vue technologique, un des avantages majeurs de la microfluidique biphasique réside dans la possibilité de générer les gouttes en grand nombre, de façon parfaitement automatisée et reproductible. [18] Au delà de la simple génération de goutte, la possibilité de considérer chaque goutte comme un réservoir indépendant induit naturellement la question de la réalisation d'opérations entre gouttes pour atteindre des protocoles plus complexes. De nombreuses fonctions ont été démontrées depuis le début des années 2000 telles que la fusion[19,20] , la division [19], le tri [19,21], l'encapsulation cellulaire[21,22]. Ces opérations nécessitent un bon contrôle des propriétés de mouillage de la phase porteuse dans le dispositif et l'ajout éventuel de tension-actifs.[23] Au démarrage de ce projet en 2010, les opérations d'extraction de composés au sein d'une goutte restaient encore à valider. Ces opérations constituent pourtant la base des procédés courants d'analyse biochimique : ils reposent souvent sur une étape de capture sur phase hétérogène par exemple à l'aide de matériaux poreux ou de particules magnétiques.

Sur la base de mon expérience dans le domaine de la microfluidique et de la manipulation de suspensions colloïdales, j'ai initié un projet de développement d'une nouvelle plate forme d'analyse automatisée en combinant la microfluidique avec des concepts d'auto assemblage et de manipulation de billes magnétiques.

Le concept proposé repose sur un système de pinces magnétiques pour adresser, de façon individuelle, des particules magnétiques contenues dans des gouttes aqueuses confinées dans une phase inorganique, en règle général une l'huile minérale ou fluorée. Ce système de pinces magnétiques permet de focaliser les lignes de champs à l'intérieur de la goutte pour créer des forces de confinement magnétiques suffisantes pour agglomérer les particules initialement en suspension, les extraire de la goutte d'origine et les transférer d'une goutte à l'autre.

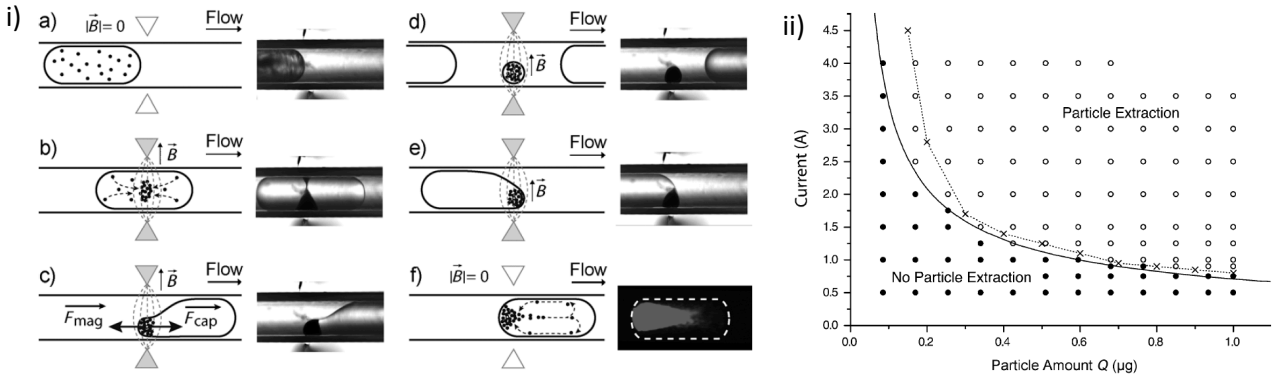
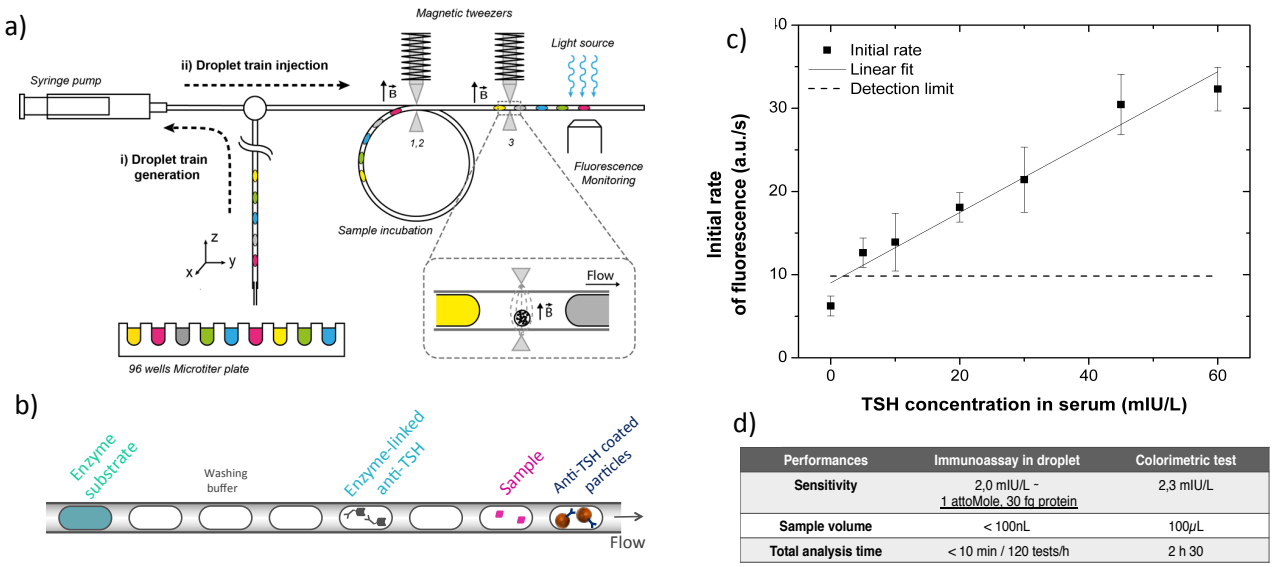


Figure 11 . i) Illustration du mécanisme de confinement magnétique de particules super-paramagnétiques (2.8µm, Dynal) contenues dans une goutte confinée de solution aqueuse dans une huile fluorée. Un système de pinces magnétiques (constituées d'un électroaimant et d'une pointe réalisée dans un matériau à faible permittivité, AFK 501, Arcelor) située de part et d'autre du capillaire permet de générer un gradient de champ suffisant pour favoriser la formation et l'extraction d'un cluster de particules lors du passage d'une goutte. Lors du passage d'une nouvelle goutte ce cluster peut être fusionné et redispersé spontanément par simple désactivation du champ magnétique. Ii) Diagramme de phase montrant les plages de fonctionnement de l'extraction en fonction du courant circulant dans la bobine électromagnétique et de la masse de particules (2,8µm, Dynal) contenue dans chaque goutte.

Cette approche permet de combiner les avantages des dosages en phase hétérogène tout en réalisant des opérations complexes de transport, mélange, lavage et extraction sur de faibles volumes. En comparaison des systèmes basés sur l'électro-mouillage, cette stratégie permet de générer des gouttes de très faibles volumes (<100pL), et d'augmenter considérablement les débits d'analyse. Par ailleurs, les gouttes (phase aqueuse) sont générées dans une huile fluorée, qui se comporte comme une barrière empêchant toute contamination croisée (ADN, ARN, Protéines, …) . Un robot de pipetage automatisé permet de générer les gouttes à façon. L'analyse des gouttes est réalisée en microscopie à fluorescence.

B.4.1 Application à l'immunodosage par ELISA

Une première application au dosage immunologique de la TSH (Thyroid Stimulating Hormone) a été validée au travers d'une publication et d'un brevet. Elle est décrite sur la Figure 12. Un train de gouttes constituées de l'échantillon à analyser et des différents réactifs de détection est généré par une plate forme de pipetage dans un capillaire fluorée en utilisant une huile fluorée. Lors de leur passage dans des pinces magnétiques, les forces de confinement générées sur les particules permettent leur agglomération, extraction et leur transfert vers d'autres gouttes permettant, de proche en proche, de réaliser l'ensemble des opérations nécessaire à l'analyse ELISA. Le niveau de fluorescence dans la dernière goutte est mesuré au sein du capillaire par microscopie. Il est intéressant de noter que la sensibilité de la technique proposée n'est pas supérieure aux tests conventionnels. En effet, elle reste liée à l'affinité des couples antigène-anticorps impliqués dans le test et n'est pas influencée par le confinement. Ainsi, et c'est le cas de nombreuses applications, la microfluidique ne permet pas d'améliorer la sensibilité de la détection. Par contre, elle permet de réaliser des opérations complexes, de façon automatisée avec un gain considérable de temps (facteur 15), une réduction de la consommation des réactifs (facteur 1000) celui ci étant principalement induit par la réduction des volumes et les faibles temps de diffusion (ainsi que des mécanismes de recirculation en interne dans le cas particulier des gouttes).[24]



Performances	Immunoassay in droplet	Colorimetric test
Sensitivity	2,0 mIU/L - 1 attoMole, 30 fg protein	2,3 mIU/L
Sample volume	< 100nL	100µL
Total analysis time	< 10 min / 120 tests/h	2 h 30

Figure 12 . a) Plate forme expérimentale permettant la manipulation de particules magnétiques en microfluidique de goutte.. b) Description de la composition du train de gouttes générées pour l'analyse de la TSH par ELISA. c) Courbe de calibration du dosage. d) Comparaison des performances de l'analyse par colorimétrie et par microfluidique de goutte.

Ces premiers travaux ont fait l'objet d'un dépôt de brevet et sont valorisés au sein de la startup Inorevia, que j'ai co-fondé en 2016 avec JL. Vlovy, S. Descroix, J. Autebert et A. Bendali. La flexibilité de cette technique d'extraction et les possibilités d'automatisation et de multiplexage offertes par la microfluidique ouvrent des champs d'applications particulièrement larges pour des opérations nécessitant des protocoles complexes et en grand nombre.

B.4.2 Application à l'immunodosage par agglutination

Les tests d'agglutination représentent une part importante des méthodes d'immunodosage utilisées pour l'analyse médicale ou alimentaire. Leur simplicité de mise en œuvre et leur versatilité sont des avantages majeurs pour des applications de terrain. Le principe du test repose sur l'incubation de particules fonctionnalisées par des anticorps dans un échantillon contenant un antigène spécifique des anticorps. La présence de l'antigène se traduit par la formation de liaisons entre les particules qui induisent leur agrégation. Sur la base de la plate forme développée autour de la microfluidique biphasique, des pinces magnétiques et des particules magnétiques, nous avons développé une plate forme permettant de réaliser des tests d'immunoagglutination de façon automatisée, multiplexée en réduisant les volumes de réactifs et d'échantillons. L'analyse quantitative de l'agglutination est réalisée directement dans les gouttes, en utilisant une simple caméra USB. Un algorithme de détection permet la quantification de l'analyse. Ces travaux ont été validés dans le cadre d'interactions antigène-anticorps. Ils ont montré les avantages apportés par la microfluidique de goutte en terme de cinétique de réaction, de coût et de simplicité de mise en œuvre. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du post Doctorat de B. Teste.[25]

B.4.3 Application à la RT q PCR

Sur la base de cette première validation nous avons souhaité étendre l'utilisation de cette plate forme d'analyse à une problématique de diagnostic liée à la détection de mutations dans le cancer du sein. Ce projet a été réalisé en collaboration avec l'équipe de P. de Crémoux (Hôpital Saint Louis, Paris) dans le cadre de la thèse de D. Ferraro : il s'agit de détecter la surexpression de HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) par le biais d'une analyse du transcriptome. Un protocole d'amplification d'ARN par RT PCR (Reverse transcription Polymerase Chain Reaction) a ainsi été développé et validé pour plusieurs séquences ARN (Gène de ménage Actine B, TBP, HER2). [26]

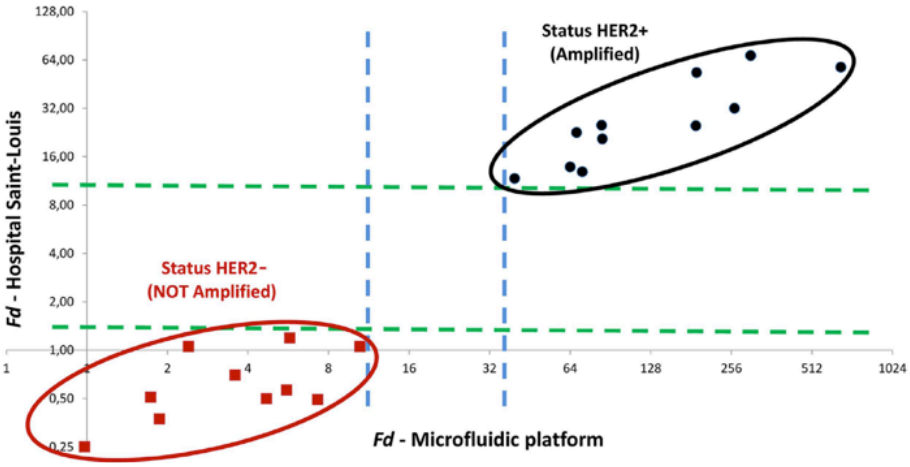


Figure 13 . Evaluation comparative des tests d'amplification et de détection du statut HER2 chez une cohorte de 21 patientes atteintes du cancer du sein (Hôpital Saint Louis) . Les échantillons d'ARN totaux ont été extraits par biopsie transcutanée et analysées dans la plate forme de microfluidique de goutte (Institut Curie) et RT q PCR (Hôpital Saint Louis). Les résultats montrent une très bonne corrélation entre les deux méthodes et confirment les performances de la plate forme pour une application clinique de diagnostic.

Ces travaux ont montré la possibilité de réaliser l'analyse avec de très faibles quantités initiales d'ARN, comparables à celle de la cellule individuelle (env. 20pg). Cette plate forme de diagnostic ensuite été validée sur des échantillons de patients par le biais d'une analyse en aveugle et d'une comparaison avec les techniques standards utilisées en milieu clinique (Figure 13).

B.4.4 Application à l'immunoprécipitation de la chromatine

Plus récemment, une application à l'immunoprécipitation de chromatine a été validée dans le cadre des post doctorats de G. Mottet et B. Teste et en collaboration avec l'équipe d' I. Draskovic (Insitut Curie – Université de la Sorbonne). Dans ces travaux, nous avons pu adapter la technique de dosage par CHIP (Chromatin immuno precipitation) au format microfluidique et valider l'analyse de profils de modification d'histones. Nous avons montré une réduction significative des temps d'analyse de 7 jours à quelques heures, une réduction d'un facteur 100 du matériel cellulaire nécessaire et avec un gain en spécificité et sélectivité. [27]

DOI: 10.1039/C6L

	MB quantity	Antibody quantity	Chromatin quantity	Chromatin immuno-precipitation	DNA elution	DNA purification	qPCR	Total Time
Droplet ChIP	15 µg	0,06 µg	0,1µg	4 h	20 min	20 min	2 h	7 h
Conventional ChIP	300-900 µg	1-5 µg	10-30 µg	24 h	1 h	24 h*	2 h	51 h

* Due to the lengthy protocol some steps, such as DNA decrosslinking and/or DNA precipitation, are usually performed over night.

Figure 14 .Comparaison des performances de la plate forme d'analyse de microfluidique de goutte pour l'analyse CHIP en comparaison des méthodes conventionnelles.

B.4.5 Evolutions technologiques : Miniaturisation et guidage magnétique

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'utilisation de la microfluidique de goutte en combinaison avec les pinces magnétiques permet de réaliser des protocoles d'analyse multi-étapes complexes de façon automatisée. L'utilisation de la plate forme développée reste par contre limitée à des modes opératoires où les trains de gouttes sont analysés en série, les gouttes parcourant toutes le même chemin. Dans certaines applications, le tri de gouttes ou encore la récupération du contenu de gouttes serait souhaitable et nous nous avons étudié la possibilité d'une plate forme offrant plus de flexibilité. Pour cela nous avons mis au point des puces microfluidiques intégrant des pistes magnétiques planaires qui permettent de contrôler individuellement la trajectoire de gouttes magnétiques confinées. Ce dispositif permet également d'immobiliser des gouttes pour contrôler des temps d'incubation ou encore de fusionner des gouttes préalablement sélectionnées. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre des Post Doctorats de B. Teste et D. Ferraro. [28] Ils montrent le potentiel d'intégration et d'automatisation de la technologie.

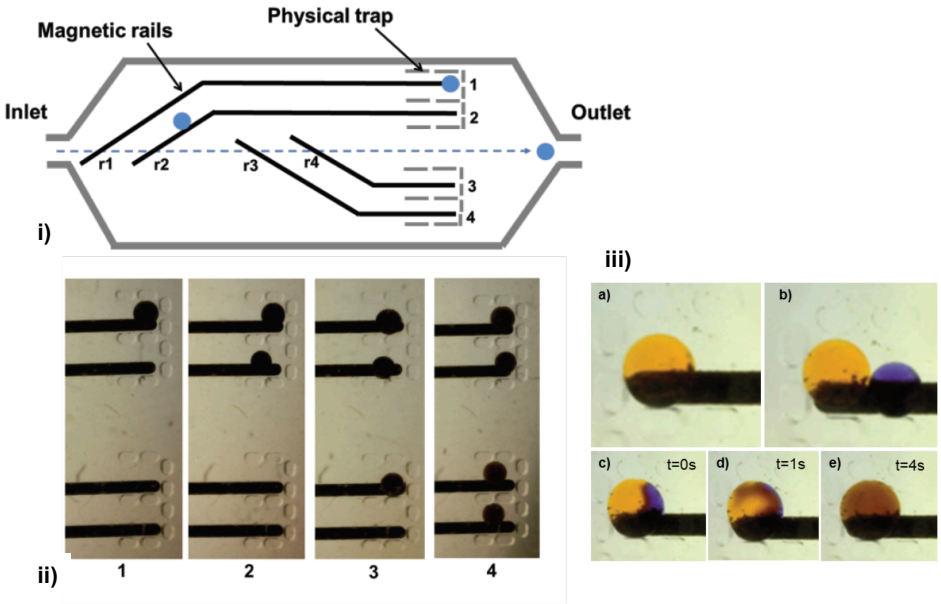


Figure 15 . i) Schéma du dispositif microfluidique intégrant des pistes magnétiques pour le contrôle de la trajectoire de goutte en suspension. ii) Illustration du guidage et de la capture de goutte dans des puits de confinement. iii) Expérience de stockage (a) et de fusion (b-e) de gouttes sous l'influence du flux hydrodynamique.

.

B.5 Micro et nanotechnologies pour la microfluidique

Publications CV n°8,13,18,19,21,25,28,30-32

Brevet n° 2,3,11,12

Encadrements : Vélan Taniga (Doct.), S. Begolo (Doct.), G. Mottet (Post Doc.), K. Perez Toralla (Doct.), Qihao He (Ingénieur)

Une partie importante de mon activité au sein de l'équipe MMBM de l'institut Curie a été consacrée au développement de nouveaux matériaux et procédés de fabrication pour la réalisation de dispositifs microfluidiques. Cette activité « transversale » reposait initialement sur mes compétences et mon expérience dans le domaine des micro et nano technologies. Elle m'a ensuite permis d'aborder de nouveaux champs d'exploration dans le domaine des polymères et moyens de production à grande échelle et à bas coût. En effet, pour que les laboratoires sur puces puissent trouver leur voie vers des applications d'analyse et de diagnostic de routine, il est essentiel de développer des dispositifs microfluidiques peu onéreux et autorisant une production à l'échelle industrielle. Ainsi, l'ensemble des projets de l'équipe reposait en premier lieu sur le développement de matériaux et de procédés de fabrication innovants qui répondent à la fois aux exigences des applications biomédicales ciblées tout en garantissant une viabilité économique et technologique à l'échelle commerciale. La plate forme technologique que j'ai mise en place au sein de l'UMR 168 et que j'ai contribué à mettre en place au sein de l'IPGG (Institut Pierre Gilles de Gennes pour la microfluidique) ont été des outils essentiels à ces développements.

Dans ce contexte, mon rôle au sein du laboratoire a été d'orienter les choix technologiques suivant trois critères :

i) La réalisation d'un dispositif microfluidique passe en premier lieu par le choix d'un matériau approprié à l'application visée. Outre des considérations économiques, ses propriétés physico-chimiques de surfaces vont influencer les phénomènes d'adsorption, de mouillabilité, de contrôle des flux électro-osmotiques, etc. Le matériau doit aussi présenter des propriétés physiques structurelles qui le rendent compatible avec les méthodes de détection envisagées (ex : transparence pour une détection en fluorescence) et/ou les méthodes de contrôle des flux mises en œuvre (ex : bonne résistance mécanique des applications sous pression).

ii) Une fois un ou plusieurs matériaux candidats sélectionnés, la question du choix des technologies de mise en forme et de structuration devient prépondérante. D'une part, les propriétés physiques et chimiques de chaque matériau vont contraindre sa mise en forme. D'autre part, les contraintes économiques, le volume de production recherché vont eux aussi conditionner le choix de la méthode de fabrication. Par ailleurs, les spécificités de l'application visée (dimensions, intégration de capteurs, température et pression d'utilisation, etc) vont elles aussi conditionner le choix des technologies et, rétroactivement, restreindre le choix des matériaux.

iii) Enfin, le dernier aspect important du développement consiste à intégrer au dispositif une fonctionnalité biologique, qu'il s'agisse de micro particules fonctionnelles, de biomolécules actives ou encore d'un traitement de surface pour optimiser les propriétés physico chimiques des dispositifs.

Les paragraphes suivants proposent une illustration de mes activités au travers de plusieurs exemples de développements technologiques dédiés à la mise en forme de matériaux thermoplastiques (COC, Dyneon) par laminage et moulage ainsi qu'à la fonctionnalisation de surface par auto-assemblage et impression. Ce travail a suscité l'intérêt au niveau industriel (collaboration avec les société Micronit, travaux de consulting avec Fluigent, dépôt de brevets) et m'a permis d'initier de nouvelles collaborations tant au niveau des laboratoires impliqués au niveau de l'IPGG (Curie : P. Bassereau, P. Martin, M. Piel, C. Hivroz, ENSCP : M. Tatoulian, A. Varenne) qu'avec des partenaires académiques extérieurs (CEA Saclay, CEA Leti Grenoble, ENSCP, INRA Nantes, LPS Orsay, LOF Bordeaux, LadHyx – Polytechnique Palaiseau).

B.5.1 Utilisation des matériaux thermoplastiques pour la microfluidique

Bien que de nombreuses applications développées en microfluidique restent encore aujourd'hui encore basées sur le poly(dimethylsiloxane) (PDMS) dont les propriétés de conformation et la facilité de mise en forme par moulage restent très attractives, les matériaux thermoplastiques ont suscité un vif intérêt au cours des dix dernières années. D'une part ils offrent une très large gamme de propriétés physico-chimiques. D'autre part, contrairement au verre ou au silicium, ces matériaux sont peu onéreux et nous avons pu développer de nombreuses méthodes de mise en forme simples grâce à plusieurs années de développement industriel en plasturgie. Ils conviennent aussi bien à des laboratoires de recherche (facilité de mise en forme, adapté au prototypage rapide) qu'au développement à l'échelle industrielle (approvisionnement en matériau, robustesse, coût, rendement des méthodes de mise en forme, capacités d'intégration).

- Dispositifs microfluidiques en COC (Cyclo Olefin Copolymer)

Le COC (Cyclo Olefin Copolymer) est un copolymère thermoplastique amorphe, transparent. L'utilisation de ce matériau pour des applications microfluidiques est relativement récente. Ce matériau présente un très grand nombre d'avantages : transparence optique, faible biréfringence, faible absorption d'eau à sa surface, faible porosité, très bonnes résistances mécanique et chimique (acides, bases, solvants organiques), biocompatible, rigidité, non poreux à la vapeur d'eau. Il est disponible dans une large gamme de Tg (70 ~ 150°C) ce qui le rend très attractif pour des procédés de moulages. Enfin, dernier aspect essentiel dans le cadre des applications bio-médicales qui nous concernent, le COC est un matériau agréé par la FDA (Food and Drug Administration – 2004).

C'est sur la base de ce matériau que j'ai entrepris le développement de nouvelles techniques de microstructuration et de fabrication de systèmes microfluidiques. Nous avons notamment mis en place une filière permettant le laminage à chaud pour la structuration de films minces (ép.<400µm, résolution env. 1µm) et moulage sous pression à chaud (hot embossing) pour la réalisation de canaux à haut facteurs de formes (résolution env. 10 µm Facteur 1 :10). Nous avons également mis en œuvre des procédés de fermeture des canaux par collage à l'aide des mêmes méthodes de laminage et de mise sous pression. La Figure 16 illustre un exemple de procédé pour la réalisation de canaux par laminage ainsi que quelques exemples de canaux et de structures réalisées dans du COC.

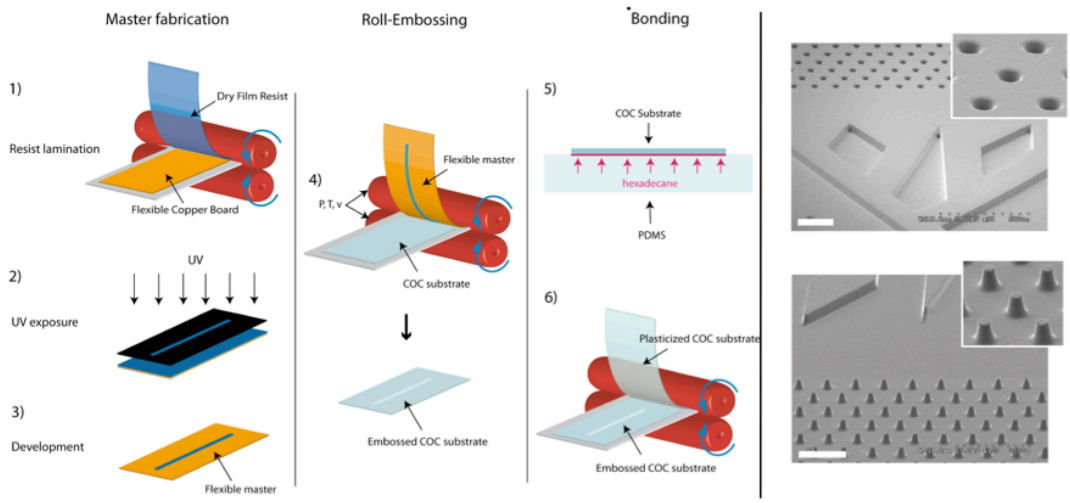


Figure 16 . A gauche : Représentation schématique du procédé de réplication par laminage à chaud : 1,2,3) réalisation de moules maître en résine sèche (dry film) par laminage et photolithographie, 4) réplication par laminage à chaud, 5,6) fermeture des canaux par traitement de surface par contact sur un timbre imbibé d'hexadécane puis par laminage à chaud. A droite : images en microscopie électronique (MEB) de moules maîtres (haut) et de leur répliques (bas) dans du COC (Topas, 8007, Tg= 85°C). Barre d'échelle : 200µm

Ces méthodes sont particulièrement avantageuses car elles permettent une fabrication à haut débit et faible coût des dispositifs microfluidiques. A l'échelle de notre équipe de recherche, elles permettent d'allier prototypage rapide (la fabrication des moules étant simple et rapide, les designs peuvent évoluer très rapidement) à des volumes de production nécessaires pour la réalisation d'études statistiques en biologie ou en médecine (> 500 dispositifs par an). A l'échelle industrielle, ces procédés de fabrication sont parfaitement transposables, le laminage étant déjà utilisé par exemple pour la réalisation de circuits électroniques souples.

- Dispositifs microfluidiques à base de Fluoropolymères

Les matériaux fluorés sont particulièrement avantageux au regard de leur inertie chimique pour aborder des applications en chimie de synthèse ou analytique, dans lesquelles l'emploi d'acides ou bases fortes ainsi que des solvants est souvent indispensable. Ils sont aussi particulièrement avantageux pour la microfluidique diphasique car ils présentent une très bonne compatibilité et mouillabilité avec les huiles fluorées qui sont très utilisées notamment pour des application d'analyse biologique et de diagnostic. A ce jour, cette famille de matériaux reste peu employée en microfluidique de part son coût très élevé et de part des difficulté de mise en œuvre. Des matériaux tels que le téflon ou le PEEK sont disponibles à l 'échelle industrielle mais leur champ d'application reste limité par leur opacité. Nous avons recherché des matériaux polymères fluorés permettant la réalisation de dispositifs microfluidique par des technologies similaires à celles développées pour des polymères thermoplastiques. Il s'agit d'utiliser des équipements simples, de répondre à la problématique de prototypage rapide tout en restant aisément transposable au niveau industriel. Nous avons retenu un matériau : le THV 620 (Dyneon). Ce matériau partage les principaux atouts du PDMS (propriétés élastiques, connectique fluidique facile, transparences, biocompatibilité) et apporte des spécificités propres : faible énergie de surface, résistance à une large gamme de solvants, d'acides et de bases, mise en forme aisée par laminage ou par moulage.

Nous avons mis au point une série de procédés de fabrication permettant de mettre en forme, structurer, et coller des films de THV620. Nos travaux sont totalement originaux et ont été publiés récemment. Notre savoir faire permet de réaliser des systèmes monolithiques de grandes dimensions (10x10cm^2), et multi-niveaux (superpositions du plusieurs canaux interconnectés). La figure 2 montre un exemple de dispositif réalisé.

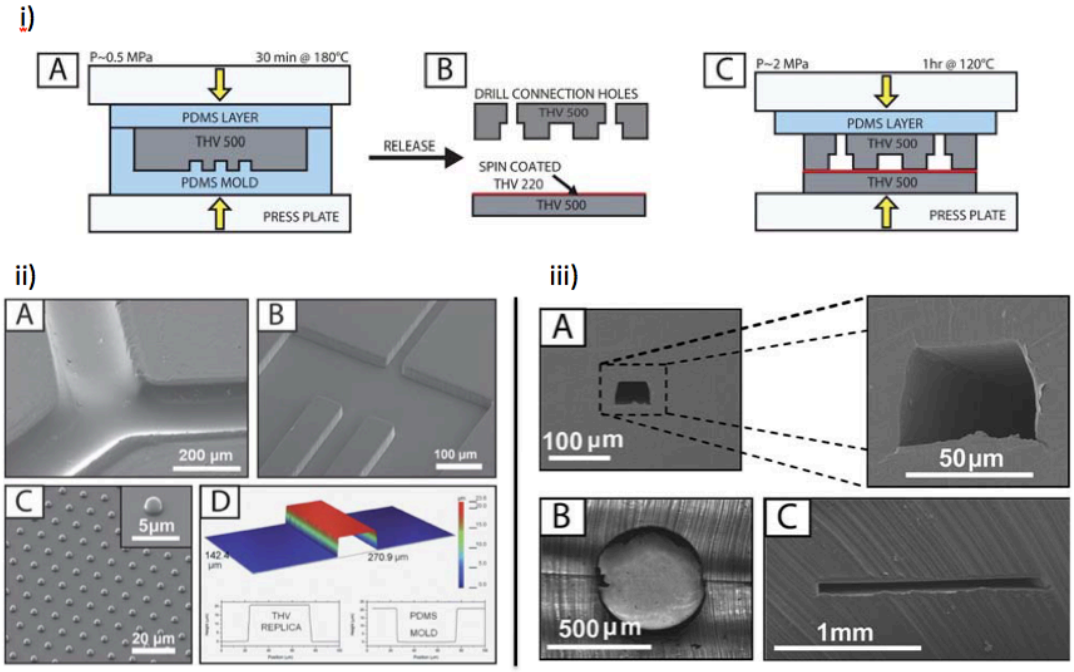


Figure 17 . i) Etapes de fabrication de puces THV : A. Des plaques sont préparées dans une presse chauffante (180°C) à l'aide de moules PDMS; B. Une solution saturée de THV200A dans l'acétone est enduite (épaisseur 1mm) sur une surface de THV 500; C. Les deux substrats sont collés sous pression à basse température 120°C (2MPa, 1h) évitant toute déformation des structures. ii) Images MEB de répliques en THV réalisées à partir de moules en PDMS : A. Canaux semi-circulaires (diamètre 300µm), B. Dispositif de génération de goutte (Flow focusing – hauteur des canaux 20µm), C. réseau hexagonal de micro-structures (2x2µm), D. Images en profilométrie optique d'un moule PDMS et d'une réplique THV (Fidélité de réplication <5%). iii) Images MEB de canaux fermés de différentes dimensions et géométries : A. Canal de profil carré de 50x 50µm2, B. Canaux circulaires de 500 µm de diamètre C. Canal élargi (2mmx100µm)

L'application principale de ce travail a été dédiée à la microfluidique de goutte notamment à la réalisation de PCR quantitative en goutte ainsi qu'à l'analyse du transcriptome à l'échelle de cellules uniques par RT-PCR.

B.5.2 Microstructuration et fonctionnalisation de surface

Au delà de la fabrication du dispositif microfluidique, se pose la question de l'intégration de fonctionnalité biologique au sein de microcanaux. Sur la base des compétences acquises lors de mes travaux de thèse et de post doctorat, j'ai développé plusieurs méthodes d'intégration utilisant des concepts d'auto assemblage ainsi que d'impression par contact.

- Intégration et organisation de particules magnétiques et biofonctionnalisées par assemblage dirigé et impression :

Le concept d'auto assemblage offre des perspectives particulièrement intéressantes pour organiser et intégrer, de façon rapide et parallèle, des entités micro ou nanométriques en structures bi ou tri dimensionnelles. Il représente une méthode générique de micro et nanostructuration originale, à bas coût qui permet l'intégration de matériaux fonctionnalisés et organisés. Sur la base de mon expérience à IBM Zurich, j'ai développé un procédé qui permet de diriger l'assemblage de suspensions de nanoparticules fonctionnalisées sur des surfaces microstructurées. Le dépôt est initié au niveau de la ligne de contact d'une goutte d'une suspension colloïdale : il repose sur le contrôle des forces capillaires ou des forces hydrodynamiques induites lors de l'évaporation de la suspension (Figure 18). Les résultats montrent qu'il est possible i) de contrôler très précisément le placement de particules de diamètre compris entre 20nm et 10µm, ii) d'obtenir des rendements d'assemblage supérieur à 99% et des vitesses de plusieurs 10 cm^2 par minutes iii) d'utiliser une large gamme de particules (matériaux, dimensions comprises entre quelques nanomètres et plusieurs micromètres) iv) de transférer et d'intégrer les assemblages réalisés par "microcontact printing". Cette approche versatile permet de créer des motifs de transfert pour la structuration de surface, d'introduire des sites biofonctionnalisés sur des surfaces d'analyse ou encore d'intégrer des motifs magnétiques dans des dispositifs microfluidiques. Tout récemment, nous avons montré qu'il est possible de multiplexer le dépôt c'est à dire d'intégrer, sur une même surface, des particules de natures différentes en contrôlant de façon déterministe la position de chaque population de particules. Cette méthode totalement originale repose sur la sélectivité des mécanismes d'assemblage capillaires vis à vis de la géométrie et de l'orientation des motifs de capture et permet de contrôler jusqu'à quatre populations de particules.

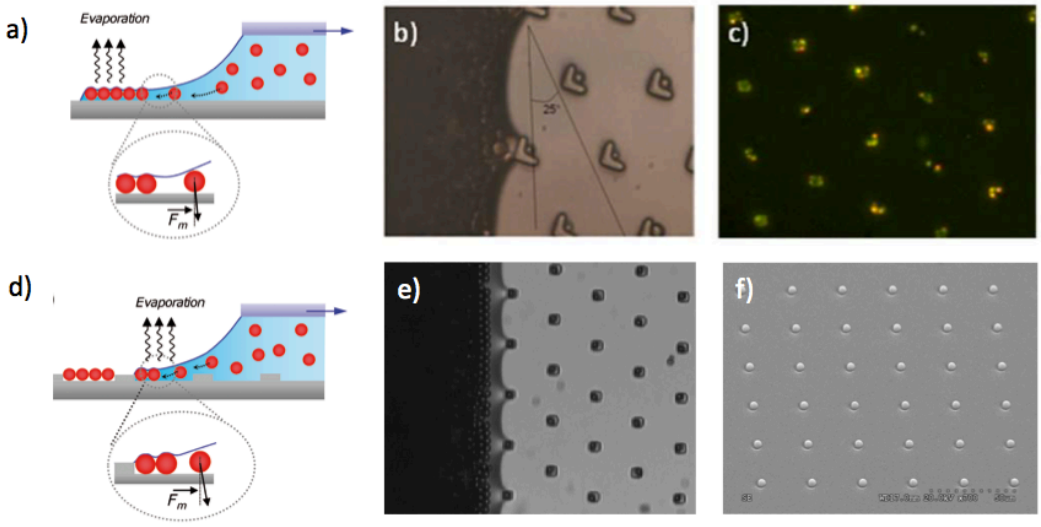


Figure 18 . Illustrations des mécanismes d'assemblage convectif (a) et capillaire (d). Images en microscopie en champ clair (b) et en fluorescence (d) de levures (S.Cerevisiae yat 340) assemblées sur une surface texturée de PDMS. Images en microscopie optique (e) et électronique (f) de particules magnétiques (4,5µm) organisées par assemblage capillaire sur un échantillon en PDMS structuré.

Dans un premier temps, j'ai souhaité utiliser cette méthode pour l'intégration et la manipulation de microparticules magnétiques au sein de dispositifs microfluidiques. L'objectif était d'utiliser la méthode

d'assemblage capillaire pour créer des réseaux denses de points d'ancrage magnétique sur lesquels sont autoassemblées des colonnes de particules magnétiques en suspension. Cette approche a été valorisée au travers de plusieurs applications [1,29–32] dont la principale est dédiée à la fabrication des dispositifs de capture de cellules cancéreuses. En effet, de par sa fiabilité et sa rapidité, cette méthode d'auto-assemblage capillaire a permis de compenser les limites des technologies utilisées jusqu'à lors pour la création de plots d'ancrage magnétiques (Photolithographie, dépôt de couche mince de Nickel et Lift off). Contrairement aux technologies silicium, l'assemblage capillaire offre un procédé de fabrication à bas coût et haut débit tout en offrant la possibilité d'augmenter la hauteur des plots d'ancrage et donc d'augmenter localement les forces magnétiques responsables de l'ancrage des colonnes. Cette technique est désormais utilisée en routine pour l'ancrage des micro-colonnes de captures de cellules cancéreuses. Une plate forme automatisée pour l'assemblage et l'intégration des particules a été développée et est utilisée en routine pour la réalisation des puces EPHESIA (Cf Paragraphe B.2)

Plus récemment nous avons démontré que cette approche pouvait être étendue à la localisation et l'immobilisation sélectives et localisées de cellules vivantes sur la base de capture par anticorps. La technique d'assemblage a été étendue à la création de réseaux multiplexés de particules fonctionnalisée et à leur intégration dans des systèmes microfluidiques. Ces réseaux permettent l'immobilisation sélectives de différents types cellulaires au sein de microcanaux[33] et donc la fabrication du puces à cellules.

- Microstructuration 2D/2,5D[b] de surface et biofonctionnalisation pour la capture cellulaire et le guidage de neurones

Ce projet a été mené avec l 'équipe de JM Peyrin et B. Brugg (IPBS, Paris) ainsi que la société Fluigent. Nous avons tout d'abord développé des puces microfluidiques permettant l'ensemencement et la culture de neurones issus de prélèvements chez la souris. Ces dispositifs intègrent des compartiments, isolés d'un point de vue hydrodynamique mais permettent la croissance d'axones d'un compartiment à l'autre pour créer des réseaux de neurones interconnectés. Ces dispositifs ont été réalisés en COC et PDMS suivant les méthodes décrites précédemment. Ces dispositifs ont permis des études préliminaires sur la plasticité neuronales en utilisant des techniques de stimulation optique[34].

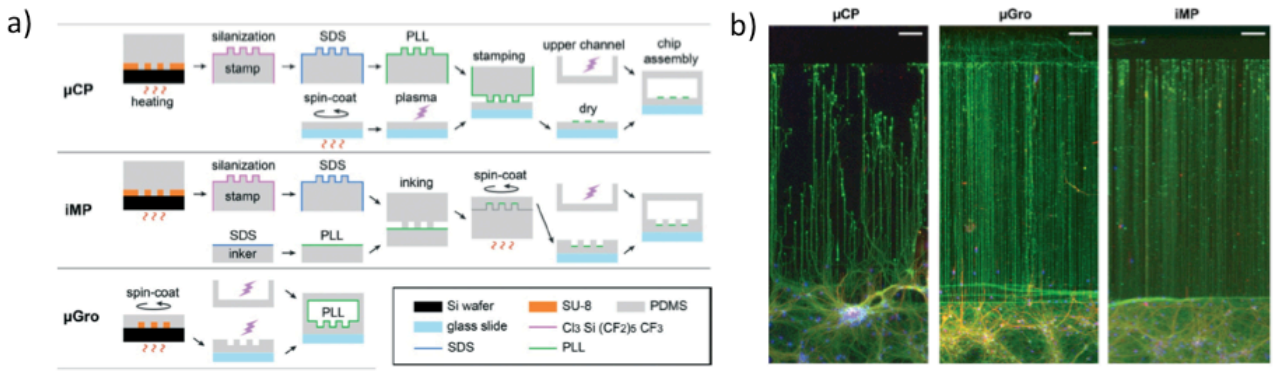


Figure 19 . a) Illustration de différentes méthodes mises en place pour la structuration et la biofonctionnalisation de surface pour la culture dirigée de Neurones. b) Images en microscopie par fluorescence de croissance de neurones sur des surfaces fonctionnalisées (µCP- µContact printing), microstructurés (µGro - µGroove) et combinant structure 2,5D et fonctionnalisation (IMP – In Mold Patterning).

[b] Nous entendons par Microstructuration 2,5D une surface comportant des motifs topographiques

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à mieux contrôler la croissance des axones dans des populations de neurones et étudié de façon systématique l'influence de la topographie et de la fonctionnalisation de surface sur la vitesse et l'orientation axonale. Pour cela nous avons développé des techniques dérivées du Micro Contact Printing qui permettent de contrôler simultanément la topographie et la fonctionnalisation de surface. [35] Ces technologies nous ont permis de montrer que la combinaison des forces de confinements par contrôle de la topographie couplées à une fonctionnalisation de surface favorisant l 'adhésion cellulaire fournissait une solution optimale pour le guidage de la croissance axonale. La boite à outils mise en place ouvre des perspectives particulièrement intéressantes pour la création d'architectures neuronales complexes, sujets qui sont en cours de développement au sein de l'équipe MMBM.

C . Projets de Recherche

Préambule

Depuis plus de 10 ans, j'ai consacré mes d'activités à des projets de recherche interdisciplinaires, à la frontière entre la physique, la chimie la biologie et la médecine. Ces projets m'ont permis de valoriser et d'approfondir mon savoir faire dans les micro et nanotechnologies pour le développement de dispositifs microfluidiques appliqués à l'analyse et au diagnostic biomédical. Ces travaux m'ont aussi permis d'acquérir une bonne compréhension des enjeux actuels dans le domaine de l'oncologie et attiré mon attention sur le rôle joué par le microenvironnement dans l'activation et la prolifération des mécanismes métastatiques.

Les trois axes de recherche que je souhaite développer dans les années à venir et que je présenterai dans ce chapitre auront pour objectif commun l'étude du microenvironnement et de son impact sur l'homéostasie des tissus. A moyen terme ces axes convergeront vers le développement de nouveaux modèles de tissus standardisés qui serviront d'outils de référence en oncologie et médecine régénérative.

Chaque axe reposera sur des collaborations étroites avec des partenaires biologistes et cliniciens. Pour la majorité de ces projets, la collaboration se traduit d'ores et déjà par le co-encadrement de doctorants, de post doctorants et d'ingénieurs issus de formations en physique ou en biologie. C'est le cas notamment de J. Creff, que je co-encadre avec A. Besson au CRCT, de E. Raude dont je serai responsable de l'encadrement avec P. Descargues et E. Pagès de la société Genoskin.

Le premier axe de recherche, transversal, a pour vocation de développer de nouvelles filières technologiques adaptées à la réalisation de microdispositifs et de microenvironnements cellulaires tridimensionnels. Ces développements concernent notamment l'impression additive (ou impression 3D) qui sera déclinée sur deux volets : le premier s'appuiera sur mon expérience dans la micro et nanostructuration et concerne la mise en place de procédés d'impression à haute résolution pour la réalisation de micro-dispositifs en particulier des dispositifs microfluidiques. Le deuxième, plus prospectif, consiste à développer de nouvelles approches pour l'impression 3D de biomatériaux et de cellules pour la reconstruction de tissus. Ces développements technologiques seront un soutien essentiel aux projets de recherche que je souhaite développer autour de la création de microenvironnements cellulaires et de modèles de tissus. Mon ambition est aussi d'apporter à l'équipe EliA du LAAS et au laboratoire dans son ensemble, de nouveaux outils génériques la réalisation de microsystèmes 3D, qui au delà de la biologie cellulaire, pourraient s'avérer pertinent dans le domaine des MEMs, de l'optique intégrée et de la robotique.

Pour cela, je m'appuierai sur un nouvel outil ou plus exactement une nouvelle plate forme « MultiFAB » dont je suis porteur et dont le financement vient d'être accepté par la région Occitanie. L'ambition de cette

plate forme (qui reprend par de nombreux aspects le concept de FabLab [c]) est de développer de nouvelles technologies et procédés innovants dans les domaines de l'Impression 3D et de la bioimpression et de mettre à disposition ce savoir faire à des partenaires industriels et académiques. Je souhaite que cette plate forme qui sera destinée autant au transfert industriel qu'à la recherche académique, soit un lieu d'échange, de rencontre entre différentes communautés et champs disciplinaires et qu'elle devienne un outil efficace de dissémination et d'innovation.

Un autre vecteur de développement sera constitué par le projet Européen HoliFAB qui démarrera fin 2017 et dans lequel je serai en charge du développement de nouvelles technologies d'impression et bioimpression pour la microfluidique et l'ingénierie des tissus.

L'ensemble de ces développements se fera en étroite collaboration avec des partenaires européens académiques (DCU, Institut Curie, IMRCP, LCC, CIRIMAT, Laboratoire Charles Coulomb, ...) et industriels (Sculpteo, Kloe, Microresist, TelLab, Gemypa, TAS, Essilor, Nanomade, …). Le soutien des services techniques du LAAS TEAM (au travers de la plate forme de technologie et du réseau Renatech) et du service I2C sera essentiel dans la gestion et la mise en œuvre de ces projets.

Le deuxième axe de recherche sur lequel je souhaite engager mon activité à moyen et à long terme, aura pour ambition de développer des modèles de microenvironnements cellulaires et de tissus sur la base des technologies développées dans le premier axe, en particulier la bioimpression. L'expérience que j'ai pu acquérir dans des projets interdisciplinaires à la frontière entre biologie analytique et la recherche clinique me permettra de développer de nouveaux outils pour étudier le rôle du microenvironnement dans certains mécanismes de prolifération du cancer et de régénération tissulaire. Pour cela, je m'intéresserai à deux modèles de tissus : l'os et l'épithélium intestinal pour lesquels la reconstitution de la topologie, de l'hétérogénéité mécanique, cellulaire, biochimique est essentielle dans la prolifération cellulaire et la fonctionnalité des tissus. Mon objectif est de montrer que cette approche permet d'atteindre la reproductibilité et la flexibilité nécessaires à la création de modèles de microenvironnements de culture 3D pertinents qui permettent aux cellules imprimées de se différencier, de proliférer afin de reconstruire un tissu vivant fonctionnel. Il s'agit pour moi de développer de nouveaux outils standardisés pour l'étude de cellules et de tissus. Ces deux projets seront menés en collaboration avec le StromaLab à Toulouse (L. Casteilla, F. Deschazeau), le CRCT (A. Besson, P. Cordelier), l'IRSD (N. Vergnolle, A. Ferrand) ainsi que l'institut Curie (J. Camonis, S. Descroix, J.L. Viovy) et l'IMRCP (J. Fittremann).

Enfin le troisième axe de recherche aura pour ambition de développer des dispositifs microfluidiques implantables qui permettront de créer des structures artificielles de vascularisation dans les tissus. Ce projet prend sa source dans une collaboration que je viens d'établir avec la société Genoskin qui développe des modèles in vitro d'explants de peau humaine pour des applications en cosmétologie, pharmacologie et oncologie. Ce projet aura un impact industriel fort puisque son premier objectif sera de concevoir un nouveau modèle commercial pour Genoskin. Il constitue également un contexte particulièrement favorable pour appréhender les mécanismes et paramètres essentiels dans l'influence de la vascularisation sur l'homéostasie tissulaire, éléments que je souhaite ensuite intégrer dans les modèles de tissus développés dans l'axe 2. Ce projet sera développé dans le cadre de la thèse (CIFRE) d'E. Raude avec Genoskin et soutenu par une demande de fonds Readynov auprès de la région Occitanie.

[c] Définition du MIT et de la LabFundation : http://fab.cba.mit.edu/

L'ensemble de ces 3 axes converge vers un but ultime à long terme qui est l'identification et la compréhension des mécanismes et paramètres du microenvironnement qui influencent l'homéostasie des tissus.

C.1 Axe de recherche 1 : Développement des technologies d'impression et de bioimpression 3D

Projets : MultiFAB (Région Occitanie/FEDER, 2017-2020), HoliFAB (H2020, Pilot Line, 2017 - 2020), Equipex LEAF

Encadrements : Remi Courson (Ingénieur), J. Foncy (Post Doct.), A. Accardo (Post Doct.), G. Saint Martin (Master 2 INSAT), B. Garlan (Master 2 UTC)

Publications CV n° 1, 8

Brevet n° 1

C.1.1 Contexte et objectifs

Les technologies de fabrication additive constituent un nouveau paradigme pour la fabrication de dispositifs fonctionnels complexes et de microsystèmes intégrés. La possibilité de concevoir et d'imprimer des objets tridimensionnels, à haute résolution, selon un schéma de fabrication direct et adapté au prototypage rapide, a le potentiel de transformer les méthodes actuelles de production dans le domaine de la recherche et de l'industrie. Les domaines d'applications sont très vastes et multi-échelles : ils couvrent aussi bien le secteur de l'aérospatial, de l'aéronautique, de l'électronique, de l'optique ou encore du biomédical. Dans ce dernier domaine, au delà des applications déjà connues aux implants et aux prothèses dentaires, les technologies d'impression additives ouvrent de nouvelles perspectives pour la bio-analyse, la pharmacologie et la clinique. Un premier exemple d'application est celui des laboratoires sur puce pour lesquels les technologies de fabrication 3D devraient permettent des gains significatifs pour l'intégration et la mise en place de nouvelles fonctionnalités dans des systèmes dédiés à la préparation d'échantillons, l'analyse et au diagnostic. Un deuxième exemple d'application est celui de la bio-impression qui présage de nombreuses innovations dans le domaine de la fabrication de modèles de tissus vivants qu'il s'agisse d'applications in vitro (compréhension des mécanismes de prolifération cancéreuse, diagnostic, pharmacologie), d'applications en ingénierie des tissus ou en médecine régénérative.

Que l'on considère l'application des technologies de fabrication additive pour la réalisation de microsystèmes intégrés, d'implants ou encore de dispositifs microfluidiques, un des verrous majeurs reste probablement celui de la résolution. Bien que les premier concepts d'impression additive aient été proposés il y plus de trente ans et, malgré des progrès importants quant à la taille des objets réalisés, rares sont les techniques qui permettent l'impression d'objets macroscopiques (typiquement > 1cm3) avec une résolution inférieure à 50µm (Figure 3). Cette résolution est suffisante pour couvrir la plupart des applications « grand public » mais elle est encore insuffisante pour le prototypage ou la production de systèmes miniaturisés. Des systèmes à très haute résolution tels que ceux basés sur la lithographie multi-photons (ex : Nanoscribe GmbH) permettent de réaliser des dispositifs avec une taille de voxel de l'ordre de 200 nm mais les dimensions maximales et les vitesses d'écritures rendent encore prohibitives la production de dispositifs macroscopiques (ex : puces microfluidiques, dispositifs MEMs, systèmes optiques, capteurs,…). Comme illustré sur la Figure 20, il me paraît essentiel de combler le « gap » existant dans les échelles de résolution entre les technologies de fabrication additives (env. 50µm) et les technologies issues de la mi-

croélectronique sur silicium qui permettent la réalisation de structures sub-microniques mais qui nécessitent des environnements technologiques lourds (ex : salles blanches) et restent limitées à des approches planaires à 2D ou bien à des échantillons de très petites dimensions (volumes <1mm3). A ce premier verrou technologique s'ajoute également la nécessité de développer des matériaux fonctionnels, intelligents qui permettront d'associer des fonctions aux architectures 3D complexes générées. Il s'agit de développer de nouveaux procédés de fabrication permettant de mettre en forme ces matériaux à des résolutions microniques mais aussi de générer des structures multimatériaux hétérogènes. Ainsi, au delà des avantages apportés pour le prototypage rapide, je suis convaincu que la possibilité de réaliser des structures 3D complexes, jusqu'à présent inaccessibles à des échelles micrométriques, en utilisant une large gamme de matériaux fonctionnels permettra d'ouvrir de nouveaux champs de recherche dans le domaine des micro et nanotechnologies mais aussi et surtout de la biologie.

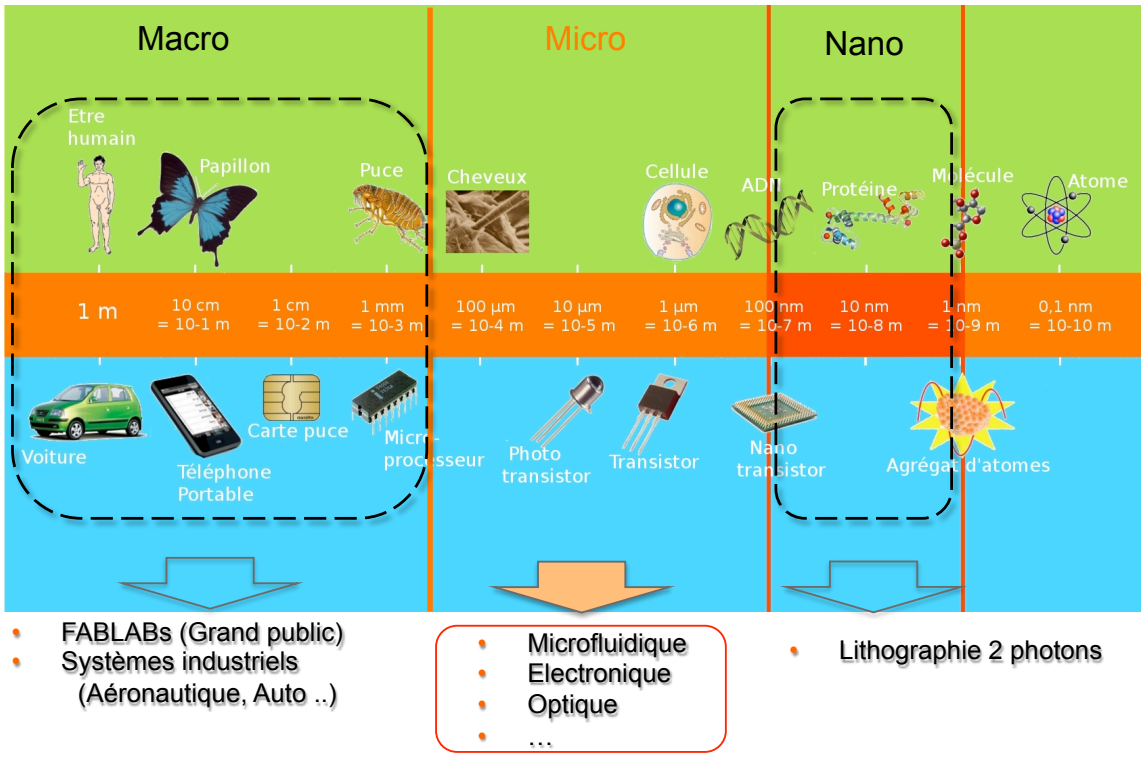


Figure 20 . Illustration des gammes d'échelles couvertes à l'heure actuelle par les technologies de fabrication additives.

Comme en témoignent l'explosion du nombre de publications dans le domaine [36–38] ainsi que les dernières analyses économiques et sociales [d] les perspectives d'applications de l'impression additive s'ouvrent désormais vers de nouveaux domaines liés au biomédical et la santé. Les technologies d'impression 3D avaient déjà montré leur pertinence pour la réalisation d'implant ou de prothèse mais elles s'ouvrent désormais à un nouveau champ d'application qui est la reconstruction du vivant. Dans ce contexte, la bio-impression 3D (l'impression 3D de matériel vivant ou mimant le vivant) est une approche très prometteuse

[d] Gartner – Predicts 2016 : 3D Printing Disrupts Healthcare and Manufacturing, https://www.gartner.com/doc/3171223
International Data Corporation, http://www.idc.com/
Persistence Market research – 3D Bioprinting Market : Global Industry Analysis and Forecast 2015-2023, http://www.persistencemarketresearch.com

pour l'ingénierie tissulaire et la création d'organes. A terme est visée la création de modèles de tissus vivants pour l'étude de pathologies (ex: cancer, maladies infectieuses) ainsi que pour la médecine régénérative (ex: organes biomimétiques, implants actifs, greffe de tissus). La bio-impression vise ainsi à mettre à disposition des biologistes et des médecins des procédés permettant de mettre en forme en 3D des encres biologiques contenant ou non des cellules pour générer des microenvironnements de culture propices à la prolifération et la différenciation cellulaire. Ces microenvironnements doivent fournir les conditions phisiologiques nécessaire à la formation d'un tissu viable et fonctionnel.

Ce champ interdisciplinaire est encore en pleine émergence et il requiert de nombreux développements tant au niveau des matériaux utilisés pour reproduire des tissus vivants que des équipements et des procédés à mettre en œuvre pour organiser et préserver la fonctionnalité de ces derniers. De nombreux efforts doivent également être consacrés aux aspects logiciels d'une part, pour l'utilisation de données d'imagerie et d'autre part, pour l'établissement de règles de design simples permettant de reconstruire un organe vivant et de maintenir sa fonctionnalité au long terme. Dans tous les cas, ces développements reposent sur une meilleure connaissance des processus biologiques impliqués dans la physiologie des tissus et des organes, de la compréhension des mécanismes de différenciation cellulaire et d'interaction avec leur microenvironnement et ils requièrent une approche de recherche et développement interdisciplinaire.

Mon souhait est d'appuyer mes projets de recherche futurs sur une activité de développement technologique transversale, qui aura pour vocation de proposer de nouveaux concepts de fabrication additive pour lever plusieurs verrous existants dans les domaines de la microfluidique, des microsystèmes ainsi que de l'ingénierie des tissus.

L'impact de ces activités se fera à plusieurs niveaux :

- **Projets de recherche** : Il s'agit de développer des technologies de rupture qui seront à la base des projets de recherche que je souhaite mettre en oeuvre dans le domaine de la microfluidique, des microsystèmes et plus particulièrement de l'ingénierie tissulaire. Ces technologies seront également mises à disposition des chercheurs du laboratoire pour le développement de nouvelles applications dans le domaine de l'optique, des MEMs ou encore de la robotique. (Plusieurs collaborations ont d'ores et déjà été initiées avec l'équipe MEMs, ou encore avec le department HOPES pour la realisation de microdispositifs de communication RF.)
- **Transfert technologique et recherche translationnelle** : Une large partie des technologies développées dans ces travaux a pour vocation à être transférée à nos partenaires biologistes et cliniciens. En effet, la réalisation de modèles de tissus vivants standardisés et fonctionnels constitue un enjeu majeur pour la compréhension des mécanismes de régénération et de dégénérescence cellulaire. Face aux limites des outils actuels (culture 2D, sphéroides, modèles animaux, etc) les technologies de bioimpression sont susceptibles de fournir des outils performants et adaptés autant à la recherche fondamentale qu'à la recherche clinique
- **Valorisation et transfert industriel** : Une large part de ces activités se fera en étroite collaboration avec des partenaires industriels. La valorisation des technologies développées se fera par le dépôt de brevets, par un transfert industriel et à terme une commercialisation potentielle. Un premier brevet (Bioimpression 3D) vient d'être déposé et un premier prototype d'imprimante 3D à haute résolution a été développé en 2017 avec la société Kloé dans le cadre d'un contrat de collaboration. La prise en compte des contraintes et des besoins au niveau industriel est à mon sens essentiels à mon activité. Elle seront à la base

du projet Européen Holifab qui a vocation a développer de nouvelles lignes pilotes de fabrication 3D et dans le quel de nombreux partenaires industriels sont impliqués (Sculpteo, Microresist, …)

- **Une plate forme technologique interdisciplinaire**: Je souhaite mettre en place une plate forme de type Fablab ouverte aux partenaires industriels tout comme aux partenaires académiques. Il s'agit de mettre en avant les activités du laboratoire et les avancées technologiques pour ouvrir de nouvelles collaborations de recherche et favoriser le transfert industriel de notre savoir faire. Cette plate forme verra le jour grâce au projet MultiFab soutenu par la Région et l'Europe au travers de l'appel à projet FabRégion que je coordonne avec P. Tailhade (CIRIMAT)
- **L'enseignement** : La dissémination des technologies développées est une part essentielle de mes activités. Les activités du laboratoires et de la plate forme MultiFab seront disséminées par le biais d'enseignements et de travaux pratiques qui seront disponibles pour des chercheurs, ingénieurs et étudiants au travers de différents filières : Réseau renatech , GdR de Microfluidique, l'INSA (filière Nano du département de Génie Physique). Une filière de formation continue (CNRS) sera également mise en place.
- **L'éthique** : Les possibilités offertes par la bioimpression pour la régénération de tissus et à terme d'organes impliquent un accompagnement et une analyse approfondis à travers le prisme de la réflexion éthique . Ces aspects seront abordés dans le cadre de la cellule éthique mise en place au LAAS CNRS

C.1.2 Impression 3D haute résolution pour la fabrication de microsystèmes

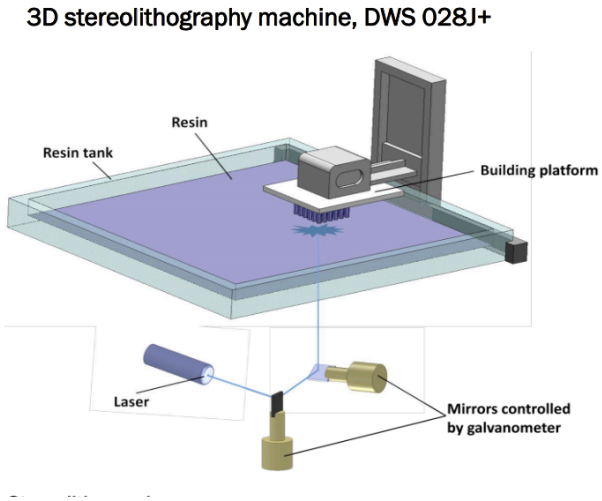
Comme nous avons pu l'aborder en introduction, une des principales limites dans l'utilisation des technologies de fabrication additives dans le domaine des microtechnologies est principalement liée au manque de résolution (la limite des 50 µm reste difficile à franchir) et au faible contrôle dimensionnel des équipements présents sur le marché. Une autre limite est liée au fait que l'introduction de nouvelles technologies de fabrication impose implicitement le développement de nouveaux matériaux et de procédés adaptés à l'application visée. Ces contraintes sont particulièrement importantes dans les domaines de la microélectronique, de l'optique intégrée, de la microfluidique, des dispositifs médicaux de détection, de l'ingénierie des tissus pour lesquelles les méthodes de microfabrication 2D actuelles, bien qu'offrant une résolution nanométrique, restent incapables de structurer la matière dans la troisième dimension. Dans ces applications, la mise au point de méthodes et de procédés d'intégration et de structuration 3D de matériaux fonctionnels à des dimensions micrométriques est essentielle pour poursuivre les développements de R&D tant au niveau académique qu'au niveau industriel.

Parmi les nombreuses approches existantes dans le domaine de l'impression 3D, la stéréolithographie (basée sur un principe de photo-polymérisation assistée par laser) constitue une des techniques les plus prometteuses pour combler les limitations actuelles en termes de résolution. Le principe de l'impression 3D par stéréolithographie a été proposé pour la première fois en 1984 par un groupe de chercheur Français (JC André, A. Le Mehaute, O. de Witte). La stéréolithographie permet l'impression d'un objet tridimensionnel par empilement de couches successives qui sont réalisées à partir d'un matériau photosensible. Un porte échantillon mobile est plongé dans un réservoir contenant le matériau désiré. Une source laser permet la polymérisation du matériau dans chaque couche avec une résolution imposée par la taille du faisceau et le déplacement mécanique du porte échantillon. Ce concept générique est utilisé par la grande majorité des industriels tels que 3D systems, DWS, EnvisionTEC, Stratasys. Il est intéressant de noter que outre des améliorations logicielles importantes, la majorité des systèmes de stéréo-lithographie utilisés à l'heure actuelles restent limités par leur faible résolution planaire (la limite des 50 µm reste difficile à franchir) et une incapacité à réaliser des impressions multi-matériaux.

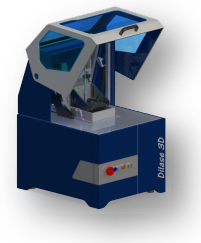
Depuis mon arrivée au laboratoire, j'ai mis en place un projet de collaboration avec la société Kloé pour réaliser un développement conjoint de nouvelles technologies de stéréolithographie. Cette activité s'appuie en partie sur le projet Equipex LEAF (E. Dubois, IEMN ; A.M. Gué, LAAS) auquel je suis associé et qui a pour vocation de développer de nouvelles technologies de prototypage et de production 2D/3D pour l'électronique flexible. Cette activité a permis le développement d'un premier prototype d'imprimante 3D à haute résolution nommée DILASE 3D. Cet équipement, construit sur la base des technologies propriétaires de Kloé et d'un cahier des charges que nous avons établi, reprend les principes généraux de la stéréolithographie laser mais intègre des concepts issus des technologies de photolithographie par écriture directe, lui permettant ainsi d'atteindre une résolution X,Y,Z de l'ordre de 5µm. Les spécificités de la machine sont décrites sur la Figure 21.

a)

b)



c)



Technical specifications :

- Targeted Resolution X,Y : 5um
- Targeted Resolution Z : 5-100um
- Laser Wavelength : 375 or 405 nm (50 mW)
- Samples size (10 x 10 x 5 cm - X,Y,Z)

Figure 21 . a) image de l'imprimante DILASE 3D développée conjointement avec la société Kloé (Montpellier). b) Principe de fontionnement de la DILASE 3D derive de la stéréolithographie et c) performances et specifications techniques.

A ma connaissance, les équipements DILASE 3D constituent l'état de l'art en terme de résolution dans le domaine de la stéréolithographie. Seul une compagnie américaine (Old world Labs[e]) propose une résolution théorique de 1µm mais aucune démonstration des performances réelles de l'équipement n'a pu être apportée à ce jour.

Sur la base de ce système, nous avons lancé depuis un an environ, une première phase de développement et de validation. Les premiers résultats obtenus sont particulièrement prometteurs. Ils montrent d'une part

[e] https://www.oldworldlabs.com/news-about-old-world-labs

une résolution effective de la machine <5µm, la possibilité de réaliser des structures à hauts rapports d'aspect, suspendues avec une très bonne reproductibilité. La Figure 22 présente quelques exemples de réalisations de structures effectuées à partir de matériaux DS3000 (Résine Photo Sensible, DWS, Italy) ou plus récemment en Hydrogel (PEGDA) comme nous le verrons dans le paragraphe suivant.

Au niveau applicatif ce système de stéréolithographie sera à la base de plusieurs projets de recherche :

- La réalisation de support de culture 3D reproduisant la topologie et certaines propriétés mécaniques des microenvironnements naturels de cellules : nous nous intéresserons notamment à la reproduction de structures mimant l'épithélium intestinal (Cf Paragraphe C.2.2) pour des études en oncologie ainsi qu'à la reproduction de structures osseuses poreuses (Cf Paragraphe C.2.3) pour des applications en médecine régénérative avec le StromaLab, L'institut Curie et l'IPBS.

- La fabrication de puces microfluidiques complexes pour des application de tri, filtration vascularisation et culture cellulaire. Ces développements seront réalisés dans le cadre des projets Européens HoliFab décrit précédemment et du projet de recherche initié avec la société Genoskin (Cf Paragraphe C.3)

Plusieurs projets de recherche collaboratifs ont également été mis en place sur la base de cette technologie :

- La réalisation de dispositifs MEMs (bioplumes, structures piezoélectriques) en collaboration avec T. Leichlé, L. Nicu (Equipe MEMs, LAAS CNRS).

- La réalisation de structures de type Antenne Radiofréquence en collaboration avec P. Pons, H. Aubert (Equipe MINC, LAAS CNRS)

- La réalisation de fantômes osseux pour la radiothérapie avec l'équipe de M. Bardies au CRCT à Toulouse.

De façon plus prospective, ces développements permettront d'ouvrir de nouvelles filières technologiques en microfluidique mais aussi en électronique, en optique ou pour les MEMs et de répondre à des besoins de fabrication de prototypage rapide et de courtes/moyennes séries.

Au niveau technologique, plusieurs axes de développement seront mis en place [f], l'objectif étant de dispositf au sein du LAAS CNRS d'une machine constituant l'état de l'art dans le domaine :

- Le développement d'un système multi-résolutions, afin d'améliorer la vitesse d'écriture d'impression et de pousser encore plus loin les limites de résolution.

- L'utilisation de sources multi longueur d'onde UV qui permettront d'améliorer la résolution suivant l'axe Z et de mieux contrôler la réalisation de structures suspendues.

- La démonstration de la compatibilité du système avec des matériaux variés, tels que des matériaux conducteurs, magnétiques ou optiquement actifs. Une partie de ces développements se fera en collaboration avec l'équipe de P. Tailhade du CIRIMAT (Toulouse) avec qui je porte le projet MultiFab.

L'ensemble de ces développements se fera avec l'appui des services TEAM et I2C du LAAS CNRS et s'inscrira dans le cadre du projet MultiFAB porté avec le CIRIMAT ainsi que dans le cadre du projet Européen HoliFab. Ces deux projets auront pour vocation d'amener les procédés et les machines développées au LAAS CNRS (comprenant également le système de bioimpression LAMP qui sera décrit plus loin) à un stade industriel et disséminer le savoir faire et les procédés développées à la communauté scientifique à des fins de collaboration de recherche et d'enseignement.

[f] Certains de ces développements étant confidentiels pour la société Kloé, ils ne seront pas abordés dans ce manuscrit

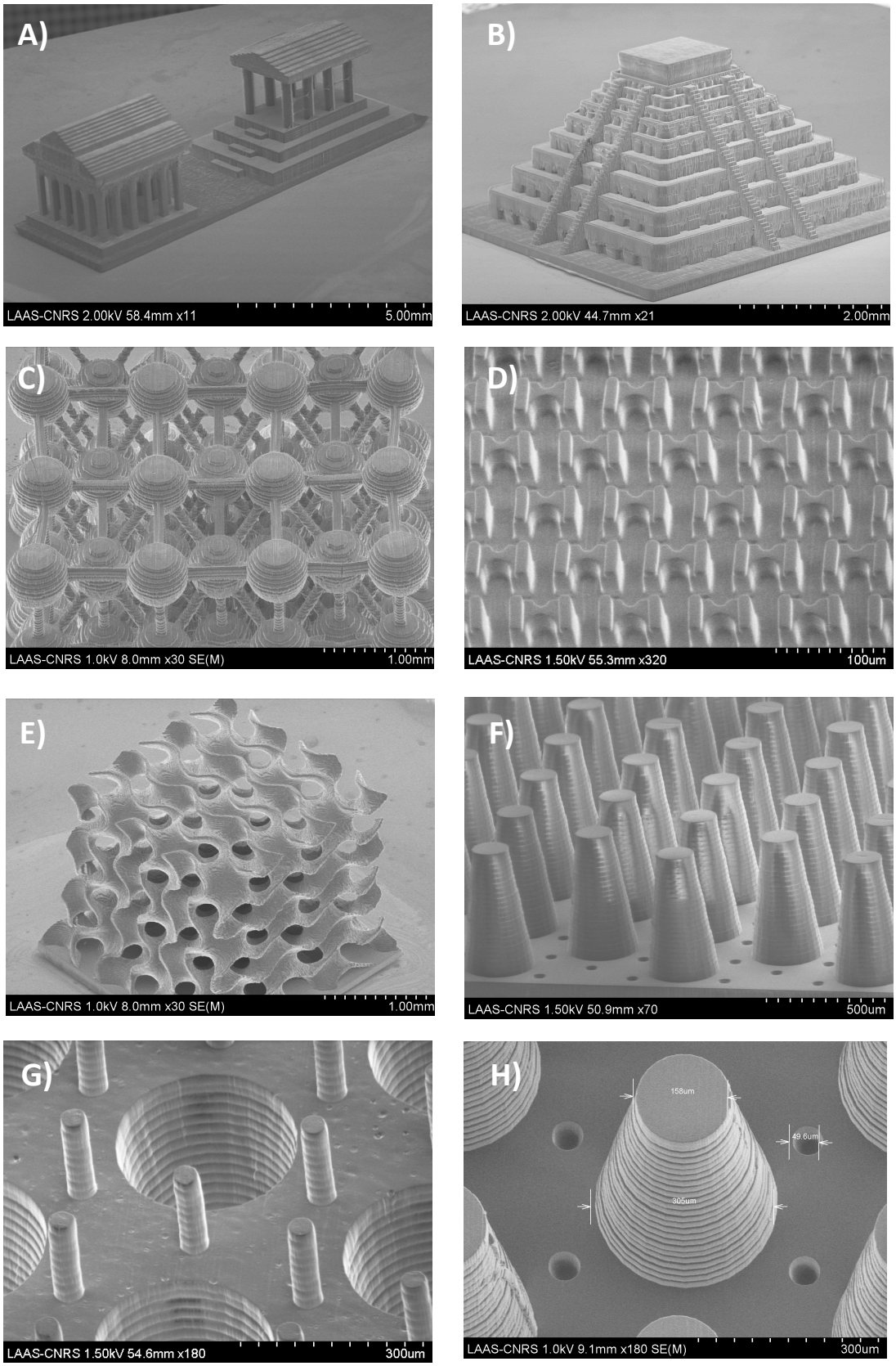


Figure 22 . Microstructures 3D imprimées sur le système DILASE 3D (Kloé) à partir de résine DS3000 (DWS) La taille minium de structure est de l'ordre de 5µm avec la possibilité de réaliser des structures suspendues ainsi que des rapport d'aspect de l'ordre de 1:10.

C.1.3 BioImpression 3D pour le développement de modèles de tissus fonctionnels

Préambule

La fabrication de modèle 3D de tissus humains ou animaux qui reproduisent la structure, la fonction et l'évolution des tissus in vivo constitue un enjeu fondamental en biologie cellulaire pour toutes les applications liées à la recherche et la mise au point de médicaments, la compréhension des mécanismes à l'origine de l'homéostasie ou des pathologies (en particulier le cancer) ou encore la médecine régénérative. [39–42]

Le projet de recherche que je souhaite développer a pour objectif de développer de nouvelles technologies de bioimpression pour réaliser des modèles in vitro de microenvironnements cellulaires 3D reproduisant les caractéristiques physiques (ex: topologie, propriétés mécaniques, porosité), biochimiques (ex :dégradabilité, nature de la matrice) et biologique (ex: ensemencement de différents type cellulaires) essentielles. Mon objectif est d'exploiter les capacités nouvelles offertes par l'impression 3D pour compenser les limites des modèles actuels (ex: 2D, 3D, Sphéroïdes, animaux) en reproduisant finement l'architecture et l'hétérogénéité cellulaires, critères indispensables pour des études systématiques, reproductibles et quantitatives [43]. A moyen terme, mon ambition est de générer des modèles optimisés et standardisés qui pourront servir d'outils de recherche en biologie et en médecine et en pharmacologie.

Je souhaite développer deux nouveaux concepts de technologies de bioimpression à haute résolution et montrer leur avantage pour la réalisation de modèles de tissus. Deux concepts seront étudiés : le premier repose sur la technologie DILASE 3D que nous venons de détailler et que nous exploiterons pour l'impression de biomatériaux et la création de supports de culture tridimensionnels. Le deuxième concept repose sur une technologie totalement originale, que j'ai développée depuis mon arrivée au sein du LAAS CNRS, dédiée exclusivement à la bioimpression de modèles tissulaires hétérogènes. Cette technologie (LAMP – *Light Assisted Microfluidic Printing*), qui vient d'être brevetée, combine des concepts de microfluidique et d'optique pour l'assemblage en 3D de cellules vivantes, de biomolécules et de structures composées de matrice extracellulaire. Cette technologie permet de lever plusieurs verrous dans le domaine de la bioimpression et offrira une plate forme reproductible et automatisée pour la production de modèles de tissus fonctionnels.

Modèles tridimensionnels pour la culture cellulaire

A l'heure actuelle, une majorité des approches permettant l'adhésion et la croissance cellulaire restent limitées à la fabrication de structures en deux dimensions [44,45] qui ne correspondent pas à l'environnement de croissance naturel à trois dimensions des cellules et ne permettent pas de restituer les interactions cellules cellules et cellules-matrice (Figure 23). La reconstitution de supports de culture 3D sous la forme de sphéroïdes générés à partir de matrice extra-cellulaire sont des modèles alternatifs particulièrement intéressants qui ont déjà montré leur potentiel pour élucider les mécanismes cellulaires dans le cas de la morphogénèse ou du cancer permettant ainsi de relier études in-vitro et in-vivo [46] . Cependant, les approches proposées ne permettent pas de reproduire l'hétérogénéité multi-échelle des tissus (jusqu'à l'échelle de la cellule individuelle) ainsi que les interfaces et les voies de communication présentes au sein de ces tissus. Ce dernier paramètre englobe par exemple les interfaces entre le système vasculaire (endothélium vasculaire) et les tissus environnant qui est pourtant essentiel afin de garantir la viabilité et la fonctionnalité des organes. Par ailleurs, il reste très difficile de reproduire au sein de ce type de modèles les sollicitations mé-

caniques auxquelles sont soumis les tissus, qu'il s'agisse de forces de cisaillement induites par un flux, ou les forces de compression et de tension qui sont fondamentales pour l'homéostasie des tissus. [47,48]

Les approches basées sur l'utilisation de la microfluidiques et sur le développement des organes sur puce paraissent avantageuse pour reproduire certains aspects ou fonctionnalités des tissus (ex: vascularisation, déformation) mais les contraintes liées à la fabrication de ces dispositifs, basés sur des technologies planaires, limitent également la possibilité de reproduire la structure 3D et l'hétérogénéité multi-échelles des tissus.[47]

Enfin, bien que les modèles animaux permettent d'obtenir les résultats les plus pertinents sur l'efficacité d'un médicament ou les mécanismes impliqué dans l'évolution des tissus, cette approche présente des inconvénients désormais bien identifiés. Au delà des problèmes éthiques, ces modèles posent des problèmes de reproductibilité et de variabilité d'un individu à l'autre. Par ailleurs, ces modèles, malgré les nombreuses sophistications apportées au cours des années, ne sont pas représentatifs des tissus humains ni des pathologies associées (cancer, maladies auto immunes, réponses thérapeutiques, etc). [49,50]

Dans ce contexte les nouvelles stratégies de fabrication basées sur la Bioimpression apparaissent comme un nouveau paradigme dans le domaine de l'ingénierie des tissus. [36,38,51,37] Les approches actuelles dans le domaine sont basées soit sur la fabrication d'échafaudages (« scaffolds ») qui servent de support mécanique à des cellules et des tissus mous soit sur l'impression directe de cellules ou de cellules ensemencées dans un matériau mimant une matrice extra cellulaire. Cette dernière approche est probablement la plus intrigante et la plus sophistiquée à ce jour [37]. Conceptuellement elle permet de reproduire simultanément la topologie du microenvironnement cellulaire et son hétérogénéité au niveau cellulaire, biochimique et mécanique. En d'autre termes elle permet théoriquement de contrôler localement, dans les trois dimensions, la composition locale de chaque voxel composant le tissus (par exemple, contrôler la position et la distribution de chaque cellule composant le tissus reconstruit) (Figure 23).

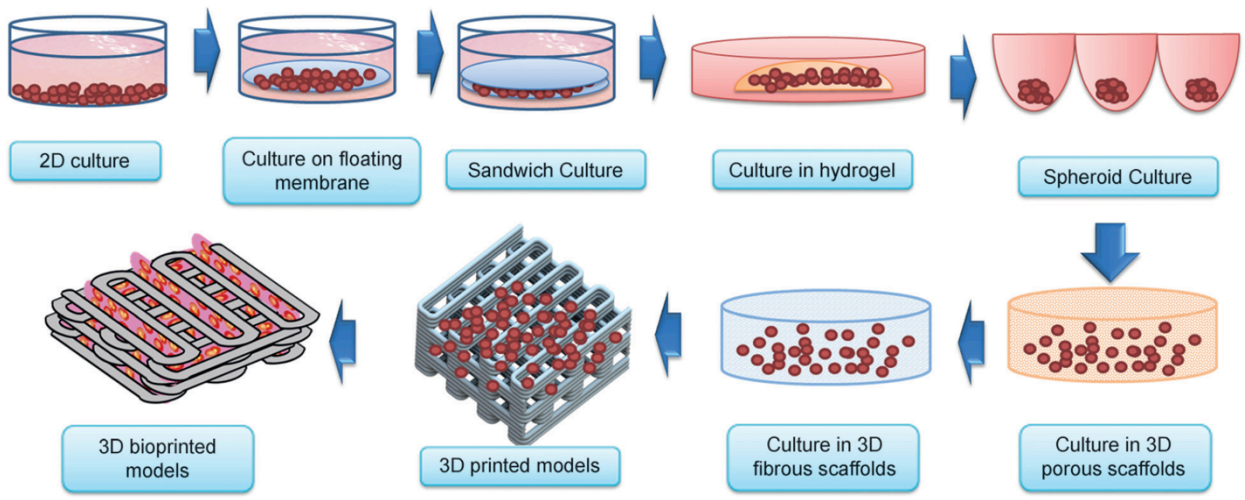


Figure 23 . Evolution des modèles de culture cellulaire: les modèles 2D, utilisés depuis de nombreuses années, restent encore majoritairement employés pour les études de routine. Des évolutions de ces modèles ont permis l'intégration de membranes poreuses et de culture 2D superposées. L'utilisation d'hydrogels puis de sphéroïdes ont ouvert la voie de la culture 3D. L'introduction de l'impression 3D a permis de générer des structures support (scaffolds) sur lesquelles sont ensemencées des cellules avec un contrôle de l'architecture et de la géométrie du microenviron-

nement. La Bioimpression, permet de pousser encore plus en avant la complexité et la relevance des modèles de culture en permettant la fabrication simultanée de structures de soutien et leur ensemencement simultanée avec différents types cellulaires.[37]

L'objectif est d'organiser dans l'espace des cellules différenciées et à plus long terme de contrôler la distribution de cellules non différenciées dans un microenvironnement 3D qui permettra leur prolifération, leur différenciation et la formation de tissus fonctionnels. Cette organisation peut être reproduite directement à partir de données numériques obtenues par imagerie de tissus cellulaires réels (CT Scans, histopathologie, imagerie confocale,etc) ce qui confère à la Bioimpression des avantages considérables pour reproduire les spécificités et les variabilités des tissus réels. Par ailleurs elle offre une opportunité unique de fabriquer des modèles de tissus à partir des cellules collectées directement sur un patient donné : cette perspective est particulièrement intéressante pour des applications in vitro telles que pour le diagnostic et la pharmacologie, et in vivo pour la médecine régénérative.

Les avantages potentiels de la bioimpression peuvent être synthétisés:

- Fabrication automatisée et reproductible de modèles
- Possibilité de standardisation
- Ajustement des propriétés du microenvironnement et de la distribution cellulaire en 3D
- Contrôle de la morphologie et de l'architecture des tissus en 3D
- Utilisation de lignées cellulaires ou de cellules primaires (éventuellement souches)
- Possibilité d'intégration de structures vasculaires

En considérant l'ensemble de ces avantages potentiels, on comprend aisément que la bioimpression suscite des attentes considérables en biologie et en médecine. Toutefois, même si nous pouvons rester convaincu que cette technologie permettra effectivement de générer des modèles tissulaires pertinents dans les années à venir, des progrès restent à réaliser dans la compréhension des paramètres contrôlant la prolifération et le devenir des cellules, les voies de communication à instaurer (entre les cellules elles mêmes et entre les cellules et leur environnement biochimique), la fonctionnalité du tissu final. La création d'un organe fonctionnel, potentiellement implantable reste pour l'instant inaccessible. Valoriser les progrès du domaine mais aussi communiquer sur les difficultés scientifiques et éthiques à franchir sont deux axes essentiels pour mieux discerner les réels potentiels de la bioimpression et parfois tempérer les « fantasmes » qu'elle suscite.

Un nouveau concept de Bioimpression pour la fabrication de microenvironnements cellulaires : la technologie LAMP* (Light Assisted Microfluidic Printing)

Parmi les approches actuelles, nous pouvons distinguer quatre familles principales de technologies de bioimpression : la microextrusion[52–54,55,56], la stéréolithographie, l'impression jet d'encre[57,58] et les techniques dites « assistées par laser » [59–62]. Ces technologies ont fait l'objet de nombreuses revues qui détaillent leur principe de fonctionnement. [36,63] La plupart de ces approches n'atteignent pas la résolution de la cellule individuelle où n'offrent pas la flexibilité nécessaire pour reproduire l'architecture ou l'hétérogénéité (rigidité, composition, architecture, distribution cellulaire, concentration de facteurs) des tissus [46,64,65].

Une analyse exhaustive de la littérature et des solutions commerciales proposées montrent que la plupart des technologies de fabrication et de bioimpression reportées à ce jour ne permettent pas de combiner simultanément l'impression de multiples matériaux avec une résolution à l'échelle cellulaire, typiquement inférieure ou égale à 10µm. Il s'agit d'un verrou technologique majeur que je souhaite lever par la validation d'un nouveau concept de bioimpression. Celui ci devrait satisfaire au cahier des charges suivant :

- Compatibilité avec des matériaux mimant la matrice extra cellulaire
- Maintien de la viabilité cellulaire
- Contrôle de la topographie avec une résolution à l'échelle de la cellule
- Contrôle de la distribution spatiale des propriétés et de la composition de la matrice
- Contrôle de la distribution spatiale des cellules

Cette plate forme expérimentale s'appuie sur un nouveau procédé d'impression 3D (LAMP : Light Assisted Microfluidic Printing) combinant un système microfluidique permettant l'injection de multiples matériaux sur une surface à un système de photopolymérisation laser permettant la polymérisation simultanée de biomatériaux. Ce concept vient de faire l'objet d'un dépôt de brevet auprès de la SATT de Toulouse et un premier prototype est en cours de développement depuis un an au LAAS CNRS avec S. Souleille et X. Dollat.

Une illustration schématique détaillée du procédé d'impression est proposée sur la Figure 24. L'impression est réalisée à partir d'une tête microfluidique miniaturisée intégrant un canal d'injection et un canal d'aspiration qui permettent l'approvisionnement localisé de biomatériaux au niveau de la zone de polymérisation. Pour cela, la tête d'impression sera reliée à un contrôleur de pression via un ensemble de vannes et à un ensemble de réservoirs qui contiennent les différents matériaux, milieux de culture et suspensions cellulaires. Ce système permettra de choisir sur demande un matériau donné ou de moduler la composition d'un matériau à partir d'une librairie de matériaux afin de contrôler la composition des propriétés de la matrice (rigidité, porosité, concentration). Cette tête est placée à proximité du support d'impression et travaillera en immersion, dans un milieu de culture, afin de préserver la viabilité cellulaire. Une fibre optique localisée à l'apex du dispositif permet d'initier localement la polymérisation. Le mouvement de la tête d'impression (x,y,z) relatif au substrat permet une polymérisation localisée des biomatériaux dont la nature

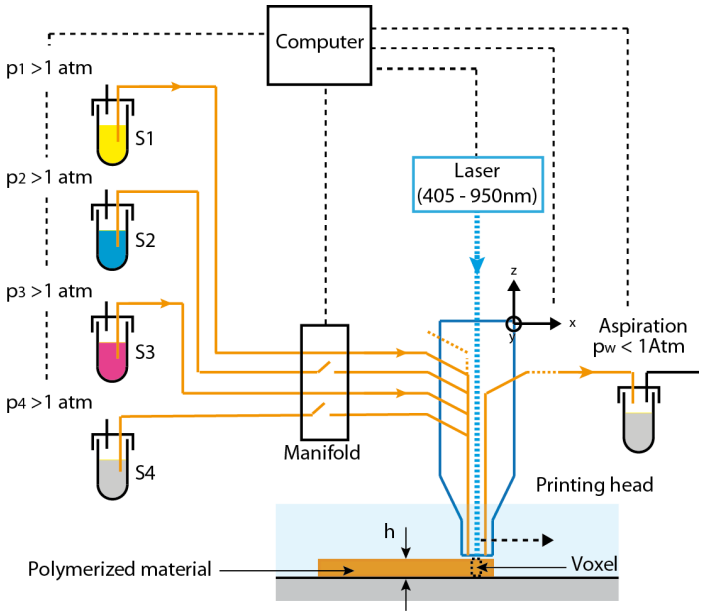


Figure 24 . Description de la plate forme de Bioimpression LAMP

et la composition peuvent être ajustées en temps réel par le système microfluidique. Ce processus est piloté par une plate forme logicielle qui assure la synchronisation entre les mouvements de la tête, l'intensité de la source lumineuse et l'injection des biomatériaux. Le système se comportera à son apex comme un système microfluidique ouvert et utilise un mécanisme de confinement hydrodynamique pour contrôler spatialement et temporellement l'injection des matériaux à polymériser (Figure 25).

Contrairement à certains procédés de bio-impression tels que la microextrusion ou le jet d'encre, ce procédé permet de découpler les mécanismes d'injection des matériaux des processus de polymérisation ou de gélification de ces derniers. En d'autres termes, la résolution d'écriture est indépendante du dispositif d'injection et des propriétés physico-chimiques des matériaux. Elle ne dépend que des propriétés optiques de la fibre. La technologie LAMP permet ainsi de mettre en forme de structures avec une précision à l'échelle cellulaire tout offrant une flexibilité maximale sur la nature et la composition locale du matériau.

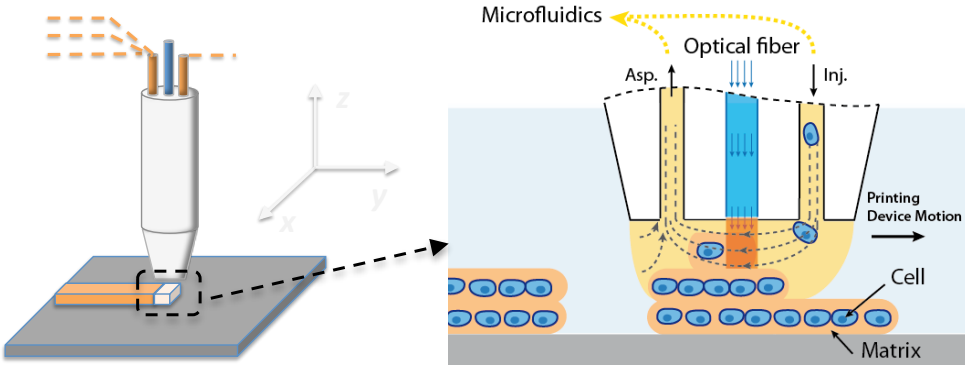


Figure 25 . Principe de fonctionnement de la tête microfluidique d'impression base sur la technologie LAMP

Ce système d'impression multimatériaux permet de lever les deux principaux verrous qui limitent actuellement l'utilisation des techniques d'impression 3D dans le domaine de l'ingénierie des tissus :

i) la possibilité de réaliser des impressions multi-matériaux et de contrôler finement le mélange et la composition de ces derniers. Cette capacité permettra de reproduire l'hétérogénéité (cellulaire, topographique, porosité, composition biochimique) des supports de cultures. L'ensemencement direct de ces matériaux avec des cellules sera également étudié.

ii) une résolution (taille de voxel) à l'échelle de la cellule individuelle (x, y, z = 10um) pour reproduire avec fidélité la morphologie et la distribution spatiale des différents types cellulaires constituant le tissus. La plupart des approches actuelles restent limitées à une résolution comprise entre 50 et 100 µm

Les performances escomptées pour la plate forme LAMP sont les synthétisées ci dessous:

- Résolution 10 µm
- Viscosité des matériaux: 1 – 1000mPas
- Densité cellulaire maximum: 10^8 cellules/mL
- Volume d'impression : 10x10x10cm^3
- Contrôle en temps réel des matériaux et ajustement de leur composition en temps réel
- Compatibilité avec des matériaux photo ou thermosensibles
- Faible consommation de matériaux / volumes de suspensions cellulaires

Le tableau ci dessous dresse une analyse comparative des principales technologies de bio impression commerciales actuelles.

	Impression assistée par Laser (LIFT)	Extrusion	Stéréo-lithographie	Lithographie 2- photons	Jet D'encre	LAMP Bioprinting
Impression Multi-matériaux	o	+	o	o	+	++ *
Vitesse	++	o	+	-	++	++
Viabilité cellulaire	++	+	+	*n.d.*	+	++
Structuration 3D	o	+	++	++	o	++
Résolution	10µm	50µm	30µm	200nm	50µm	10µm

(légende : ++ : Très satisfaisant , + : Satisfaisant , o : Passable, - : non satisfaisant, *n.d.* information non disponible)

* (incluant des capacités de mélange en temps réel entre matériaux de la bibliothèque et de création de gradients)

Développement de la tête d'impression microfluidique : Aspects hydrodynamiques et optiques

La combinaison d'un système d'injection microfluidique avec un système de polymérisation ou réticulation optique est totalement originale et, à mon sens, particulièrement avantageuse : elle offre des capacités d'intégration, de multiplexage et de reproductibilité qui sont essentiels pour le procédé de bioimpression.

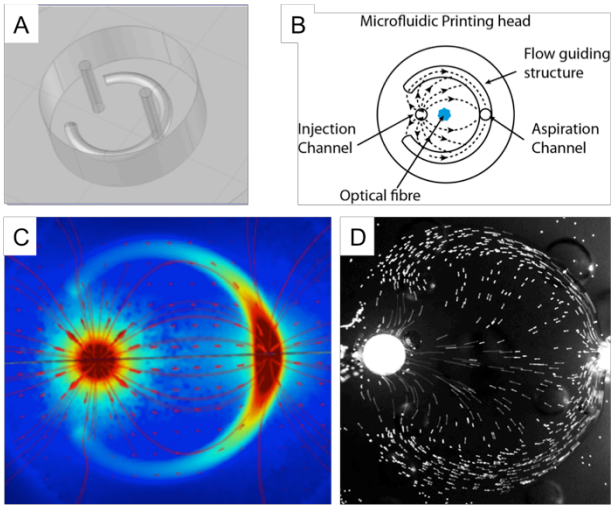


Figure 26 . Architecture de la tête microfluidique d'impression (A, B). Simulation numérique des vitesses d'écoulement à la surface de la tête d'impression(C). Validation expérimentale obtenue par injection d'une suspension de particules fluorescentes (10µm) dans une solution aqueuse de PEGDA 575 à 50% (D).

Aspects Microfluidiques : D'un point de vue conceptuel, la tête d'impression se comporte à son apex comme un système microfluidique ouvert et utilisera un mécanisme de confinement hydrodynamique pour contrôler spatialement et temporellement l'injection des matériaux à polymériser. Au niveau hydrodynamique, le dispositif reprend certains aspects du concept Microfluidic Probe (MFP) proposés par E. Delamarche et G. Kaigala à IBM Zurich[66]. Il permet d'assurer en continu une injection et une réaspiration simultanée des matériaux introduits. Ce mécanisme permet un renouvellement rapide des matériaux au niveau de la tête mais limite également les phénomènes de contamination du milieu environnant. La technologie LAMP se différencie du concept MFP de par sa géométrie, les débits mis en jeu, la viscosité des matériaux utilisés et enfin la possibilité de travailler à des distances élevées du substrat , typiquement de 20 à 500µm.

Le système est décrit succinctement sur la Figure 26. La géométrie de la tête a été optimisée par assurer un écoulement homogène et une récupération optimale des matériaux injectés. Pour cela, l'extrémité de la tête est dotée de microcanaux ouverts qui permettent de guider les lignes de flux et de redistribuer les pressions pour améliorer la ré-aspiration des matériaux injectés. Une première preuve de concept a été démontrée et un premier prototype de tête d'impression équipe la plate forme d'impression mais un travail important d'optimisation de la géométrie, des dimensions et des procédés de fabrication du dispositif reste encore à effectuer. Ce travail s'appuiera tout d'abord sur une phase de simulation numérique (COMSOL) pour adapter les écoulements aux viscosités des matériaux envisagés, limiter les effets de cisaillement pour préserver la viabilité des cellules, garantir une injection efficace même pour de fortes vitesses de déplacement de la tête (>1mm/s) et enfin optimiser l'impression de multimatériaux en favorisant les écoulements et en limitant les contaminations lors de l'injection successive des précurseurs. Il s'agira ensuite de valider expérimentalement les géométries proposées tant du point de vue des performances d'injection que de la compatibilité avec les matériaux et les cellules ensemencées.

MicroFabrication : Au delà du design de la tête microfluidique qui doit procurer les performances optimales pour l'impression, une contrainte supplémentaire est liée la réalisation du dispositif. Le prototype actuel de 3mm de diamètre intègre des canaux de 600 µm de diamètre, une fibre optique de 500µm de diamètre et comporte à l'apex, des microcanaux ouverts de guidage des flux : ce prototype a été réalisé par moulage de PDMS sur un moule micro-usiné. Le PDMS, de par son inertie chimique, ses propriétés mécaniques et sa porosité à l'oxygène (qui inhibe localement la réaction de polymérisation et permet le déplacement de la tête lors de l'écriture) présente de nombreux avantages et semble être une solution viable. Toutefois, la réalisation du moule par usinage reste encore laborieuse et il serait intéressant de mettre à profit mon expérience dans le domaine de l'impression 3D afin de fabriquer des moules plus complexes et à haute résolution voire de réaliser directement la tête microfluidique par impression 3D, sous réserve de trouver un matériau adapté chimiquement et optiquement à cette application.

Aspects optiques : D'un point de vue optique, la plate forme actuelle utilise une fibre optique lentillée qui permet de générer un faisceau collimaté de 20 µm de diamètre qui correspond à la résolution effective d'impression (voir paragraphe suivant). L'objectif à moyen terme est d'intégrer au sein de la même tête microfluidique plusieurs fibres collimatées permettant de disposer de différentes tailles de faisceau d'écriture par exemple 10 et 100µm. Cette stratégie permettra d'optimiser les temps d'écriture, notamment lors de l'impression de zone larges, tout en conservant une résolution à l'échelle de la cellule individuelle sur les zone les plus sensibles. Dans un premier temps, notre choix s'est porté sur une longueur d'onde d'écriture de 405nm qui permet de préserver la viabilité cellulaire tout en offrant une compatibilité avec une large gamme de photo-initiateurs radicalaires. Il serait également possible de multiplexer les sources lumineuses et ainsi de disposer d'une tête multi longueur d'onde capable d'exploiter des matériaux couplés à des photoinitiateurs différents.

Formulation de biomatériaux : Le choix du matériau utilisé comme support ou comme matrice extracellulaire est un paramètre essentiel en bioimpression puisqu'il est à la base des propriétés de prolifération et de différenciation des cellules. Ce matériau doit également être compatible avec le procédé d'impression qui doit permettre sa mise en forme tout en préservant ses propriétés physico-chimiques. Une majorité des approches actuelles en ingénierie cellulaire repose sur l'utilisation de polymères hydrogels synthétiques (par exemple à base de Polyethylene glycol) [67,68] ou naturels (ex: alginate, acide hyalurionique, matrice d'origine animale) [69] (Cf Figure 27). Ces derniers présentent l'avantage d'être plus proche de la composition et des propriétés physiques des matrices humaines ou animales. Toutefois, il sont aussi à l'origine de varia-

bilité entre lots d'échantillons et peuvent limiter la pertinence des modèles de tissus. En contre partie, les hydrogels synthétiques peuvent être optimisés du point de vue de leur propriétés physiques (porosité, rigidité) et biochimiques (fonctionnalisation , biodégradabilité) . Ils offrent aux biologistes la possibilité de développer de façon déterministe et avec une grande reproductibilité des microenvironnements pour la culture cellulaire.

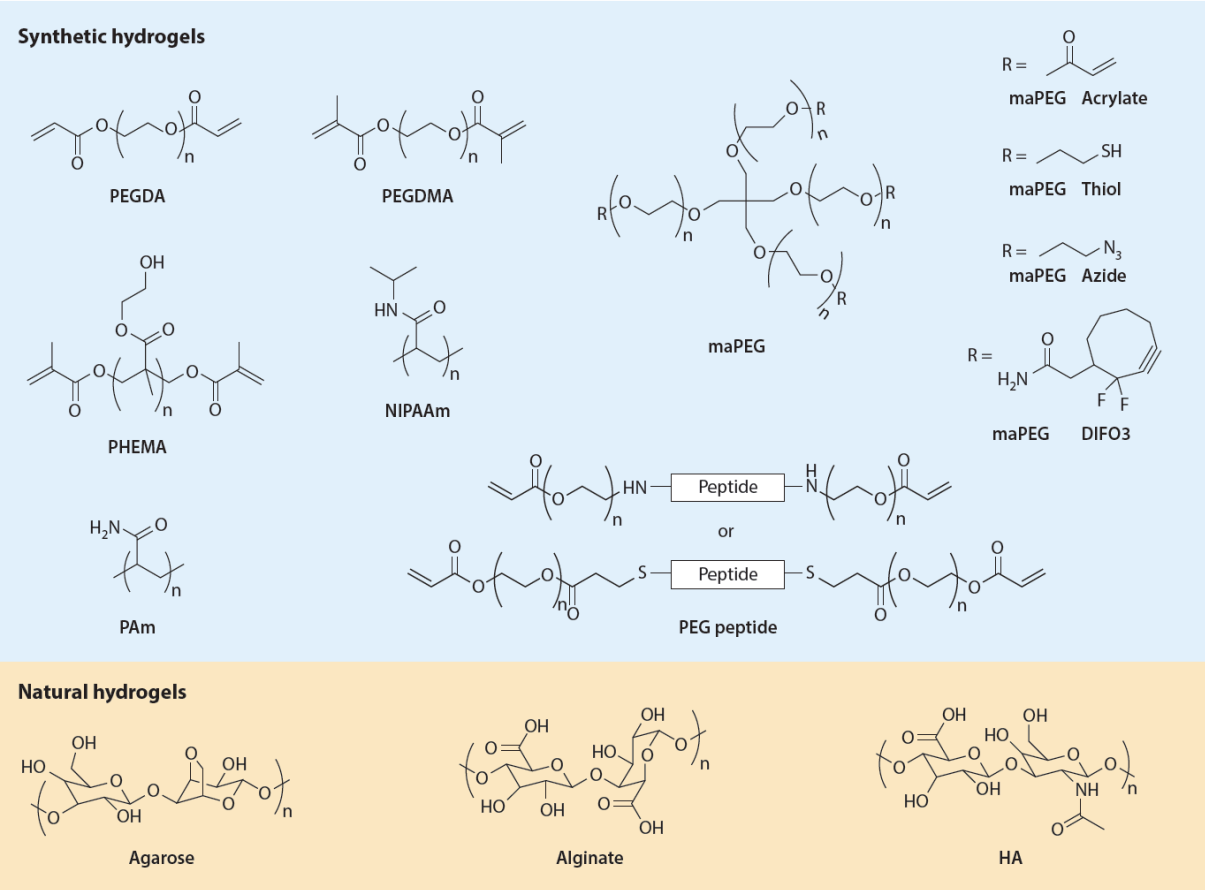


Figure 27 . Structure chimique des principaux polymères hydrogels synthétiques et naturels utilisés en Bioimpression et ingénierie tissulaire. [36]

Je souhaiterais mettre en place une technologie basée sur la photopolymérisation sur les développement récents dans le domaine des hydrogels photosensibles [68,70–73]. Mon objectif est de développer, au sein du laboratoire et en collaboration avec E. Trévisiol du LAAS CNRS , un expertise dans le domaine des biomatériaux photosensibles, notamment des hydrogels basés sur des chaines polymères de type PEG (polyethylene glycol) ou Gelatine. Je souhaite orienter nos développements sur des matériaux photoréticulables tels que le Gel MA (Gelatine methacrylate) , PEG DA (PEG Diacrylate) ou PEG SH (PEG Thiol) qui serviront soit de support de culture soit de matrice dans lesquelles seront ensemencées des cellules. [65,68,70,71] Ces matériaux présentent des gammes de rigidité variant entre 100 et 100kPa , peuvent être reticulés par voie radicalaire et ont des viscosités de 1- à 300mPa.s parfaitement compatibles avec la technologie LAMP. Ils peuvent être fonctionnalisés à l'aide de biofacteurs et rendus bio dégradables ou photo stimulables. [67,68,74]. Enfin, les hydrogels synthétiques peuvent également être mélangés à des hydrogels naturels de façon à combiner leur propriétés (stabilité mécanique, facilité de mise en forme d'une part, dégradabilité et biocompatibilité d'autre part).

Premières preuves de concept :

Dans le cadre des stages de B. Garlan et G. Saint Martin et du post doctorat de J. Foncy, des premiers tests d'impression ont été réalisés sur la base de polymères de type PEGDA (Mw 700) et de photoinitiateurs de type Irgacure 819 (CIBA). Ces tests, réalisés avec une longueur d'onde d'excitation de 405 nm ont permis de démontrer une résolution de 20µm et la possibilité de réaliser des structures multimatériaux, de hauteurs variables par empilements successifs (Figure 28).

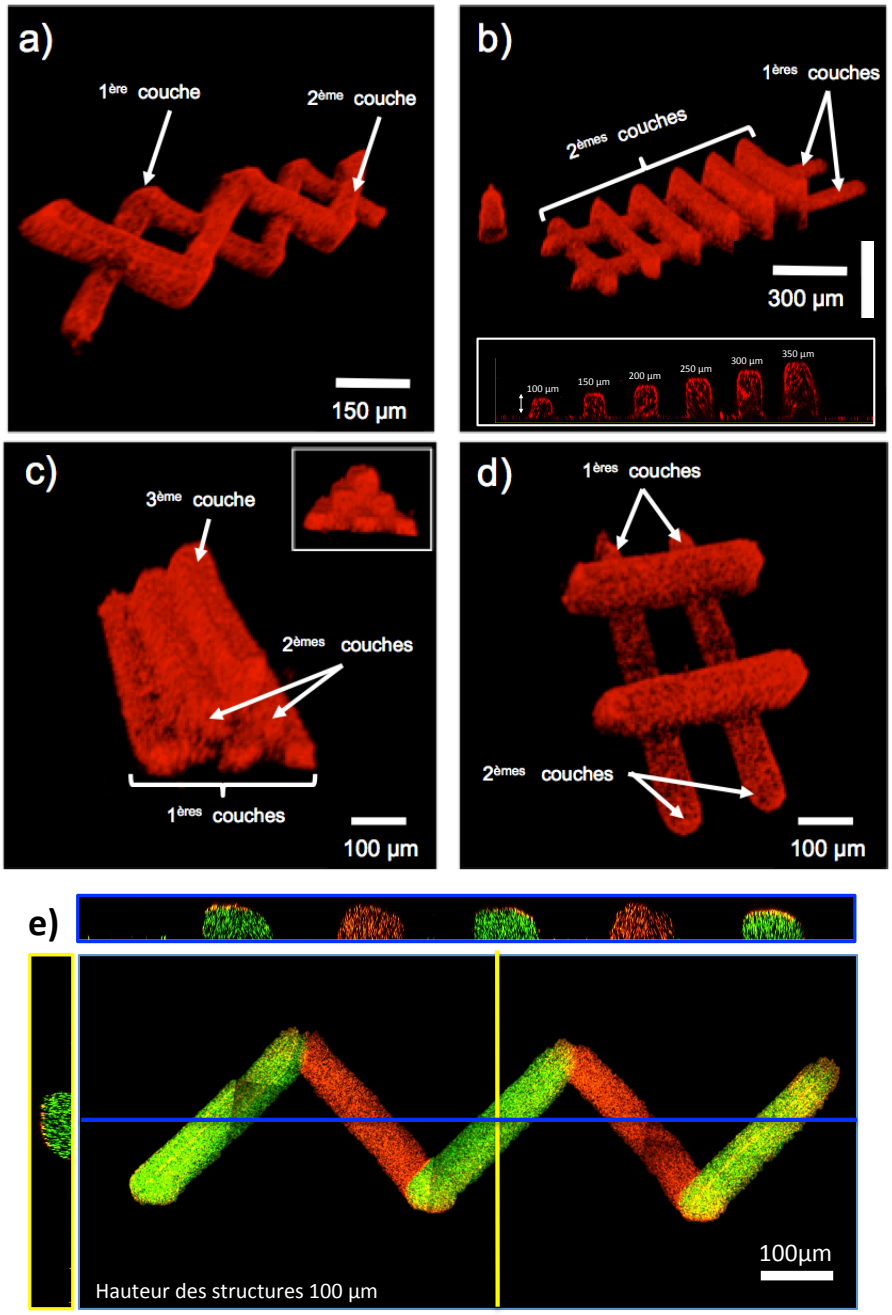


Figure 28 . : (a-d)Images en fluorescence de structures imprimées en hydrogel (40 % PEGDA 700, 30% acide acrylique, 30% milieu de culture RPMI, 0,01% Irgacure et 1% de nanoparticules (300nm de diamètre) rouges sur lames Super Frost (Images a, b, c, et d). Les images ont été réalisées avec une microscope bi-photonique sur le plateau imagerie du CPTP. (e) Images en fluorescence de structures imprimées en hydrogel (40 % PEGDA 700, 60 % d'eau, 0,01% Irgacure et 1% de nanoparticules (300nm de diametre) vertes ou rouge. (Images réalisées au plateau d'imagerie du CPTP)

Le PEGDA semble être une très bonne base pour la mise au point de matrice synthétique de culture. Ce matériau est disponible à bas coût dans une large gamme de masse molaires et dispose d'un agrément FDA. Toutefois il est désormais nécessaire d'optimiser sa formulation pour adapter ses propriétés mécaniques, et sa fonctionnalisation pour le rendre compatible avec les applications qui seront décrites ultérieurement. Le choix du photoinitiateur et son impact sur la viabilité cellulaire sera étudié avec attention d'un point de vue biologique. L'optimisation de ces matériaux se fera en collaboration avec des partenaires chimistes (J. Fittreman, IMRCP, Toulouse), BIochimistes (E. Trévisiol, ELiA, LAAS CNRS), Physicien (E. Dague , ELiA, LAAS) et biologistes (A. Besson, CRCT, A. Ferrand, IRSD, F. Deschazeau, Stromalab – Toulouse , R. Devillard Biotis - Bordeaux).

C.2 Axe de recherche N°2 : Modèles 3D de Microenvironnements cellulaires la cancérologie et la médecine régénérative

Projets : MultiFAB (Région Occitanie/FEDER, 2017-2020), HoliFAB (H2020, Pilot Line, 2017 - 2020), Cancéropôle GSO (2015-2016), PEPS Repousse (INSIS)

Encadrements : Remi Courson (Ingénieur), J. Foncy (Post Doct.), A. Accardo (Post Doct.), J. creff (Doct.), F. Véron

Publications CV n° 1, 8, 20

C.2.1 Préambule

Les technologies d'impression 3D et de bioimpression 3D décrites précédemment permettront de développer de nouveaux modèles de microenvironnements et de tissus dont l'architecture, l'hétérogénéité et l'organisation cellulaire pourront être programmées à façon par l'expérimentateur. Elles offrent donc la possibilité de créer et d'étudier l'évolution de modèles de tissus dont les propriétés initiales (physiques, chimiques et biologiques) sont précisément définies et reproductibles. Ces outils me semblent particulièrement pertinents pour la compréhension des mécanismes physiques et biologiques impliqués dans l'évolution des tissus vivants. Mon objectif est d'explorer sur des modèles tridimensionnels l'influence de certains paramètres physiques (rigidité, porosité, topologie) et cellulaires (distribution spatiale, hétérogénéité) sur la fonctionnalité des tissus. Ces paramètres sont connus comme étant essentiels dans les processus de division cellulaire, de migration et de différenciation. Ces paramètres contrôlent l'homéostasie des tissus mais ils sont également à l'origine (ou du moins impliqués) dans les mécanismes de dégénération ou de dérégulation mis en jeu dans certaines pathologies notamment le cancer.

Mon expérience dans le domaine de la Bioimpression et l'analyse que j'ai pu faire de la littérature me poussent à croire que la fabrication directe de tissus vivants, parfaitement mimétiques du tissus orignal et reproduisant sa fonctionnalité, reste un objectif encore inaccessible. Par ailleurs, au delà des contraintes technologiques actuelles, il est légitime de s'interroger sur la pertinence même de cette approche. Est il nécessaire pour fabriquer un modèle de tissu pertinent, de le reproduire à l'identique avec une fidélité maximale dans la morphologie, l'hétérogénéité, les propriétés biochimiques, physiques ?

Mon objectif est de montrer que la Bioimpression offre la reproductibilité et la flexibilité nécessaires à la création de modèles de microenvironnements de cultures 3D qui offrent les conditions topologiques, physiques, biologiques suffisantes pour permettre aux cellules imprimées de se différencier, de proliférer afin de remplacer l'environnement d'origine et de reconstruire un tissu vivant fonctionnel. Ce tissu pourra ensuite évoluer dans le temps pour atteindre sa fonctionnalité. Il ne s'agit donc pas de reproduire à l'identique un tissu cellulaire mais d'utiliser la Bioimpression pour réaliser des modèles contrôlés de tissus,

que nous appellerons « Bio Artefacts». Par Bio-artefact [g], nous entendons un système modèle tridimensionnel crée à partir de cellules et de biomatériaux organisés dans une architecture 3D prédéfinie par l'expérimentateur. Ce modèle permettra de tester des hypothèses sur la viabilité ou l'évolution de cellules en interactions ou d'explorer le comportement et les fonctions d'un tissu.

Je souhaite montrer la pertinence de ces bioartefacts comme modèles d'étude pour deux types de tissus : l'épithélium intestinal et la moelle osseuse, deux modèles de tissus dans lesquels, l'architecture, l'hétérogénéité et les propriétés physicochimiques du microenvironnement sont essentielles. Ils permettront de répondre à des questions biologiques liées à la compréhension des mécanismes à l'origine de la prolifération du cancer ou à l'étude des mécanismes d'homéostasie et de régénération des tissus. Ces deux projets, qui seront détaillés dans les paragraphes suivants, seront réalisés en étroite collaboration avec des partenaires biologistes : L'équipe d'A. Besson (CRCT, Toulouse), l'équipe de A. Ferrand (IRSD, Toulouse) l'équipe de S. Descroix (Institut Curie, IPGG Paris) et l'équipe de L. Sensébé, F. Deschazeau, Stromalab Toulouse). Ils bénéficieront également du support des plate-formes d'imagerie du CPTP (S. Allart) et de l'ITAV (J . Rouquette) à Toulouse.

C.2.2 Le rôle du microenvironnement dans la physiopathologie de l'instestin : modélisation de la niche tumorale.

Le cancer a longtemps été perçu comme un modèle de maladie hétérogène impliquant essentiellement des mutations génétiques au sein d'une population des cellules dites tumorales. Il est désormais établi que les tumeurs sont aussi associées à une hétérogénéité spatiale de la composition de leur microenvironnement ainsi que dans la proportion et l'état d'activation des cellules du stroma. [42] Il est essentiel, pour comprendre les mécanismes à l'origine de l'évolution du cancer, d'étudier l'influence et la dynamique du microenvironnement tumoral sur les mécanismes métastatiques et d'identifier les voies de communications et les interactions (entre les cellules du stroma et la tumeur mais également entre les cellules du stroma elles mêmes) par lesquelles les cellules cancéreuses influencent la construction de la niche tumorale. [41] Un des verrous scientifiques majeur reste lié à la réalisation de matrices artificielles permettant la croissance contrôlée de cellules pour former des tissus. [36,38,46,63] En effet, les systèmes utilisés actuellement sont loin de présenter toutes les spécificités de l'environnement naturel des cellules qui sont intégrées dans des tissus hautement organisés en 3 dimensions. [46,75,76]

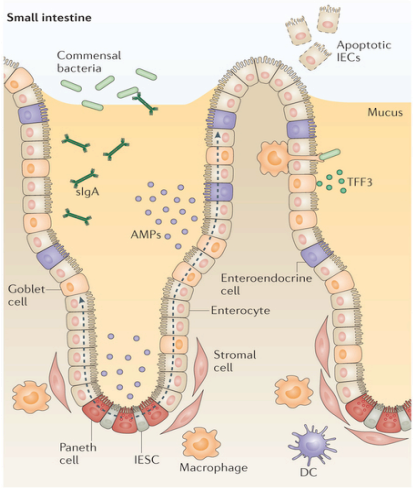


Figure 29 . Illustration de la morphologie de l'péithelium intestinal (petit intestine)

Le cas du cancer colorectal (CCR), qui reste la troisième cause de décès par cancer dans le monde, illustre très bien le rôle capital du microenvironnement. A ce jour, le débat sur l'origine des cellules initiatrices du cancer (CIC) du CCR reste ouvert.[77] Les tumeurs intestinales

[g] Par *artefact* , nous désignons un effet (lat. factum) artificiel (lat. ars, artis) en d'autres termes un effet ou un objet crée suite à l'intervention humaine.

sont généralement associées à une dérégulation du compartiment appelé « Crypte » dans lequel sont localisées des cellules souches intestinales (CSI). Ces cellules souches sont à la base du mécanisme de régénération des cellules constituant l'épithélium intestinal qui constituent les villosités présentent à la surface du petit intestin.

L'épithélium intestinal présente un très fort taux d'auto-renouvèlement avec un turn-over d'environ 5 jours. Les cellules souches prolifèrent et se différencient en migrant vers le sommet des villosités où les cellules vont entrer en apoptose. [78,79] Le renouvellement hebdomadaire de presque toutes les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale pose de grandes exigences quant à l'organisation cellulaire du tissu, et présente un risque important de conversion maligne. En condition physiologique, ce renouvellement est assuré par les CSI (Cellules Souches Intestinales). On les classe en deux populations : les cellules colonnaires de base de crypte (CBC) et les cellules souches intestinales +4 (+4 CSI) situées à 4 cellules de la base de la crypte

Deux théories ont été proposées : la théorie 'de bas en haut' où les cellules souches intestinales (CSI) sont les cellules d'origine, et la théorie 'de haut en bas' où le cancer commence dans les progéniteurs ou les cellules différenciées. Des études récentes renforcent la théorie 'de bas en haut et montrent plus particulièrement que les CSI sont à l'origine de l'apparition de la niche tumorale.

En effet, le cancer colorectal est une maladie dans laquelle les capacités homéostasiques des CSI sont altérées. En condition physiologique, l'homéostasie et l'intégrité des CSI sont contrôlées par un environnement très spécifique, la niche de la crypte intestinale. Elle comprend la lame basale, sur laquelle repose la crypte, et le stroma entourant la crypte c'est-à-dire la matrice extracellulaire et les cellules stromales (fibroblastes, cellules immunitaires et endothéliales). Les principales fonctions du stroma vis-à-vis de l'épithélium, à côté de l'immunité, sont mécaniques (soutien) et métaboliques (nutrition et échanges divers). Dans le stroma, les fibroblastes qui enveloppent la crypte sont des régulateurs clés des cellules environnantes en sécrétant des facteurs qui contrôlent le phénotype des CSI et le processus de différenciation le long de la crypte. Ainsi, pour préserver l'homéostasie, assurer l'intégrité de la crypte et ainsi éviter tout risque de transformation tumorale, l'intégrité de chaque partenaire, de la niche elle-même mais aussi les CSI, doit être préservée. Ceci implique que toute altération de l'une ou l'autre des entités appartenant à la crypte ou à la niche pourrait à son tour avoir un impact sur l'homéostasie des tissus et donc favoriser l'initiation du cancer.

L'étude du comportement des cellules souches, l'identification des facteurs physiques et biochimiques qui influencent leur évolution sont donc essentiels pour la compréhension des mécanismes de dérégulation. Le développement de modèles pertinent permettant de simuler le microenvironnement naturel de l'intestin sont des enjeux majeurs tant au niveau fondamental que pour le criblage pharmaceutique.[80–82]

Dans cette perspective mon objectif est d'utiliser les méthodes d'impression 3D et de bioimpression, ainsi que mes compétences en microlfuidique pour développer des modèles d'études in vitro pertinents permettant d'étudier le rôle du microenvironnement et plus particulièrement des paramètres physiques (topographie, rigidité, porosité,etc) et biochimiques (facteurs, approvisionnement temporel, etc) sur le comportement des cellules souches instestinales.

Ce projet s'appuiera sur plusieurs collaborations déjà effectives avec des partenaires biologistes :

Développement de microenvironnements basés sur des modèles Murins : La première collaboration s'appuie sur l'équipe d'A. Besson (CRCT Inserm) avec qui je co encadre les travaux de thèse de Justine Creff depuis 2015 dans le cadre du projet Oncodevice. Cette équipe a démontré récemment sur des modèles de

souris que les inhibiteurs de CDK (cyclin-dependent kinase) appelés $p57^{Kip2}$ jouent un rôle essentiel dans la maintenance de la quiescence des cellules souches intestinales présentes dans les cryptes. Cette équipe a mis au point un modèle de souris génétiquement modifiées qui viennent en complément de lignées cellulaires de type SW480 dans l'étude de ce mécanisme d'inhibition. L'objectif de ce projet est de réaliser des structures bioimprimées reproduisant la topologie et les propriétés mécaniques de l'épithélium intestinal afin d'ensemencer des lignées cellulaires ou des cellules collectées à partir des modèles de souris précédemment citées et d'étudier, dans des conditions physiologiques le rôle inhibiteur de p57.

Les premiers résultats obtenus par J. Creff sont particulièrement encourageants. D'une part, elle pu valider la pertinence de plusieurs matériaux de type hydrogels photopolymérisables pour la culture cellulaire, notamment de la lignée SW480. Les matériaux étudiés sont le PEG SH et plus particulièrement le PEGDA (MW700) pour lequel J. Creff a mis au point une formulation photosensible, basée sur un mélange PEGDA (700), Irgacure 819, Acide acrylique, Laminine/ Fibronectine qui permet d'une part l'adhésion cellulaire et d'autre part une mise en culture sur des temps longs (>15j) tout en préservant la fonctionnalité cellulaire (tests réalisés sur lignées SW480, Caco2).

Sur la base de ce matériau, des premiers tests de bioimpression ont été réalisés avec la DILASE 3D ainsi que le prototype de Bioimpression LAMP (Figure 30). Ces tests ont été effectués dans le cadre des travaux de post doctorats de J. Foncy et d'A. Accardo en collaboration avec R. Courson et S. Souleille ingénieurs au LAAS CNRS. Il montrent la possibilité de reproduire la topologie de l'épithélium intestinal avec une bonne fidélité c'est à dire en conservant les facteurs de forme des tissus in vivo (Cryptes : diamètre 50µm, profondeur 200µm ; Villosités : diamètre 300 µm à la base, hauteur 500µm).

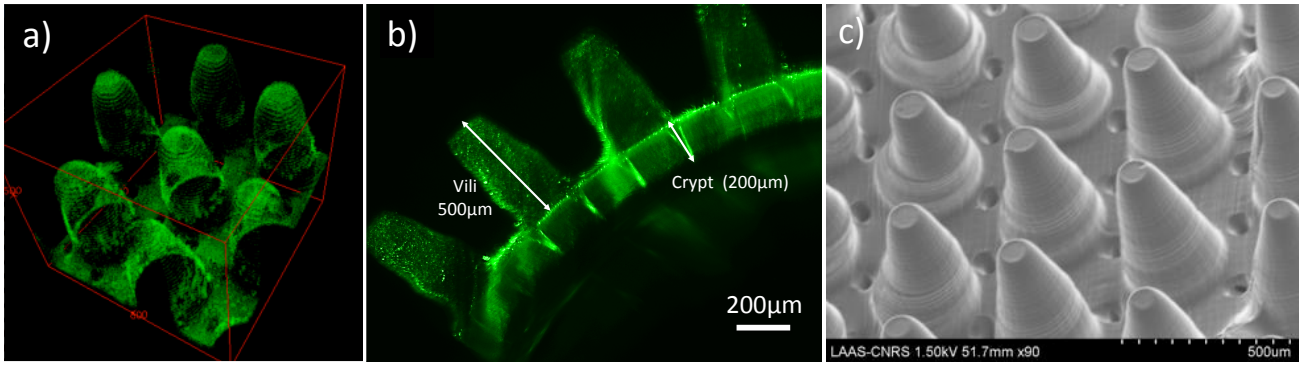


Figure 30 . (a,b) Images en microscopie bi-photons de structures 3D imprimées à l'aide de la technologie DILASE 3D dans un hydrogel photo sensible (40 % PEGDA 700, 30% acide acrylique, 30% eau, 0,01% Irgacure et 1% de nanoparticules (300nm) GFP) sur un support de DS3000 dans le but de reproduire la topologie de la paroi intestinale. (c) Image au microscope électronique à balayage des bioartefacts imprimés en hydrogel après déshydratation 1 nuit à température ambiante

Ces premières preuves de concept confirment la pertinence de la bioimpression pour reproduire la topologie de tissus. Des tests complémentaires ont été réalisés très récemment concernant l'utilisation de ces structures pour la culture cellulaire.

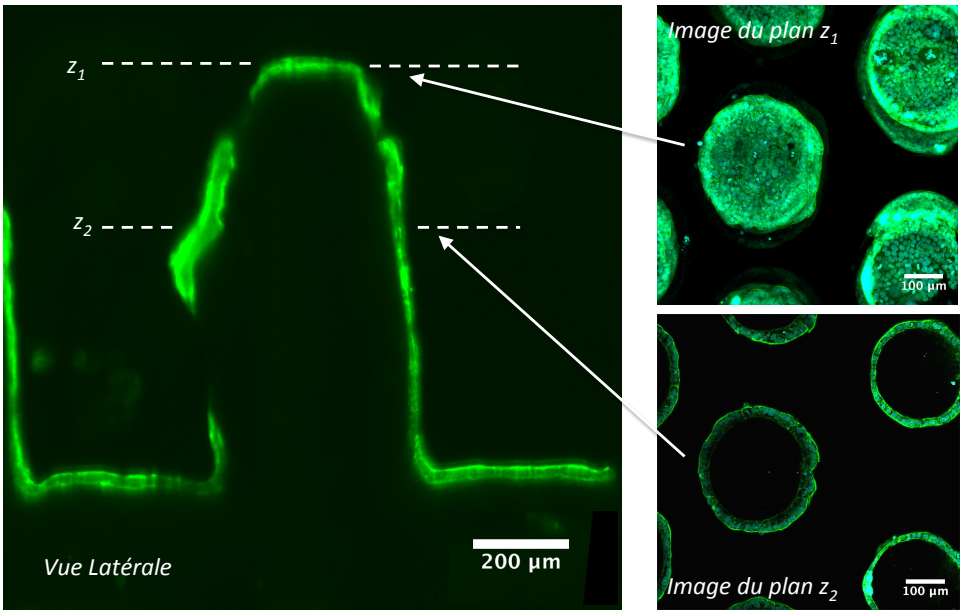


Figure 31 . Images en microscopie fluorescence (Bi-Photon, CPTP Toulouse) des modèles de villi/cryptes imprimés par la technologie DILASE 3D (40 % PEGDA 700, 30% acide acrylique, 30% eau, 0,01% Irgacure fibronectine à 250µg/mL) et ensemencée par des cellules Caco 2 (J+7)

Ces images montrent clairement la création d'un épithélium cohésif sur la surface de la structure en hydrogel après 7j de mise en culture. Elles confirment également la possibilité de réaliser des étapes de marquage et d'imagerie sans perturbation par une auto-fluorescence ou une contamination due à l'hydrogel. Ce critère est essentiel pour la caractérisation et l'observation du développement du tissu. Notre objectif est de montrer, à partir de cellules souches de souris isolées par l'équipe d'A. Besson, la formation d'un épithélium fonctionnel, mimétique de l'intestin sur lequel nous pourrons étudier d'une part le rôle inhibiteur de p57 et d'autre part étudier l'influence de paramètres physiques tells que la rigidité, la porosité ou les dimensions des différents compartiments sur la différenciation cellulaire. Ces premières réalisations seront effectuées sur la base du système DILASE 3D, d'ores et déjà opérationnel, puis seront transférées sur la plate forme LAMP, qui permettra, outre la reproduction de la topographie, l'impression de différents matériaux et différents types cellulaires dans les différents compartiments du tissus.

Développement d'un modèle de crypte colorectale humaine: Sur la base de la collaboration en cours avec A. Besson, une deuxième collaboration a été établie avec A. Ferrand de l'IRSD ainsi que l'équipe de S. Descroix à l'Institut Curie. Nous proposons d'utiliser les technologies d'impression additives et plus particulièrement la technologie LAMP pour la fabrication de microenvironnements biomimétiques 3D qui au delà des propriétés physiques évoquées précédemment, reproduira également l'hétérogénéité cellulaire des tissus: les cellules utilisées seront celles issues des résections colorectales humaines préparées par l'équipe de l'IRSD, à savoir les fibroblastes et les cellules des cryptes, issus de tissus sains ou pathologiques. Nous souhaitons étudier plus particulièrement le rôle des fibroblastes dans les mécanismes causant la dérégulation du stroma et les cellules souches de la crypte. Le type cellulaire prédominant dans le stroma est le fibroblaste dont les fonctions normales comprennent la sécrétion et la maintenance de la matrice extracellulaire (ECM), la régulation de la différenciation épithéliale, la régulation de l'inflammation et l'implication dans la guérison des plaies. Dans un état activé, les fibroblastes présentent un phénotype différent. Ils sont impliqués dans la prolifération, la dédifférenciation et la résistance aux thérapies des cellules épithéliales tumorales. Ainsi, par la sécrétion de nombreux facteurs (ex: chimiokines, cytokines, protéases, protéines de matrice extracellulaire) , ils contribuent à la création d'un environnement favorisant le développement de la

tumeur. D'autre part, il est connu que l'inflammation chronique ou que des altérations induites par des traitement (Chimio , radio thérapie) induisent une activation des fibroblastes qui en retour, modifie leur microenvironnement et pousse les CSI hors de leur conditions physiologiques.

Dans cette collaboration, mon objectif est de concevoir un bio-artefact qui soit le plus biologiquement pertinent en termes de taille de la crypte colorectale humaine, de la densité de la matrice extracellulaire (ECM), de la rigidité et de la composition (collagène type I, laminine, etc) ainsi que d'une conception permettant l'ECM et l'investigation cellulaire par microscopie confocale, biphotonique, SPIM ou macroSPIM, ainsi que par analyse transcriptomique et protéomique. Ce modèle 3D sera utilisé parallèlement au modèle 3D d'organoïde de côlon humain (couramment utilisé par le groupe d'A. Ferrand) qui mesure les capacités des cellules souches à reconstituer des cryptes colorectales humaines, et co-cultivées avec des fibroblastes primaires humains (cultures également établies en routine dans le groupe). En comparaison des approches les plus avancées développées à l'heure actuelle telles que celles de l'équipe de S. Magness[83] à l'UNC (USA) , la capacité d'impression à haute résolution et la possibilité de contrôler la distribution spatiale des matériaux et cellules constitueront des avancées qui vont au delà de l'état de l'art actuel. A court terme, l'intégration des modèles de microenvironnements 3D dans des dispositifs microfluidiques permettant soit la vascularisation soit le contrôle de l'environnement chimique dans la partie basale ou apicale sera aussi étudiée dans le cadre du projet Européen HoliFAB. Une des perspectives du projet sera également d'étudier l'influence de mouvements péristaltiques sur l'homéostasie des tissus. En effet, la possibilité d'utiliser des dispositifs microfluidiques déformables tels que ceux démontrés par D. Ingber constitue une voie particulièrement intéressante pour reproduire des conditions physiologiques de culture. [84]

C.2.3 Le rôle du microenvironnement sur le développement des cellules souches dans la moelle osseuse.

Dans ce deuxième volet, mon objectif est de démontrer la fabrication de supports de culture rigide, intégrant une architecture 3D complexe et adaptée notamment à des modèles de tissus rigides tels que la matrice osseuse. Alors que les projet de développement dédié aux modèles intestinaux mettent l'accent sur les questions du contrôle de la topologie de surface, de la rigidité et de l'hétérogénéité cellulaire, ce projet me permettra d'étudier la croissance cellulaire dans des architectures 3D très complexes, qui serviront de matrice de culture et d'aborder les questions de régénération et de vascularisation.

Ce projet sera réalisé en collaboration avec l 'équipe de L. Sensébé et F. Deschazeau du StromaLab à Toulouse ainsi que les équipe de S. Descroix et J. Camonis de l'Institut Curie à Paris. Il s'intéressera au rôle du microenvironnement osseux sur les mécanismes de différenciation et de prolifération de cellules souches mesenchymateuses et hématopoietiques (MSCs, HSCs) qui gouvernent le fonctionnement de la moelle osseuse et sa régénération. [85–87] La compréhension de ces mécanismes est essentielle dans des perspectives d'application pour la médecine régénérative mais aussi dans le cas de certaines pathologies cancéreuses telles que le myélome qui seront adressées avec le StromaLab et L'Institut Curie respectivement.

Le microenvironnement présent dans la moelle osseuse comprend une combinaison de paramètres physiques, chimiques, cellulaires et structurels qui est essentielle à la viabilité cellulaire et l'activité hématopoïétique (la moelle produit les différents types de cellules du sang : les globules blancs, les globules rouges, et les plaquettes). Ce microenvironnement influence directement les cellules HSCs, responsables de la régénération et de la maturation des cellules du sang, mais aussi les cellules MSCs qui ont une activité de régulation sur les HSCs. [88] La plupart des approches actuelles reposent sur des cultures dans des matrices

3D qui ne fournissent pas encore de similarités avec les conditions physiologiques, du moins proches de la réalité de l'environnement in vivo. [89,90] Ainsi des publications récentes ont montré la possibilité de cultiver des MSCs ou HSCs sur des structures macroporeuses mais qui ne reproduisent pas les caractéristiques mécaniques ou biochimiques de l'environnement naturel. [91]

Dans de récents projets de recherche que j'ai développés en collaboration avec l'institut Langevin à Paris (A. Deraude, E. Bossy, M. Muller), ainsi que l'Institut Curie (J.L. Viovy), j'ai montré que les technologies de fabrication additives peuvent être utilisées avantageusement pour générer des matrices complexes reproduisant non seulement l'architecture mais aussi certains aspects physiques de la matrice osseuse. [92] Ce projet était dédié à la compréhension des mécanismes de propagation d'ondes ultrasonores dans les os et avait pour ambition de démontrer le potentiel de l'imagerie par échographie pour évaluer, de façon non invasive, l'évolution de la porosité osseuse dans le cas de pathologies telles que l'ostéoporose.

Nous avons réalisé des structures modèles aussi appelées « fantômes » qui miment les propriétés acoustiques de l'os trabéculaire. Ces fantômes ont été fabriqués par impression 3D en stéréolithographie (DWS 28J+) dans des matériaux composites commerciaux (DWS DL260) basés sur un mélange de chaine PU, PA et de microparticules de silice et d'alumine (Figure 32). Ces fantômes sont générés directement à partir de données d'imagerie collectées par Tomographie (Micro CT) qui sont traitées puis envoyées sous la forme d'une pile d'image au système d'impression 3D. Ces travaux ont montré la pertinence de ces fantômes osseux pour des études physiques, la densité et l'architecture des dispositifs reproduisant très fidèlement les phénomènes observés sur des échantillons d'os réels.[93] Cette approche permet non seulement de produire des échantillons de façon parfaitement reproductible contrairement aux échantillons d'os réels, prélevés sur des animaux, qui présentent une forte variabilité, mais avec une très grande flexibilité sur la modification des paramètres de porosité ou d'anisotropie.

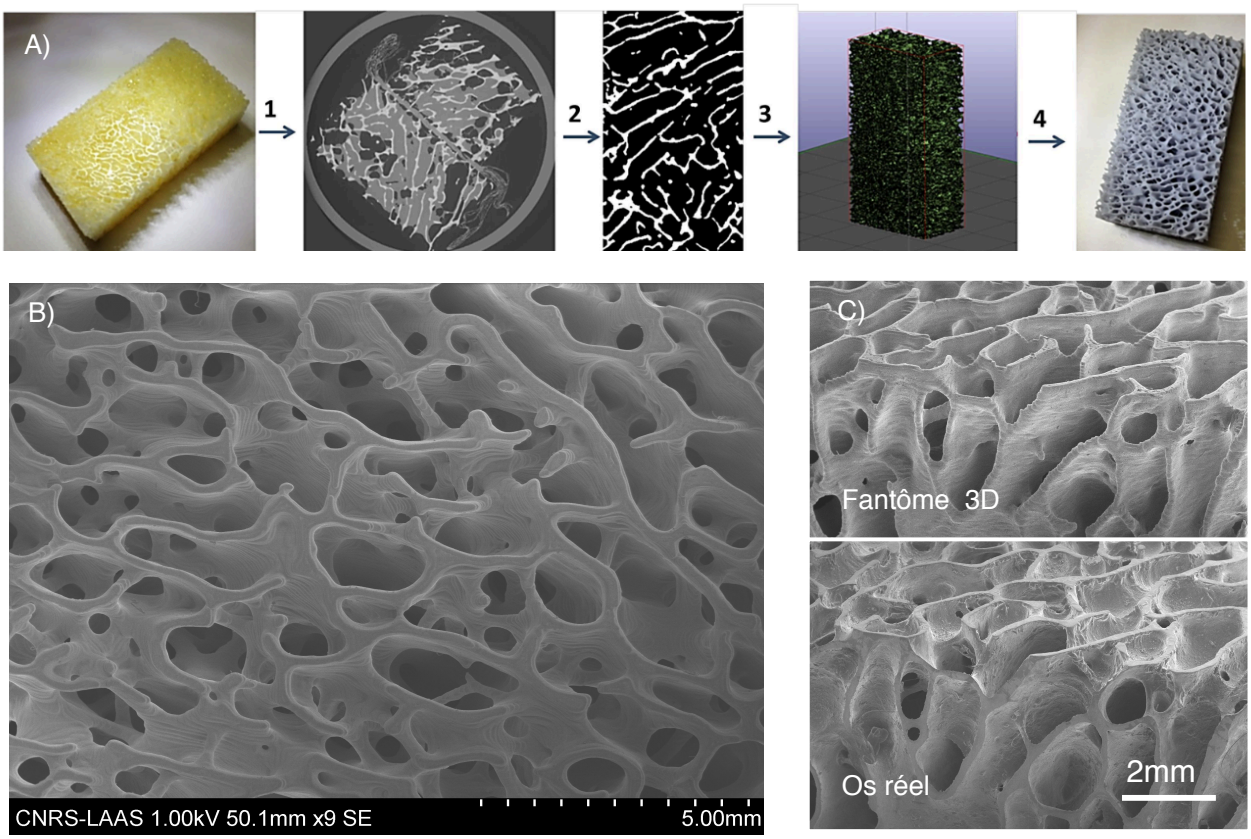


Figure 32 . (A) Processus de fabrication d'un fantôme osseux 3D depuis l'échantillon réel d'origine, son analyse par microtomographie (1), le traitement d'images (2), la génération d'un design 3D STL (3) et sa fabrication par stréréolithographie (4). Images MEB des structures réalisées (B) et comparaison à l'échantillon d'origine (C)

Sur la base de ces premières réalisations je souhaite construire un projet de recherche dans lequel ces fantômes osseux seront utilisés comme support de culture reproduisant la topographie, les propriétés mécaniques et biochimiques des os in vivo, et plus particulièrement de la moelle osseuse.

Notre objectif est de développer des modèles 3D de bioartefacts pour étudier de façon systématique les paramètres qui influencent le devenir de ces cellules souches MSCs et HSCs. Les spécificités du microenvironnement que nous souhaitons étudier en premier lieu sont d'une part l'architecture 3D interne de l'os et d'autre part sa rigidité. Pour cela, nous utiliserons soit des matériaux composites tels que ceux utilisés pour la génération de fantômes décrits précédemment (module d'élasticité autour de 1GPa) des matériaux de type hydrogels faiblement dilués (PEGDA) dans des gammes de module d'élasticité variant de 10 à 100kPa. Ces matériaux permettront de produire des structures mécaniquement stables qui pourront ensuite être analysées par imagerie confocale directe ou par coupe de tissu (microtome). Des premiers résultats menés à L'institut Curie (J. Camonis) dans le cadre du Post Doctorat de W. Han ont montré la biocompatibilité de structures réalisées par impression 3D sur des résines rigide DWS (DS3000) et la possibilité de mettre en culture pendant 7 jours des cellules de type MSCs. Cette première validation, particulièrement encourageante constitue la première étape d'un projet de recherche que je souhaite mener à moyen et long terme. Ce projet concernera tout d'abord la réalisation de bioartefacts de rigidités et de porosité (ou d'architecture) contrôlées. Les travaux en cours sont dédiés à la réalisation de structures osseuses poreuses dans des matrices de type PEGDA. Des premiers échantillons produits par stéréolithographie (PEGDA 250) sont actuellement en cours d'évaluation pour la culture de lignées cellulaires ostéoblastiques (SAOS2,

MG63) qui permettront de valider la biocompatibilité des modèles ainsi que d'optimiser les conditions d'adhésion et de prolifération.

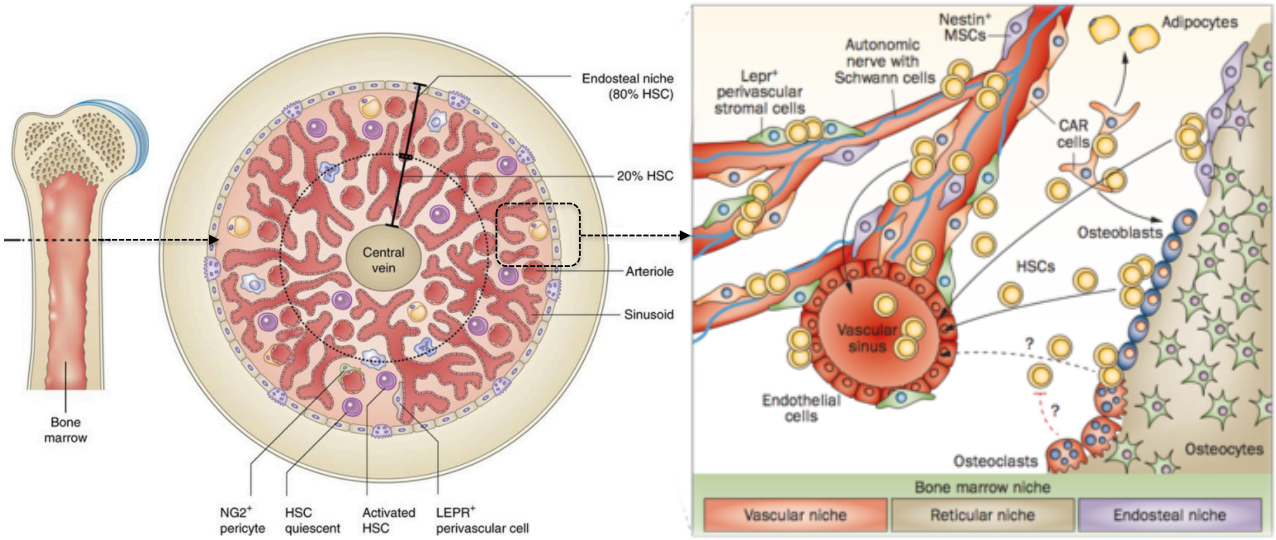


Figure 33 . La moelle osseuse constitue un microenvironnement complexe, hautement organisé en 3D, qui est essentiel au renouvellement, à la quiescence et au caractère multipotent des HSCs et MSCs. Les HSCs sont à l'origine des cellules du sang (hématopoièse). Les MSCs sont des cellules multipotentes impliquées dans la régulation des HSCs et capables de se différencier en osteoblastes, adipocytes or chondrocytes. (adapté de [94,95])

La pertinence de ces modèles sera ensuite testée par ensemencement de différents types cellulaires et mise en culture par perfusion sur des temps longs >15jours. Nous nous intéresserons à l'ensemencent de cellules souches de type MSCs qui seront fournies par le Stromalab sur la base d'une bibliothèque d'échantillons humains mise en place au niveau du CHU de Toulouse. Enfin, la dernière étape dans la reconstruction d'un tissu sera l'ensemencement de HSCs en plus de MSCs et l'étude de leur différenciation et évolution pour l'établissement de fonctions hématopoiétiques au sein de l 'échantillon. Ceci constituera la base d'un microenvironnement fonctionnel pour l'étude des mécanismes de régénération. Les technologies et les savoir-faire développés dans ce projet seront partagés avec l'Institut Curie avec lequel nous aborderons des problématiques liées à la niche tumorale et aux paramètres physiques du microenvironnement qui pourront influencer l 'évolution de cellules souches vers un phénotype tumoral. Tout comme pour le projet décrit précédemment autour du modèle intestinal, les questions d'adressage microfluidique des modèles pour la culture cellulaire seront abordées au cours du projet. A moyen terme, les aspects de vascularisation de tissus trouveront également un écho particulièrement intéressant avec les problématiques de vascularisation de tissus qui seront abordées dans l'axe de recherche n°3.

Dans un volet plus prospectif, je souhaite m'intéresser à la possibilité de reproduire certaines propriétés spécifiques de l'os, en particulier sa piezoélectricité. Les travaux que j'ai pu initier avec L. Nicu, F. Mathieu et T. Leichlé du LAAS CNRS dans le cadre du stage de F. Véron, nous ont permis de valider la formulation de résines photosensibles composites à partir de nanoparticules de $BaTiO_3$ qui confèrent, après recuit sous champ électrique, des propriétés piézoélectriques aux échantillons imprimés en 3D. Ce projet, au delà des perspectives qu'il ouvre dans le champ des MEMs pour la réalisation de dispositifs 3D actifs électriquement, optiquement ou mécaniquement, nous permettrait d'étudier l'influence de certains stimuli mécaniques sur la croissance et la prolifération cellulaire au sein des matrices osseuses. Il semble en effet que les

propriétés piézoélectriques de l'os soient à la base des mécanismes de régénération et de réparation en induisant une activation des ostéocytes, ostéoblastes et ostéoclastes en charge du remodelage osseux.

C.3 Axe de recherche N°3 : Microfluidique et vascularisation

Projets : Readynov (2017-2020)

Encadrements : E. raude (Doctorante CIFRE)

Dans le projet dédié à la réalisation de modèles 3D de culture cellulaire (bioartefacts) décrits précédemment, j'ai souhaité mettre en avant l'importance du microenvironnement sur l'homéostasie des tissus, leur régénération et le développement de certaines pathologies telles que le cancer. Nous avons abordé l'utilisation des technologies d'impression additives pour le contrôle de certains aspects essentiels de ce microenvironnement tels que l'architecture, les dimensions, les propriétés mécaniques, biochimiques, la porosité. Un paramètre que nous n'avons que rapidement abordé précédemment est celui de la vascularisation. En effet, le système sanguin est essentiel dans l'approvisionnement de nutriments et d'oxygène, dans l'élimination des déchets métaboliques mais aussi pour la communication entre cellules puisqu'il est un vecteur de transports des facteurs et autres signaux biochimiques. [96] D'un point de vu technologique, ce problème est généralement contourné en laboratoire en cultivant ces tissus dans des bioréacteurs de perfusion. Toutefois, les tissus cultivés ne parviennent généralement pas à atteindre un statut fonctionnel dû à l'apparition rapide de nécrose des couches cellulaires profondes en état d'ischémie. Au niveau clinique, cette problématique est encore plus critique lors de l'implantation de tissus qui sont privés de tout système de perfusion. Il s'agit alors de stimuler le système vasculaire de l'hôte pour que celui ci envahisse le nouveau tissu. Ce phénomène est lent (de l'ordre de plusieurs semaines) et induit une ischémie rapide des cellules les plus profondes et une intégration très difficile du tissu dans l'hôte.

Ces aspects sont actuellement abordés dans le cadre du développement des organes sur puces, que l'on peut identifier comme des systèmes microfluidiques au sein desquels sont ensemencées et mises en culture des cellules. [47,97–100] Certains de ces dispositifs intègrent des fonctions mécaniques complexes permettant de coupler le contrôle de l'environnement fluidique à des sollicitations mécaniques. Toutefois, ces systèmes restent encore limités par les technologies de fabrication 2D généralement utilisées qui ne permettent pas de reconstituer simultanément l'environnement 3D des tissus in vivo.

L'apport de l'impression 3D réside dans le fait de pouvoir créer un réseau 3D viable et fonctionnel pour la perfusion d'organe. Si certaines approches telles que la bio-impression de plusieurs types cellulaires afin d'améliorer la maturité des vaisseaux semblent validées et reconnues de tous, un effort important reste à faire dans le domaine des matériaux et biomatériaux utilisés pour mimer au plus près la matrice extracellulaire et permettre ainsi son remodelage [51,101–103]. L'intégration de plusieurs méthodes d'impression devrait permettre dans le futur d'améliorer également l'impression de ces réseaux vasculaires.

Je suis convaincu que le couplage des technologies de bioimpression 3D et de la microfluidique offrira une intégration plus aisée de structures vasculaires complexes directement au sein des modèles imprimés. Ce couplage permettra également au delà de la simple génération de « canaux » microfluidiques utiles pour le transport, de reproduire des modèles 3D d'endothélium, c'est à dire de réorganiser des cellules endothé-

liales qui constituent les vaisseaux sanguins. Cette perspective est particulièrement attirante et je souhaiterais l'aborder à moyen ou long terme

Mon objectif à court terme est de dissocier ces deux challenges technologiques et de développer des outils microfluidiques implantables pour mieux comprendre les mécanismes d'échanges dans des tissus réels. L'originalité de ce projet réside dans le fait que ces études seront réalisées sur des systèmes biologiquement pertinents et en l'occurrence parfaitement mimétiques puisqu'il s'agit d'échantillons de peau humaine aussi appelés explants. Ces modèles nous permettront d'appréhender certains aspects essentiels de la vascularisation en s'affranchissant des limites et des contraintes des modèles in vitro de tissus couramment utilisés. Ces connaissances permettront, dans un second temps de développer des modèles vasculaires pertinents qui pourront être intégrés dans les modèles 3D générés par bioimpression pour soutenir l'homéostasie des tissus. C'est l'objectif du projet que je souhaite développer en étroite collaboration avec la société Genoskin.

Ce projet a été initié dans le cadre du co encadrement du stage de E. Raude , en collaboration avec E. Pagès (Responsable R&D) et P. Descargues (CEO) de la société Genoskin. Il sera poursuivit avec E. Raude dans le cadre d'une thèse CIFRE qui démarrera en Octobre 2017 et dont je serai responsable. Un projet READYNOV a également été déposé auprès de la région Occitanie.

C.3.1 Contexte : Le modèle Nativeskin

Le modèle d'explant cutané développé par la société Genoskin est basée sur des échantillons de peau prélevés dans le cadre de chirurgies plastiques et pour lequel Genoskin recueille le consentement éclairé des patients. Les modèles de peau commercialisés par Genoskin (modèle Nativeskin) permettent de maintenir les biopsies de peau humaine en vie pendant 7 jours après production, avec des structures histologiques normales, une bonne viabilité cellulaire et un maintien de la fonctionnalité du tissu.[104,105]

Les modèles Nativeskin sont principalement destinés à des études pharmacologiques, cosmétologiques ou en cancérologie. Ils constituent des alternatives particulièrement intéressantes à l'expérimentation animale qui pose de nombreux problèmes éthiques et est prohibée dans un nombre croissant de pays (Europe, Inde ou en Israël). Dans le reste du monde, et en particulier aux USA, les populations y sont majoritairement hostiles. De plus, elle reste longue, coûteuse et généralement peu efficace, du fait de sa faible représentativité pour modéliser le comportement des tissus humains. En effet, 90% des médicaments validés chez l'animal n'atteignent jamais le marché à cause de problèmes de toxicité ou d'inefficacité chez l'homme. Ainsi, le développement pharmacologique, qui repose depuis les années 1940 sur l'utilisation massive des animaux, subi des revers importants.

Malgré leur pertinence biologique, une des limites importantes des modèles in vitro issus de l'ingénierie cellulaire, comme ceux générés par Genoskin, est l'absence de vascularisation. Bien que produits à partir de tissus humains, les flux sanguins et lymphatiques ne sont plus présents dans les modèles explantés. Or, les vaisseaux sanguins et lymphatiques permettent entre autres le transport et l'absorption des nutriments et des médicaments. Ainsi, reproduire une vascularisation dans le tissu permettrait d'améliorer la viabilité du tissu, de tester l'administration de médicaments ou d'étudier leur absorption et de rendre les modèles in vitro plus prédictifs des réponses humaines.

Il n'existe pas actuellement de solutions technologiques disponibles commercialement pour créer et/ou maintenir une vascularisation dans des biopsies de peau humaine. Les solutions technologiques proposées dans la littérature pour les organes sur puce ne sont pas applicables à ce type d'échantillon. Les travaux les plus avancés dans un domaine très proche, ont été réalisés par l'équipe de Y. Hanry (Université e Singapour) en 2007 qui a procédé à l'implantation de réseaux de micro-aiguilles pour l'injection de milieu de culture dans des coupes de foie [106]. Les auteurs montrent un maintien de la viabilité cellulaire et des fonctions hépatiques pendant 3 jours ce qui reste encore insuffisant pour une grande majorité des applications. Ainsi, malgré des progrès constants dans le domaine de l'ingénierie des tissus le contrôle des transports de masse et des échanges au sein des tissus ainsi que de la reconstruction d'architecture angiogénique reste un verrou majeur pour le maintien de la viabilité et de la fonction des tissus. Ce verrou technologique touche les modèles de tissus reconstruits mais il concerne également les explants et fait particulièrement défaut pour la conservation des organes destinés aux transplantations.

Dans ce projet, je souhaite mettre à profit mes connaissances en microfluidique et dans les technologies de microfabrication pour développer des dispositifs implantables qui permettront de reproduire certains aspects essentiels du système vasculaire représenté schématiquement sur la Figure 34 dans le cas de la peau. Ce système doit permettre une injection de nutriments et de facteurs trophiques ainsi que la collection simultanées des déchets métaboliques. Par ailleurs, ce processus doit avoir lieu de façon continue et éventuellement présenter une modulation périodique des débits d'injection, afin d'étudier l'influence d'un mécanisme péristaltique.

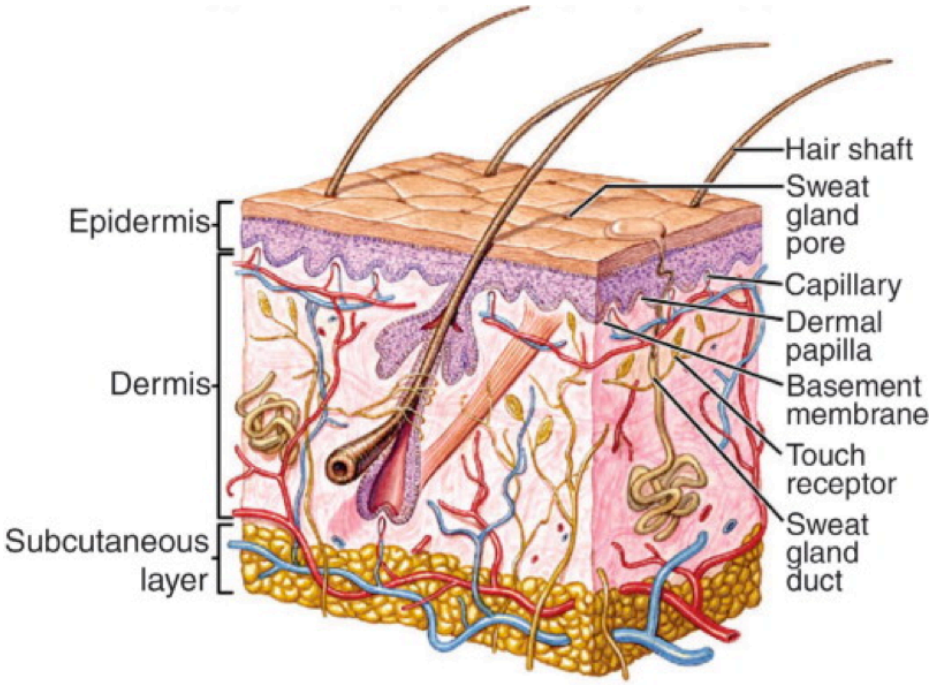


Figure 34 . Structure de la peau humaine

Le modèle NativeSkin actuellement développé par Genoskin est représenté sur la Figure 35. Ce modèle comprend un explant de peau (biopsie humaine) inséré dans une matrice de culture au sein d'un dispositif de maintien (insert) qui permet la manipulation de l'échantillon. Ce dernier est alimenté à sa périphérie par diffusion passive du milieu de culture depuis la matrice vers l'échantillon. Une comparaison directe de ce

modèle avec la structure réelle de la peau permet d'émettre intuitivement des hypothèses simples quant à la faible viabilité observée expérimentalement, viabilité qui décroit lorsque la dimension et notamment le diamètre des biopsies augmentent. En effet, les mécanismes d'échanges entre l'explant et le milieu de culture sont principalement limités par la diffusion. Ce mécanisme ne satisfait pas les besoins en nutriments et autres facteurs les cellules situées au centre de l'échantillon (en état d'ischémie) et ne permet pas une évacuation des déchets métaboliques.

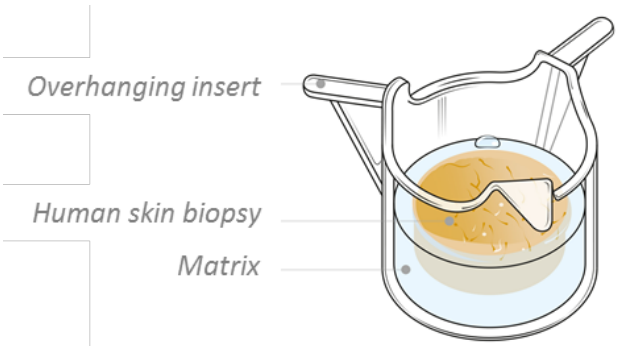


Figure 35 . Modèle Nativeskin actuellement développé par la société Genoskin.

C.3.2 Systèmes microfluidiques implantables

Des premiers tests réalisés dans le cadre du stage d'E. Raude ont pu montrer que l'implantation simple d'un cathéter et l'injection d'un milieu de culture à un débit de l'ordre de 10µL/min au sein du derme permet une amélioration sensible de la viabilité cellulaire. Toutefois cette approche présente des inconvénients majeurs car d'une part elle ne permet par de collecter le milieu cellulaire après injection et donc d'éliminer les déchets métaboliques et d'autre part elle induit une accumulation de milieu et une augmentation de la pression hydrodynamique qui induit des déformations significatives des explants. L'objectif de ce projet est d'évaluer les performances de systèmes microfluidiques implantés dans le derme et qui permettront simultanément l'injection et la collection de milieu de culture. Ce système traversant sera connecté à une plateforme microfluidique qui permettra de contrôler les pressions et les débits d'injection pour mimer des flux de vascularisation. (Figure 36)

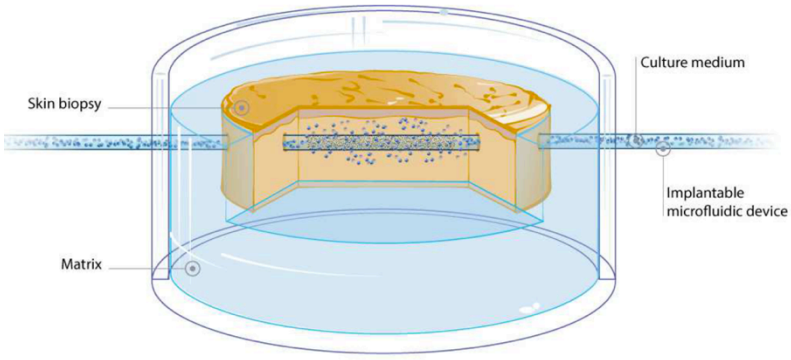


Figure 36 . Illustration de l'implantation d'un cathéter poreux au sein d'un échantillon Nativeskin

Plusieurs solutions technologiques seront étudiées et évaluées :

- Cathéters implantables micro usinés : je souhaite mettre à profit mon expérience et le savoir faire du LAAS CNRS dans le domaine du micro-usinage et de la microfabrication 2D/3D pour structurer des micro cathéter commerciaux de façon à générer des systèmes de porosité contrôlée. Ces cathéters, de diamètre externe compris entre 500 et 300µm seront usinés de façon à générer des pores de diamètre <100µm qui assureront une diffusion des milieux durant l'injection.

- Fibres poreuses : en parallèle nous évaluerons les performances de fibres poreuses (Hollow fibers), généralement utilisées dans des opération de micro dialyse, pour la vascularisation de modèles de tissus. Ces fibres présentent une porosité à l'échelle nanométrique (1- 750kDa) avec des diamètres extérieurs de l'ordre de 500µm.

- Dispositifs microfluidiques 3D : enfin, nous évaluerons les capacités des équipements d'impression 3D développés dans le cadre de mes activités de recherche pour la réalisation de microdispositifs poreux, implantables dont la morphologie et la porosité pourront être ajustés.

Dans les deux cas, nous évaluerons les performances de ces systèmes pour la vascularisation et l'amélioration de la viabilité des tissus ainsi que pour la récupération de biomolécules ou de facteurs sécrétés par le tissu.

Dans une deuxième phase plus applicative, l'intégration du système de vascularisation au sein du modèle Nativeskin se fera par le développement d'une nouvelle génération de support (insert) de culture. Ce support intègrera un système d'alimentation microfluidique et aura vocation a être connecté sur une plaque support multiplexée, qui, de façon similaire aux plaques multipuits, servira de base pour l'alimentation en parallèle de plusieurs échantillons. Il sera réalisé sur la base de l'expertise du LAAS CNRS dans le développement de dispositifs microfluidiques par moulage de polymères et impression 3D. Ce nouveau modèle intégré de culture « Flowskin » est représenté schématiquement sur la Figure 37.

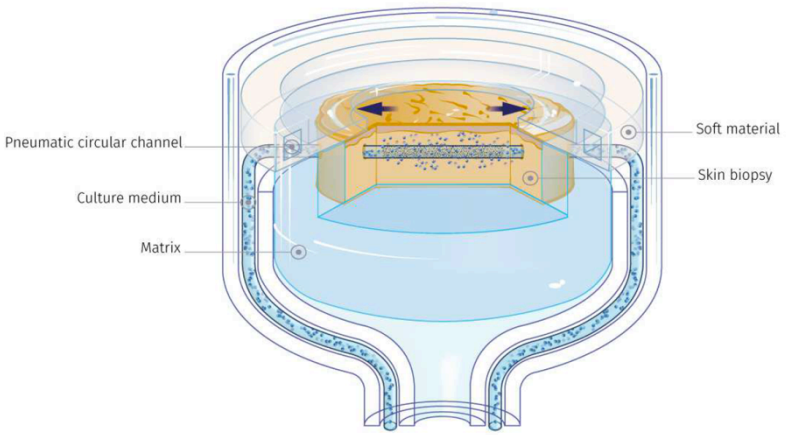


Figure 37 . Illustration d'un exemple de dispositif inétgré pour la vascularisation des modèles NativeSkin.

Au niveau instrumental, l'injection et la collection des milieux de culture via les systèmes implantables seront contrôlées par une plateforme de gestion des flux et pression. Cette plateforme permettra d'alimenter et de mettre en culture en parallèle jusqu'à 12 échantillons avec un contrôle indépendant des paramètres microfluidiques sur chaque échantillon. Les débits seront contrôlés dans une gamme de (0.01 µL/µm à 10 µL/min) de façon à reproduire des paramètres de diffusion et hydrodynamiques comparables à ceux d'un tissu in vivo. Les modulations temporelles du flux seront également considérées pour reproduire le caractère pulsatile de la circulation sanguine. Le système reposera sur l'utilisation de pousse-seringues de précision, équipé d'un module de chargement automatique, qui permettra une mise en culture des échantillons sur des périodes longues >15jours. Il permettra l'injection en continue de milieu de culture pour garantir la viabilité cellulaire ainsi que l'injection, à des temps définis, de molécules actives (ex: drogues, médicaments) ou de marqueurs qui seront internalisés par le tissu. Cette plateforme microfluidique permettra également la collection complète et/ou le prélèvement de micro volumes (1-100µL) à des temps définis du milieu de culture sortant de chacun des échantillons mis en culture. Cette approche permettra de collecter des marqueurs de viabilité cellulaire ou des facteurs sécrétés par le tissu au cours de sa culture.

Des simulations numériques (COMSOL) seront réalisées et confrontées aux mesures expérimentales tout au long du projet pour modéliser les mécanismes de diffusion et de perfusion au sein des modèles de peau. Ces simulations prendront en compte les phénomènes de diffusion, convection et d'écoulements laminaires et leur couplage au sein des dispositifs implantés et de l'échantillon de peau.

Au niveau biologique, des méthodes analytiques et histologiques seront mises en œuvre pour analyser l'impact du système microfluidique de vascularisation sur les biopsies humaines. Ces méthodes seront développées par Genoskin et seront ensuite transférées au LAAS CNRS (Intégrité des tissus par marquages Hematoxyline et Eosine, Tests de viabilité par MTT et WST-8 assay, mesure de la prolifération cellulaire par marquage anti-Ki67, analyse de l'apoptose et de la nécrose par marquage anti-Active caspase 3 et Tunnel assay, expression des marqueurs de l'épiderme tels que anti-K14, anti –involucrine et anti-filaggrine, marquages du derme et des jonctions derme-épiderme (anti- collagène I, II, IV &VII, anti-laminine 5)).

Le développement d'un modèle de peau ex-vivo pseudo vascularisé permettra à Genoskin de proposer à ses clients un modèle encore plus proche de la peau humaine. Du fait du coût très élevé des essais cliniques pour un candidat médicament, l'intérêt de l'industrie pharmaceutique pour le développement de modèles plus prédictifs de la réponse humaine est très fort. Outre le gain de viabilité, l'ajout d'une vascularisation artificielle aux modèles développés par Genoskin ouvre des applications particulièrement prometteuses pour le diagnostic in vitro, le criblage pharmaceutique, la cancérologie ainsi que la transplantation d'organes. Tout d'abord, il sera possible, via le dispositif implantable, d'administrer des composés directement au cœur du tissu et de façon contrôlée dans le temps. Cette approche permettra d'étudier la toxicité ou l'efficacité de médicaments de référence (testés en clinique) après administration systémique (en sous cutanée via le système de perfusion), et l'analyse de la diffusion des molécules administrées en topique ou par injection sous cutanée vers le milieu circulant. L'utilisation de médicaments de référence (par exemple pour le traitement anti-cancer ayant une toxicité cutanée ou pour le traitement du psoriasis) déjà utilisés en clinique chez l'homme permettra de valider le caractère prédictif de la réponse humaine du modèle en termes de toxicité et de pharmacocinétique. Par ailleurs, il serait possible d'analyser la diffusion de médicaments dans le tissu en 3D, via l'analyse du flux sortant, et de confronter l'expérience avec la modélisation numérique de la diffusion.

Bibliographie

(1) Autebert, J.; Coudert, B.; Champ, J.; Saias, L.; Guneri, E. T.; Lebofsky, R.; Bidard, F.-C.; Pierga, J.-Y.; Farace, F.; Descroix, S.; et al. High Purity Microfluidic Sorting and Analysis of Circulating Tumor Cells: Towards Routine Mutation Detection. *Lab Chip* **2015**.

(2) Autebert, J.; Coudert, B.; Bidard, F.-C.; Pierga, J.-Y.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L. Microfluidic: An Innovative Tool for Efficient Cell Sorting. *Methods* **2012**, *57*, 297–307.

(3) Raimondi, C.; Nicolazzo, C.; Gradilone, A. Circulating Tumor Cells Isolation: The "post-EpCAM Era". *Chin. J. Cancer Res.* **2015**, *27*, 461–470.

(4) Nahavandi, S.; Baratchi, S.; Soffe, R.; Tang, S.-Y.; Nahavandi, S.; Mitchell, A.; Khoshmanesh, K. Microfluidic Platforms for Biomarker Analysis. *Lab Chip* **2014**, *14*, 1496–1514.

(5) Zhao, C.; Ge, Z.; Yang, C. Microfluidic Techniques for Analytes Concentration. *Micromachines* **2017**, *8*, 28.

(6) Giordano, B. C.; Burgi, D. S.; Hart, S. J.; Terray, A. On-Line Sample Pre-Concentration in Microfluidic Devices: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *718*, 11–24.

(7) Tsougeni, K.; Petrou, P. S.; Awsiuk, K.; Marzec, M. M.; Ioannidis, N.; Petrouleas, V.; Tserepi, A.; Kakabakos, S. E.; Gogolides, E. Direct Covalent Biomolecule Immobilization on Plasma-Nanotextured Chemically Stable Substrates. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 14670–14681.

(8) Witek, M. A. Purification and Preconcentration of Genomic DNA from Whole Cell Lysates Using Photoactivated Polycarbonate (PPC) Microfluidic Chips. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e74–e74.

(9) Vázquez, M.; Paull, B. Review on Recent and Advanced Applications of Monoliths and Related Porous Polymer Gels in Micro-Fluidic Devices. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *668*, 100–113.

(10) Dempsey, N. M.; Le Roy, D.; Marelli-Mathevon, H.; Shaw, G.; Dias, A.; Kramer, R. B. G.; Viet Cuong, L.; Kustov, M.; Zanini, L. F.; Villard, C.; et al. Micro-Magnetic Imprinting of High Field Gradient Magnetic Flux Sources. *Appl. Phys. Lett.* **2014**, *104*, 262401.

(11) Hoshino, K.; Huang, Y.-Y.; Lane, N.; Huebschman, M.; Uhr, J. W.; Frenkel, E. P.; Zhang, X. Microchip-Based Immunomagnetic Detection of Circulating Tumor Cells. *Lab Chip* **2011**, *11*, 3449.

(12) Lacharme, F.; Vandevyver, C.; Gijs, M. A. M. Full On-Chip Nanoliter Immunoassay by Geometrical Magnetic Trapping of Nanoparticle Chains. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2905–2910.

(13) Lien, K.-Y.; Lin, J.-L.; Liu, C.-Y.; Lei, H.-Y.; Lee, G.-B. Purification and Enrichment of Virus Samples Utilizing Magnetic Beads on a Microfluidic System. *Lab Chip* **2007**, *7*, 868.

(14) Afshar, R.; Moser, Y.; Lehnert, T.; Gijs, M. A. M. Magnetic Particle Dosing and Size Separation in a Microfluidic Channel. *Sensors Actuators B Chem.* **2011**, *154*, 73–80.

(15) Pereiro, I.; Tabnaoui, S.; Fermigier, M.; du Roure, O.; Descroix, S.; Viovy, J.-L.; Malaquin, L. Magnetic Fluidized Bed for Solid Phase Extraction in Microfluidic Systems. *Lab Chip* **2017**, *17*, 1603–1615.

(16) Bouguelia, S.; Roupioz, Y.; Slimani, S.; Mondani, L.; Casabona, M. G.; Durmort, C.; Vernet, T.; Calemczuk, R.; Livache, T. On-Chip Microbial Culture for the Specific Detection of Very Low Levels of Bacteria. *Lab Chip* **2013**, *13*, 4024.

(17) Kang, D.-K.; Ali, M. M.; Zhang, K.; Huang, S. S.; Peterson, E.; Digman, M. A.; Gratton, E.; Zhao, W.

Rapid Detection of Single Bacteria in Unprocessed Blood Using Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5427.

(18) Zhu, P.; Wang, L. Passive and Active Droplet Generation with Microfluidics: A Review. *Lab Chip* **2017**, *17*, 34–75.

(19) Agresti, J. J.; Antipov, E.; Abate, A. R.; Ahn, K.; Rowat, A. C.; Baret, J.-C.; Marquez, M.; Klibanov, A. M.; Griffiths, A. D.; Weitz, D. A. Ultrahigh-Throughput Screening in Drop-Based Microfluidics for Directed Evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 4004–4009.

(20) Chabert, M.; Dorfman, K. D.; Viovy, J.-L. Droplet Fusion by Alternating Current (AC) Field Electrocoalescence in Microchannels. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3706–3715.

(21) Chabert, M.; Viovy, J.-L. Microfluidic High-Throughput Encapsulation and Hydrodynamic Self-Sorting of Single Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 3191–3196.

(22) Edd, J. F.; Di Carlo, D.; Humphry, K. J.; Köster, S.; Irimia, D.; Weitz, D. A.; Toner, M. Controlled Encapsulation of Single-Cells into Monodisperse Picolitre Drops. *Lab Chip* **2008**, *8*, 1262.

(23) Baret, J.-C. Surfactants in Droplet-Based Microfluidics. *Lab Chip* **2012**, *12*, 422–433.

(24) Ali-Cherif, A.; Begolo, S.; Descroix, S.; Viovy, J.-L.; Malaquin, L. Programmable Magnetic Tweezers and Droplet Microfluidic Device for High-Throughput Nanoliter Multi-Step Assays. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 10765–10769.

(25) Teste, B.; Ali-Cherif, A.; Viovy, J. L.; Malaquin, L. A Low Cost and High Throughput Magnetic Bead-Based Immuno-Agglutination Assay in Confined Droplets. *Lab Chip* **2013**, *13*, 2344–2349.

(26) Ferraro, D.; Champ, J.; Teste, B.; Serra, M.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L.; de Cremoux, P.; Descroix, S. Microfluidic Platform Combining Droplets and Magnetic Tweezers: Application to HER2 Expression in Cancer Diagnosis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25540.

(27) Teste, B.; Champ, J.; Londono-Vallejo, A.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L.; Draskovic, I.; Mottet, G. Chromatin Immunoprecipitation in Microfluidic Droplets: Towards Fast and Cheap Analyses. *Lab Chip* **2017**, *17*, 530–537.

(28) Teste, B.; Jamond, N.; Ferraro, D.; Viovy, J.-L.; Malaquin, L. Selective Handling of Droplets in a Microfluidic Device Using Magnetic Rails. *Microfluid. Nanofluidics* **2015**, *19*, 141–153.

(29) Saliba, A.-E.; Saias, L.; Psychari, E.; Minc, N.; Simon, D.; Bidard, F.-C.; Mathiot, C.; Pierga, J.-Y.; Fraisier, V.; Salamero, J.; et al. Microfluidic Sorting and Multimodal Typing of Cancer Cells in Self-Assembled Magnetic Arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 14524–14529.

(30) Saias, L.; Autebert, J.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L. Design, Modeling and Characterization of Microfluidic Architectures for High Flow Rate, Small Footprint Microfluidic Systems. *Lab Chip* **2011**, *11*, 822–832.

(31) Perez-Toralla, K.; Mottet, G.; Tulukcuoglu-Guneri, E.; Champ, J.; Bidard, F.-C.; Pierga, J.-Y.; Klijanienko, J.; Draskovic, I.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L.; et al. FISH-in-CHIPS: A Microfluidic Platform for Molecular Typing of Cancer Cells. In; 2017; pp. 211–220.

(32) Coq, N.; Bricard, A.; Delapierre, F.-D.; Malaquin, L.; du Roure, O.; Fermigier, M.; Bartolo, D. Collective Beating of Artificial Microcilia. *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *107*.

(33) Delapierre, F.-D.; Mottet, G.; Taniga, V.; Boisselier, J.; Viovy, J.; Malaquin, L. High Throughput Micropatterning of Interspersed Cell Arrays Using Capillary Assembly. *Biofabrication* **2017**.

(34) Renault, R.; Sukenik, N.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L.; Peyrin, J.-M.; Bottani, S.; Monceau, P.; Moses, E.; Vignes, M. Combining Microfluidics, Optogenetics and Calcium Imaging to Study Neuronal Communication In Vitro. *PLoS One* **2015**, *10*, e0120680.

(35) Yamada, A.; Vignes, M.; Bureau, C.; Mamane, A.; Venzac, B.; Descroix, S.; Viovy, J.-L.; Villard, C.; Peyrin, J.-M.; Malaquin, L. In-Mold Patterning and Actionable Axo-Somatic Compartmentalization for on-Chip Neuron Culture. *Lab Chip* **2016**, *16*, 2059–2068.

(36) Murphy, S. V; Atala, A. 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 773–785.

(37) Pati, F.; Gantelius, J.; Svahn, H. A. 3D Bioprinting of Tissue/Organ Models. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55*, 4650–4665.

(38) Knowlton, S.; Onal, S.; Yu, C. H.; Zhao, J. J.; Tasoglu, S. Bioprinting for Cancer Research. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 504–513.

(39) Vermeulen, L.; de Sousa e Melo, F.; Richel, D. J.; Medema, J. P. The Developing Cancer Stem-Cell Model: Clinical Challenges and Opportunities. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, e83-9.

(40) Lund, A. W.; Yener, B.; Stegemann, J. P.; Plopper, G. E. The Natural and Engineered 3D Microenvironment as a Regulatory Cue During Stem Cell Fate Determination. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2009**, *15*, 371–380.

(41) Quail, D. F.; Joyce, J. A. Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1423–1437.

(42) Hanahan, D.; Coussens, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 309–322.

(43) Pati, F.; Gantelius, J.; Svahn, H. A. 3D Bioprinting of Tissue/Organ Models. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55*, 4650–4665.

(44) Brock, A.; Chang, E.; Ho, C.-C.; LeDuc, P.; Jiang, X.; Whitesides, G. M.; Ingber, D. E. Geometric Determinants of Directional Cell Motility Revealed Using Microcontact Printing. *Langmuir* **2003**, *19*, 1611–1617.

(45) Théry, M.; Racine, V.; Pépin, A.; Piel, M.; Chen, Y.; Sibarita, J.-B.; Bornens, M. The Extracellular Matrix Guides the Orientation of the Cell Division Axis. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 947–953.

(46) Ranga, A.; Gobaa, S.; Okawa, Y.; Mosiewicz, K.; Negro, A.; Lutolf, M. P. 3D Niche Microarrays for Systems-Level Analyses of Cell Fate. *Nat. Commun.* **2014**, *5*.

(47) Bhatia, S. N.; Ingber, D. E. Microfluidic Organs-on-Chips. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 760–772.

(48) Mammoto, T.; Mammoto, A.; Ingber, D. E. Mechanobiology and Developmental Control. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2013**, *29*, 27–61.

(49) Reuters. U.S. to develop chip that tests if a drug is toxic. http://www.msnbc.msn.com/id/44554007/ns/%0Ahealth-health care/-.To5AMnPaixF.

(50) Roix, J.; Saha, S. TNF-? Blockade Is Ineffective in Animal Models of Established Polycystic Kidney Disease. *BMC Nephrol.* **2013**, *14*, 233.

(51) Kolesky, D. B.; Truby, R. L.; Gladman, A. S.; Busbee, T. A.; Homan, K. A.; Lewis, J. A. 3D Bioprinting of Vascularized, Heterogeneous Cell-Laden Tissue Constructs. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3124–3130.

(52) Chang, C. C.; Boland, E. D.; Williams, S. K.; Hoying, J. B. Direct-Write Bioprinting Three-Dimensional Biohybrid Systems for Future Regenerative Therapies. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2011**, *98B*, 160–170.

(53) Cohen, D. L.; Malone, E.; Lipson, H.; Bonassar, L. J. Direct Freeform Fabrication of Seeded Hydrogels in Arbitrary Geometries. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 1325–1335.

(54) Iwami, K.; Noda, T.; Ishida, K.; Morishima, K.; Nakamura, M.; Umeda, N. Bio Rapid Prototyping by Extruding/aspirating/refilling Thermoreversible Hydrogel. *Biofabrication* **2010**, *2*, 14108.

(55) Smith, C. M.; Stone, A. L.; Parkhill, R. L.; Stewart, R. L.; Simpkins, M. W.; Kachurin, A. M.; Warren, W. L.; Williams, S. K. Three-Dimensional Bioassembly Tool for Generating Viable Tissue-Engineered Constructs. *Tissue Eng.* **2004**, *10*, 1566–1576.

(56) Chang, R.; Nam, J.; Sun, W. Effects of Dispensing Pressure and Nozzle Diameter on Cell Survival from Solid Freeform Fabrication–Based Direct Cell Writing. *Tissue Eng. Part A* **2008**, *14*, 41–48.

(57) Klebe, R. J. Cytoscribing: A Method for Micropositioning Cells and the Construction of Two- and Three-Dimensional Synthetic Tissues. *Exp. Cell Res.* **1988**, *179*, 362–373.

(58) Xu, T.; Zhao, W.; Zhu, J.-M.; Albanna, M. Z.; Yoo, J. J.; Atala, A. Complex Heterogeneous Tissue Constructs Containing Multiple Cell Types Prepared by Inkjet Printing Technology. *Biomaterials* **2013**, *34*, 130–139.

(59) Barron, J. A.; Wu, P.; Ladouceur, H. D.; Ringeisen, B. R. Biological Laser Printing: A Novel Technique for Creating Heterogeneous 3-Dimensional Cell Patterns. *Biomed. Microdevices* **2004**, *6*, 139–147.

(60) Guillemot, F.; Souquet, A.; Catros, S.; Guillotin, B.; Lopez, J.; Faucon, M.; Pippenger, B.; Bareille, R.; Rémy, M.; Bellance, S.; et al. High-Throughput Laser Printing of Cells and Biomaterials for Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 2494–2500.

(61) Visser, J.; Peters, B.; J Burger, T.; Boomstra, J.; J A Dhert, W.; P W Melchels, F.; Malda, J. Biofabrication of Multi-Material Anatomically Shaped Tissue Constructs. *Biofabrication* **2013**, *5*, 35007.

(62) Nahmias, Y.; Odde, D. J. Micropatterning of Living Cells by Laser-Guided Direct Writing: Application to Fabrication of Hepatic–endothelial Sinusoid-like Structures. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2288–2296.

(63) Bajaj, P.; Schweller, R. M.; Khademhosseini, A.; West, J. L.; Bashir, R. 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2014**, *16*, 247–276.

(64) Gobaa, S.; Hoehnel, S.; Roccio, M.; Negro, A.; Kobel, S.; Lutolf, M. P. Artificial Niche Microarrays for Probing Single Stem Cell Fate in High Throughput. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 949–955.

(65) Ehrbar, M.; Sala, A.; Lienemann, P.; Ranga, A.; Mosiewicz, K.; Bittermann, A.; Rizzi, S. C.; Weber, F. E.; Lutolf, M. P. Elucidating the Role of Matrix Stiffness in 3D Cell Migration and Remodeling. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 284–293.

(66) Juncker, D.; Schmid, H.; Delamarche, E. Multipurpose Microfluidic Probe. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 622–628.

(67) Mosiewicz, K. A.; Kolb, L.; van der Vlies, A. J.; Martino, M. M.; Lienemann, P. S.; Hubbell, J. A.; Ehrbar, M.; Lutolf, M. P. In Situ Cell Manipulation through Enzymatic Hydrogel Photopatterning. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 1072–1078.

(68) Fairbanks, B. D.; Schwartz, M. P.; Halevi, A. E.; Nuttelman, C. R.; Bowman, C. N.; Anseth, K. S. A Ver-

satile Synthetic Extracellular Matrix Mimic via Thiol-Norbornene Photopolymerization. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 5005–5010.

(69) Pati, F.; Jang, J.; Ha, D.-H.; Won Kim, S.; Rhie, J.-W.; Shim, J.-H.; Kim, D.-H.; Cho, D.-W. Printing Three-Dimensional Tissue Analogues with Decellularized Extracellular Matrix Bioink. *Nat. Commun.* **2014**, *5*.

(70) Nichol, J. W.; Koshy, S. T.; Bae, H.; Hwang, C. M.; Yamanlar, S.; Khademhosseini, A. Cell-Laden Microengineered Gelatin Methacrylate Hydrogels. *Biomaterials* **2010**, *31*, 5536–5544.

(71) Gauvin, R.; Chen, Y.-C.; Lee, J. W.; Soman, P.; Zorlutuna, P.; Nichol, J. W.; Bae, H.; Chen, S.; Khademhosseini, A. Microfabrication of Complex Porous Tissue Engineering Scaffolds Using 3D Projection Stereolithography. *Biomaterials* **2012**, *33*, 3824–3834.

(72) Fairbanks, B. D.; Schwartz, M. P.; Bowman, C. N.; Anseth, K. S. Photoinitiated Polymerization of PEG-Diacrylate with Lithium Phenyl-2,4,6-Trimethylbenzoylphosphinate: Polymerization Rate and Cytocompatibility. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6702–6707.

(73) Chan, V.; Zorlutuna, P.; Jeong, J. H.; Kong, H.; Bashir, R. Three-Dimensional Photopatterning of Hydrogels Using Stereolithography for Long-Term Cell Encapsulation. *Lab Chip* **2010**, *10*, 2062.

(74) Caliari, S. R.; Burdick, J. A. A Practical Guide to Hydrogels for Cell Culture. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 405–414.

(75) Ingber, D. E. Cellular Mechanotransduction: Putting All the Pieces Together Again. *FASEB J.* **2006**, *20*, 811–827.

(76) Chen, C. S.; Mrksich, M.; Huang, S.; Whitesides, G. M.; Ingber, D. E. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science* **1997**, *276*, 1425–1428.

(77) O'Connell, J. B.; Maggard, M. A.; Ko, C. Y. Colon Cancer Survival Rates With the New American Joint Committee on Cancer Sixth Edition Staging. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 1420–1425.

(78) Barker, N., van de Wetering, M., Clevers, H. The Intestinal Stem Cell. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 856–1864.

(79) Clevers, H. The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell* **2013**, *154*.

(80) Kim, B. J.; Hannanta-anan, P.; Chau, M.; Kim, Y. S.; Swartz, M. A.; Wu, M. Cooperative Roles of SDF-1α and EGF Gradients on Tumor Cell Migration Revealed by a Robust 3D Microfluidic Model. *PLoS One* **2013**, *8*, e68422.

(81) Costello, C. M.; Hongpeng, J.; Shaffiey, S.; Yu, J.; Jain, N. K.; Hackam, D.; March, J. C. Synthetic Small Intestinal Scaffolds for Improved Studies of Intestinal Differentiation. *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 1222–1232.

(82) Sung, J. H.; Yu, J.; Luo, D.; Shuler, M. L.; March, J. C. Microscale 3-D Hydrogel Scaffold for Biomimetic Gastrointestinal (GI) Tract Model. *Lab Chip* **2011**, *11*, 389–392.

(83) Yuli Wang, Dulan B. Gunasekara, Mark I. Reed, Matthew DiSalvo, S. J. B.; Christopher E. Sims, Scott T. Magness, N. L. A. A Microengineered Collagen Scaffold for Generating a Polarized Crypt-Villus Architecture of Human Small Intestinal Epithelium. *Biomaterials* **2017**.

(84) Kim, H. J.; Ingber, D. E. Gut-on-a-Chip Microenvironment Induces Human Intestinal Cells to Undergo Villus Differentiation. *Integr. Biol.* **2013**, *5*, 1130.

(85) Sensebé, L.; Fleury-Cappellesso, S. Biodistribution of Mesenchymal Stem/stromal Cells in a Preclinical Setting. *Stem Cells Int.* **2013**, *2013*, 678063.

(86) Naji, A.; Rouas-Freiss, N.; Durrbach, A.; Carosella, E. D.; Sensébé, L.; Deschaseaux, F. Concise Review: Combining Human Leukocyte Antigen G and Mesenchymal Stem Cells for Immunosuppressant Biotherapy. *Stem Cells* **2013**, *31*, 2296–2303.

(87) Chabot, V.; Dromard, C.; Rico, A.; Langonné, A.; Gaillard, J.; Guilloton, F.; Casteilla, L.; Sensebé, L. Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Interaction with β1 Integrin Is Required for Platelet-Derived Growth Factor-AB-Induced Human Mesenchymal Stem/stromal Cell Migration. *Stem Cell Res. Ther.* **2015**, *6*, 188.

(88) Méndez-Ferrer, S.; Michurina, T. V.; Ferraro, F.; Mazloom, A. R.; MacArthur, B. D.; Lira, S. A.; Scadden, D. T.; Ma'ayan, A.; Enikolopov, G. N.; Frenette, P. S. Mesenchymal and Haematopoietic Stem Cells Form a Unique Bone Marrow Niche. *Nature* **2010**, *466*, 829–834.

(89) Holle, A. W.; Young, J. L.; Spatz, J. P. In Vitro Cancer cell–ECM Interactions Inform in Vivo Cancer Treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97*, 270–279.

(90) Handorf, A. M.; Zhou, Y.; Halanski, M. A.; Li, W.-J. Tissue Stiffness Dictates Development, Homeostasis, and Disease Progression. *Organogenesis* **2015**, *11*, 1–15.

(91) Bose, S.; Vahabzadeh, S.; Bandyopadhyay, A. Bone Tissue Engineering Using 3D Printing. *Mater. Today* **2013**, *16*, 496–504.

(92) Fabien Meziere, Petra Juskova, Jason Woittequand, Marie Muller, Emmanuel BOSSY, Laurent Malaquin, and A. D. Experimental Observation of Ultrasound Fast and Slow Waves through Three-Dimensional-Printed Trabecular Bone Phantoms. *JASA* **2016**, *In Press*.

(93) Mézière, F.; Juskova, P.; Woittequand, J.; Muller, M.; Bossy, E.; Boistel, R.; Malaquin, L.; Derode, A. Experimental Observation of Ultrasound Fast and Slow Waves through Three-Dimensional Printed Trabecular Bone Phantoms. *J. Acoust. Soc. Am.* **2016**, *139*, EL13-EL18.

(94) Mendelson, A.; Frenette, P. S. Hematopoietic Stem Cell Niche Maintenance during Homeostasis and Regeneration. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 833–846.

(95) Takayanagi, H. New Developments in Osteoimmunology. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2012**, *8*, 684–689.

(96) Rouwkema, J.; Rivron, N. C.; van Blitterswijk, C. A. Vascularization in Tissue Engineering. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 434–441.

(97) Huh, D.; Hamilton, G. A.; Ingber, D. E. From 3D Cell Culture to Organs-on-Chips. *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 745–754.

(98) van Duinen, V.; Trietsch, S. J.; Joore, J.; Vulto, P.; Hankemeier, T. Microfluidic 3D Cell Culture: From Tools to Tissue Models. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *35*, 118–126.

(99) Kim, S.; Kim, W.; Lim, S.; Jeon, J. Vasculature-On-A-Chip for In Vitro Disease Models. *Bioengineering* **2017**, *4*, 8.

(100) Hasan, A.; Paul, A.; Vrana, N. E.; Zhao, X.; Memic, A.; Hwang, Y.-S.; Dokmeci, M. R.; Khademhosseini, A. Microfluidic Techniques for Development of 3D Vascularized Tissue. *Biomaterials* **2014**, *35*, 7308–7325.

(101) Takei, T.; Sakai, S.; Yoshida, M. In Vitro Formation of Vascular-like Networks Using Hydrogels. *J. Bios-*

ci. Bioeng. **2016**, *122*, 519–527.

(102) Lewis, D. M.; Gerecht, S. Microfluidics and Biomaterials to Study Angiogenesis. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2016**, *11*, 114–122.

(103) Rouwkema, J.; Khademhosseini, A. Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks. *Trends Biotechnol.* **2016**, *34*, 733–745.

(104) Calapre, L.; Gray, E. S.; Kurdykowski, S.; David, A.; Hart, P.; Descargues, P.; Ziman, M. Heat-Mediated Reduction of Apoptosis in UVB-Damaged Keratinocytes in Vitro and in Human Skin Ex Vivo. *BMC Dermatol.* **2016**, *16*, 6.

(105) Abd, E.; Yousuf, S.; Pastore, M.; Telaprolu, K.; Mohammed, Y.; Namjoshi, S.; Grice, J.; Roberts, M. Skin Models for the Testing of Transdermal Drugs. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* **2016**, *Volume 8*, 163–176.

(106) Khong, Y. M.; Zhang, J.; Zhou, S.; Cheung, C.; Doberstein, K.; Samper, V.; Yu, H. Novel Intra-Tissue Perfusion System for Culturing Thick Liver Tissue. *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 2345–2356.

Curriculum Vitae

Dr. Malaquin Laurent, 41 ans
Chargé de recherche, CR1, LAAS CNRS,
7, avenue du colonel Roche, 31031 Toulouse
Tel : +33 (0)5 61 33 63 84
Email : Laurent.malaquin@laas.fr

ResearcherID : B-4852-2016
ORCID : 0000-0003-4791-3352

Site Web : https://homepages.laas.fr/lmalaqui/
Google Scholar : https://scholar.google.fr/citations?user=y9Ixj54AAAAJ&hl=fr
H Index : 20

Expérience professionnelle :

Depuis 2015 Chargé de Recherche, Affilié au LAAS CNRS – Toulouse

Changement de section vers la section 8 (2016)

Soutenance HDR programmée en Décembre 2017

2007 – 2014 Chargé de recherche (Section11) , Institut Curie / CNRS – UMR 168

2006 – 2007 Post Doctorat, LPN - CNRS – Marcoussis, France

2004 – 2006 Post Doctorat, IBM Research Laboratory GmbH – Rüschlikon (Suisse)

Cursus scolaire :

2000 - 2004 Doctorant, LAAS-CNRS, P. SABATIER Université Toulouse III, France. « High Sensitivity Electrical Biodetection using NanoElectrodes based devices. Towards the detection of biomolecules», Directeur: Pr. C.VIEU, LAAS – CNRS, Toulouse (France)

1999 - 2000 : DEA nanotechnologies

Compétences :

- Microfluidique et « Lab on Chip »
- Bioimpression et Impression 3D
- Micro – Nano systèmes
- Analyse et Diagnostic Biomédical
- Ingénierie tissulaire, Microenvironnements pour la culture cellulaire
- Auto-Assemblage et intégration de colloïdes

Production scientifiques et valorisation:

- Publications RCIL : 54
- Chapitre de livre : 3
- Brevets : 15
- Création de startup : 1

Publications Scientifiques (Total : 54)

(1) Accardo, A.; Blatché, M.-C.; Courson, R.; Loubinoux, I.; Thibault, C.; Malaquin, L.; Vieu, C. Multiphoton Direct Laser Writing and 3D Imaging of Polymeric Freestanding Architectures for Cell Colonization. *Small* **2017**, 1700621.

(2) Pereiro, I.; Tabnaoui, S.; Fermigier, M.; du Roure, O.; Descroix, S.; Viovy, J.-L.; Malaquin, L. Magnetic Fluidized Bed for Solid Phase Extraction in Microfluidic Systems. *Lab Chip* **2017**, *17*, 1603–1615.

(3) Delapierre, F.-D.; Mottet, G.; Taniga, V.; Boisselier, J.; Viovy, J.; Malaquin, L. High Throughput Micropatterning of Interspersed Cell Arrays Using Capillary Assembly. *Biofabrication* **2017**.

(4) Teste, B.; Champ, J.; Londono-Vallejo, A.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L.; Draskovic, I.; Mottet, G. Chromatin Immunoprecipitation in Microfluidic Droplets: Towards Fast and Cheap Analyses. *Lab Chip* **2017**, *17*, 530–537.

(5) Pereiro, I.; Bendali, A.; Tabnaoui, S.; Alexandre, L.; Srbova, J.; Bilkova, Z.; Deegan, S.; Joshi, L.; Viovy, J.-L.; Malaquin, L.; et al. A New Microfluidic Approach for the One-Step Capture, Amplification and Label-Free Quantification of Bacteria from Raw Samples. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1329–1336.

(6) Yamada, A.; Vignes, M.; Bureau, C.; Mamane, A.; Venzac, B.; Descroix, S.; Viovy, J.-L.; Villard, C.; Peyrin, J.-M.; Malaquin, L. In-Mold Patterning and Actionable Axo-Somatic Compartmentalization for on-Chip Neuron Culture. *Lab Chip* **2016**, *16*, 2059–2068.

(7) Ferraro, D.; Champ, J.; Teste, B.; Serra, M.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L.; de Cremoux, P.; Descroix, S. Microfluidic Platform Combining Droplets and Magnetic Tweezers: Application to HER2 Expression in Cancer Diagnosis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25540.

(8) Mézière, F.; Juskova, P.; Woittequand, J.; Muller, M.; Bossy, E.; Boistel, R.; Malaquin, L.; Derode, A. Experimental Observation of Ultrasound Fast and Slow Waves through Three-Dimensional Printed Trabecular Bone Phantoms. *J. Acoust. Soc. Am.* **2016**, *139*, EL13-EL18.

(9) Foncy, J.; Crestel, E.; Borges, J.-P.; Estève, A.; Cau, J. C.; Vieu, C.; Malaquin, L.; Trévisiol, E. Reversible Magnetic Clamp of a Microfluidic Interface for the Seric Detection of Food Allergies on Allergen Microarrays. *Microelectron. Eng.* **2016**, *158*, 16–21.

(10) Lagraulet, A.; Foncy, J.; Berteloite, B.; Esteve, A.; Blatche, M.-C.; Malaquin, L.; Vieu, C. InnoStamp 40 [Trade] and InnoScan 1100AL [Trade]: A Complete Automated Platform for Microstructured Cell Arrays. *Nat. Methods* **2015**, *12*.

(11) Ferraro, D.; Lin, Y.; Teste, B.; Talbot, D.; Malaquin, L.; Descroix, S.; Abou-Hassan, A. Continuous Chemical Operations and Modifications on Magnetic γ-Fe2O3 Nanoparticles Confined in Nanoliter Droplets for the Assembly of Fluorescent and Magnetic SiO2@γ-Fe2O3. *Chem. Commun.* **2015**.

(12) Marchand, R.; Carcenac, F.; Malaquin, L.; Trévisiol, E.; Vieu, C.; Thibault, C. Controlled Sealing of Nanopores Using an Easily Fabricated Silicon Platform Combining in Situ Optical and Electrical Monitoring. *Microelectron. Eng.* **2015**, *144*, 57–60.

(13) Pineda, F.; Bottausci, F.; Icard, B.; Malaquin, L.; Fouillet, Y. Using Electrofluidic Devices as Hyper-Elastic Strain Sensors: Experimental and Theoretical Analysis. *Microelectron. Eng.* **2015**, *144*, 27–31.

(14) Autebert, J.; Coudert, B.; Champ, J.; Saias, L.; Guneri, E. T.; Lebofsky, R.; Bidard, F.-C.; Pierga, J.-Y.; Farace, F.; Descroix, S.; et al. High Purity Microfluidic Sorting and Analysis of Circulating Tumor Cells: Towards Routine Mutation Detection. *Lab Chip* **2015**.

(15) Teste, B.; Jamond, N.; Ferraro, D.; Viovy, J.-L.; Malaquin, L. Selective Handling of Droplets in a Microfluidic Device Using Magnetic Rails. *Microfluid. Nanofluidics* **2015**, *19*, 141–153.

(16) Renault, R.; Sukenik, N.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L.; Peyrin, J.-M.; Bottani, S.; Monceau, P.; Moses, E.; Vignes, M. Combining Microfluidics, Optogenetics and Calcium Imaging to Study Neuronal Communication In Vitro. *PLoS One* **2015**, *10*, e0120680.

(17) Perez-Toralla, K.; Mottet, G.; Guneri, E. T.; Champ, J.; Bidard, F.-C.; Pierga, J.-Y.; Klijanienko, J.; Draskovic, I.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L.; et al. FISH in Chips: Turning Microfluidic Fluorescence in Situ Hybridization into a Quantitative and Clinically Reliable Molecular Diagnosis Tool. *Lab Chip* **2015**, *15*, 811–822.

(18) Mottet, G.; Perez-Toralla, K.; Tulukcuoglu, E.; Bidard, F.-C.; Pierga, J.-Y.; Draskovic, I.; Londono-Vallejo, A.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Louis Viovy, J. A Three Dimensional Thermoplastic Microfluidic Chip for Robust Cell Capture and High Resolution Imaging. *Biomicrofluidics* **2014**, *8*, 24109.

(19) Schelcher, G.; Guyon, C.; Ognier, S.; Cavadias, S.; Martinez, E.; Taniga, V.; Malaquin, L.; Tabeling, P.; Tatoulian, M. Cyclic Olefin Copolymer Plasma Millireactors. *Lab Chip* **2014**, *14*, 3037.

(20) Verhulsel, M.; Vignes, M.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Vignjevic, D. M.; Viovy, J. L. A Review of Microfabrication and Hydrogel Engineering for Micro-Organs on Chips. *Biomaterials*, 2014, *35*, 1816–1832.

(21) Perez-Toralla, K.; Champ, J.; Mohamadi, M. R.; Braun, O.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L.; Descroix, S. New Non-Covalent Strategies for Stable Surface Treatment of Thermoplastic Chips. *Lab Chip* **2013**, *13*, 4409–4418.

(22) Bruchet, A.; Taniga, V.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Goutelard, F.; Mariet, C. Centrifugal Microfluidic Platform for Radiochemistry: Potentialities for the Chemical Analysis of Nuclear Spent Fuels. *Talanta* **2013**, *116*, 488–494.

(23) Teste, B.; Ali-Cherif, A.; Viovy, J. L.; Malaquin, L. A Low Cost and High Throughput Magnetic Bead-Based Immuno-Agglutination Assay in Confined Droplets. *Lab Chip* **2013**, *13*, 2344–2349.

(24) Ali-Cherif, A.; Begolo, S.; Descroix, S.; Viovy, J.-L.; Malaquin, L. Programmable Magnetic Tweezers and Droplet Microfluidic Device for High-Throughput Nanoliter Multi-Step Assays. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 10765–10769.

(25) Miserere, S.; Mottet, G.; Taniga, V.; Descroix, S.; Viovy, J.-L.; Malaquin, L. Fabrication of Thermoplastics Chips through Lamination Based Techniques. *Lab Chip* **2012**, *12*, 1849–1856.

(26) Diakité, M. L. Y.; Champ, J.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Amblard, F.; Viovy, J.-L. A Low-Cost, Label-Free DNA Detection Method in Lab-on-Chip Format Based on Electrohydrodynamic Instabilities, with Application to Long-Range PCR. *Lab Chip* **2012**, *12*, 4738–4747.

(27) Autebert, J.; Coudert, B.; Bidard, F.-C.; Pierga, J.-Y.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L. Microfluidic: An Innovative Tool for Efficient Cell Sorting. *Methods* **2012**, *57*, 297–307.

(28) Saleem, M.; Delapierre, F.-D.; Malaquin, L.; Roux, A. Membrane Deformation Caused by Clathrin and Associated Adaptor Proteins In Vitro. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 406a.

(29) Montel, F.; Delarue, M.; Elgeti, J.; Malaquin, L.; Basan, M.; Risler, T.; Cabane, B.; Vignjevic, D.; Prost, J.; Cappello, G.; et al. Stress Clamp Experiments on Multicellular Tumor Spheroids. *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *107*, 188102.

(30) Coq, N.; Bricard, A.; Delapierre, F.-D.; Malaquin, L.; du Roure, O.; Fermigier, M.; Bartolo, D. Collective Beating of Artificial Microcilia. *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *107*.

(31) Begolo, S.; Colas, G.; Viovy, J.-L.; Malaquin, L. New Family of Fluorinated Polymer Chips for Droplet and Organic Solvent Microfluidics. *Lab Chip* **2011**, *11*, 508–512.

(32) Audonnet, V.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L. Polymeric Coatings on Micro- and Nanometric Particles for Bioapplications. *Bioanal. Rev.* **2011**, *3*, 41–66.

(33) Saias, L.; Autebert, J.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L. Design, Modeling and Characterization of Microfluidic Architectures for High Flow Rate, Small Footprint Microfluidic Systems. *Lab Chip* **2011**, *11*, 822–832.

(34) Lhoste, K.; Malaquin, L.; Billot, L.; Haghiri-Gosnet, A. M.; Chen, Y. Fabrication of High Density Gold Nanoparticle Arrays on Glass for High Sensitivity Bio-Detection. *Microelectron. Eng.* **2011**, *88*, 2474–2477.

(35) Ktari, N.; Poncet, P.; Sénéchal, H.; Malaquin, L.; Kanoufi, F.; Combellas, C.; Sénéchal, H.; Malaquin, L.; Kanoufi, F.; Combellas, C. Patterning of Polystyrene by Scanning Electrochemical Microscopy. Biological Applications to Cell Adhesion. *Langmuir* **2010**, *26*, 17348–17356.

(36) Saliba, A.-E.; Saias, L.; Psychari, E.; Minc, N.; Simon, D.; Bidard, F.-C.; Mathiot, C.; Pierga, J.-Y.; Fraisier, V.; Salamero, J.; et al. Microfluidic Sorting and Multimodal Typing of Cancer Cells in Self-Assembled Magnetic Arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 14524–14529.

(37) Fanizza, E.; Malaquin, L.; Kraus, T.; Wolf, H.; Striccoli, M.; Micali, N.; Taurino, A.; Agostiano, A.; Curri, M. L. Precision Patterning with Luminescent Nanocrystal-Functionalized Beads. *Langmuir* **2010**, *26*, 14294–14300.

(38) Plecis, A.; Malaquin, L.; Chen, Y. A Method for Fast Monitoring of Flow Rates in Microfluidic Channels. *J. Appl. Phys.* **2008**, *104*, 124909–124909.

(39) Velve Casquillas, G.; Bertholle, F.; Le Berre, M.; Meance, S.; Malaquin, L.; Greffet, J. J.; Chen, Y. Thermo-Resistance Based Micro-Calorimeter for Continuous Chemical Enthalpy Measurements. *Microelectron. Eng.* **2008**, *85*, 1367–1369.

(40) Shi, J.; Fang, A.; Malaquin, L.; Pepin, A.; Decanini, D.; Viovy, J.; Chen, Y. Highly Parallel Mix-and-Match Fabrication of Nanopillar Arrays Integrated in Microfluidic Channels for Long DNA Molecule Separation. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 153114.

(41) Ling, X. Y.; Malaquin, L.; Reinhoudt, D. N.; Wolf, H.; Huskens, J. An in Situ Study of the Adsorption Behavior of Functionalized Particles on Self-Assembled Monolayers via Different Chemical Interactions. *Langmuir* **2007**, *23*, 9990–9999.

(42) Kraus, T.; Malaquin, L.; Schmid, H.; Riess, W.; Spencer, N. D.; Wolf, H. Nanoparticle Printing with Single-Particle Resolution. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 570–576.

(43) Malaquin, L.; Kraus, T.; Schmid, H.; Delamarche, E.; Wolf, H. Controlled Particle Placement through Convective and Capillary Assembly. *Langmuir* **2007**, *23*, 11513–11521.

(44) Kraus, T.; Stutz, R.; Tobias, E.; Schmid, H.; Malaquin, L.; Spencer, N. D.; Wolf, H. Printing Chemical Gradients. *Langmuir* **2005**, *21*, 7796–7804.

(45) Kraus, T.; Malaquin, L.; Delamarche, E.; Schmid, H.; Spencer, N. D.; Wolf, H. Closing the Gap Between Self-Assembly and Microsystems Using Self-Assembly, Transfer, and Integration of Particles. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2438–2442.

(46) Malaquin, L.; Vieu, C.; Martinez, C.; Steck, B.; Carcenac, F. Interdigitated Nanoelectrodes for Nanoparticle Detection. *Nanotechnology* **2005**, *16*, S240–S245.

(47) Casimirius, S.; Flahaut, E.; Laberty-Robert, C.; Malaquin, L.; Carcenac, F.; Laurent, C.; Vieu, C. Microcontact Printing Process for the Patterned Growth of Individual CNTs. In *Microelectronic Engineering*; 2004; Vol. 73–74, pp. 564–569.

(48) Pourciel-Gouzy, M.; Sant, W.; Humenyuk, I.; Malaquin, L.; Dollat, X.; Temple-Boyer, P. Development of pH-ISFET Sensors for the Detection of Bacterial Activity. *Sensors Actuators B Chem.* **2004**, *103*, 247–251.

(49) Flahaut, E.; Laberty-robert, C.; Malaquin, L.; Carcenac, F.; Laurent, C.; Vieu, C. Microcontact Printing Process for the Patterned Growth of Individual CNTs. *Microelectron. Eng.* **2004**, *74*, 564–569.

(50) Malaquin, Laurent; Carcenac, Franck; Vieu, C. Nanoelectrode-Based Devices for Electrical Biodetection in Liquid Solution. *Microelectron. Eng.* **2004**, *73–74*, 887–892.

(51) Viallet, B.; Daran, E.; Malaquin, L. Effects of Ultraviolet/ozone Treatment on Benzocyclobutene Films. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* **2003**, *21*, 766.

(52) Sagnes, M.; Malaquin, L.; Carcenac, F.; Vieu, C.; Fournier, C. Imprint Lithography Using Thermo-Polymerisation of MMA. *Microelectron. Eng.* **2002**, *61–62*, 429–433.

(53) Malaquin, L.; Carcenac, F.; Vieu, C. Using Polydimethylsiloxane as a Thermocurable Resist for a Soft Imprint Lithography Process. *Microelectron. Eng.* **2002**, *62*, 379–384.

(54) Carcenac, F.; Malaquin, L.; Vieu, C. Fabrication of Multiple Nano-Electrodes for Molecular Addressing Using High-Resolution Electron Beam Lithography and Their Replication Using Soft Imprint Lithography. *Microelectron. Eng.* **2002**, *62*, 657–663.

Chapitres d'ouvrages (3)

1. « Bio-printing- État des lieux et perspectives », E. GUÉDON, L. MALAQUIN, JC ANDRÉ, 2017, Editions. T.I. , RE268, http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mecanique-th7/fabrication-additive-impression-3d-42633210/bio-printing-re268/
2. « Directed assembly of particles through convective flows and capillary forces » - F.D. Delapierre, L. Malaquin, Nanoscale liquid interfaces, Pan Stanford Publishing, Editors : T. Ondarçuhu, J.P. Aimé Chapter Title : 31 Oct 2012 (ISBN-10: 9814316458)
3. « Alternative Lithography » L.MALAQUIN, C.VIEU. Edité par Clivia M. Sotomayor Torres (2003) - Kluwer Academic publishers Boston/Dordrecht/London. Chapter 8 (p164–199): **"***Using PDMS as a thermocurable resist for a mold assisted Imprint process*".

Brevets (15)

1. ***Bioprinting Optifluidic platform*** *, L. Malaquin, J.L. Viovy, A. Assie Souleille, X. Dollat - SATT TTT Toulouse, Déposé le 1er aout 2017*

2. Viovy J.L., Malaquin L. , Descroix S. , Pereiro I., Alexandre L., **« Method for detecting organisms in a diluted sample »** , International extension WO2016062878 (A1), 2016-04-28

3. Venzac B., Yamada A., Viovy J.L., Descroix S., Malaquin L., **« Fluidic devices with at least one actionnable fiber»** , EP3120928 (A1), 2017-01-25

4. Viovy J.L.,Venzac B., Malaquin L., Descroix S., **« Entagled Fluidic device »** , EP3120927 (A1), 2017-01-25

5. Viovy J.L., Tabnaoui S., Malaquin L., Descroix S., **« Microfluidic system having a magnetic particle bed »**, US2015219650 (A1), 2015-08-06

6. Pineda F., Bottausci F., Fouillet Y., Malaquin L., **« Fluidic card comprising a fluid storage tank and a hyper-eleastic membrane »**, WO2015181170 (A1), 2015-12-03

7. Viovy J.L., Malaquin L. , Descroix S. , Alicherif A., Begolo S., **« Microfluidic system, Magnetic tweezers for droplet microfluidic applications »**, US2014342373 (A1), 2014-11-20

8. Viovy J.L., Amblard F., Malaquin L. , Venzac B., Diakite M., Descroix S. , Cisse I., Bockelman U., **«Method and devices for detecting macroions in a liquid medium »**, EP2867369 (A2) — 2015-05-06

9. Goulpeau J., Le Nel A., Lemang C., Mathys L., Viovy J.L., Taniga V., Autebert J., Malaquin L., **« A microfluidic system comprising a homogenizing component »**, WO2014037508 (A1) — 2014-03-13

10. Mariet C., Goutelard F., Bruchet A., Dugas V., Taniga V., Malaquin L., **« Method and device for microfluidic analysis, in particular of uranium and plutonium in radioactive samples »**, US2012282771 (A1), 2012-11-08

11. Viovy J.L., Saias L., Goulpeau J., Saliba A.E., Malaquin L., **« Cell Sorting device»**, US2011212440 (A1), 2011-09-01

12. Viovy J.L., Weber J., Debjani P., Malaquin L, **« Method for improving the bonding properties of microstructures substrates and devices prepared with this method »**, US2010104480 (A1) — 2010-04-29

Nano Lithography and self assembly :

13. Kraus T., Malaquin L., Wolf H., **« Electrode arrays and methods of fabricating the same using printing plates to arrange particles in an array »**, US2012282771 (A1), 2012-11-08

14. Peyrade J.P., Peyrade D., Vieu C., Malaquin L., **« Method of Detecting and Quantifying Analytes of Interest in a Liquid and Implementation Device »**, US2012070911 (A1), 2012-03-22

15. Bousseksou A., Vieu C., Letard J.F., Demont P., Tuchagues J.P., Malaquin L., Menegotto J., Salmon L., **« Molecular memory and method for making the same »**, US2005161728 (A1) — 2005-07-28

Séminaires et Conférences invitées

Microfluidic devices for cell culture and analysis, IPBS, L. Malaquin Toulouse, France 2017

High resolution 3D printing an bioprinting », IPGG – Groupement de Recherche (GdR) Microfluidique, Doctorants, Post Doctorants, L. Malaquin, Paris France , 2016

Technologies pour l'impression 3D haute résolution et la Bioimpression, Séminaire du Pôle Optitec, L. Malaquin, Montpellier, France, 2016

Lab on Chips for bio-molecular and cellular analysis : from droplet immunoassays to rare cell sorting - L. Malaquin, LPCNO, Toulouse France, 2015

Microenvironnements cellulaires tridimensionnels pour l'analyse des processus tumoraux - L. Malaquin, Cancer & Technologies pour la Santé, Toulouse, France, 2015

Development of Lab on Chips for bio-molecular and cellular analysis, POLYMAT Conference, L. Malaquin, Huatulco, Mexique 2015

Lab on Chips for biomolecular and cellular analysis : from droplet immunoassays to rare cell sorting. L. Malaquin, UNAM, Mexico, Mexique 2015

Lab on Chips for biomolecular and cellular analysis : from droplet immunoassays to rare cell sorting, L. Malaquin, UMR 1043, CPTP, Toulouse, 2014

MicroTAS 2012 - The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences – Okinawa, Japan, Oct. 28 – Nov. 3, 2012
Bruno Teste, AnaïS Ali-Cherif, StéPhanie Descroix, Laurent Malaquin
A low cost and high throughput magnetic bead-based immuno-agglutination assay in confined droplets

MNE 2012 - The 38th International Conference on Micro and Nano Engineering – Toulouse, France , September, 16-20, 2012
Julien Autebert, Benoit Coudert, Jean-yves Pierga, François Clément Bidard, Stéphanie Descroix, Laurent Malaquin, Jean-Louis Viovy, Fully automated immunomagnetic lab-on-chip for rare cancer cells sorting, enumeration and in-situ analysis.

EUJO-LIMMS Seminar - 12 December 2012 1. "Lab on chips for medical diagnosis. From rare cells sorting to droplet immunoassays", L. Malaquin, Lausanne

MNE 2011 - The 37th International Conference on Micro and Nano Engineering - Berlin, Germany, September, 19-23, 2011
Ali Cherif and L. Malaquin
A Platform combining activable magnetic tweezers and biphasic fluidic plugs for ultra-low volume and high throughput bioassay

Biophysics Day, Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse, 16 June 2010, 2. Microfluidic cancer cell sorting/typing (and other applications of microfluidics in cell biology), JL Viovy, L. Sais, J. Autebert, B. Coudert, J.-Y. Pierga, F.-C. Bidard, L. Malaquin, J.-L. Viovy

SEP"09 8ème congrès francophone de l'AfSep sur les sciences séparatives , Marseille, 30-11/3-12 09 3. Systèmes microfluidiques pour le diagnostic cellulaire du cancer. L. Saias, A.-E. Saliba, J.-Y. Pierga, P. Vielh, F. Farace, L. Malaquin, J.-L. Viovy

French Symposium on Emerging Technologies for micro-nanofabrication (JNTE 08), LAAS - CNRS - Toulouse, France, November 19 – 21, 2008 5. Self-assembly of nanoparticles : Applications in microelectronics and biology, L. Malaquin, T. Kraus, H. Wolf, JL Viovy

NNT 05 Conference (Nanoimprint and Nanoprint Technologies), 19 – 21 octobre 2005, Nara (Japon), 6. « Nanoprinting Opportunities », L. MALAQUIN, T. KRAUS, E. DELAMARCHE, H. SCHMID, N.D. SPENCER, H. WOLF MINATEC International Conference, MINATEC 2003, 22 – 26 septembre 2003

Journées Nationales de Microélectronique et Optoélectronique (JNMO), 29 Septembre – 2 Octobre 2002, St Aygulf (France) 8. "Nanolithographie par faisceau d'électrons et Nano-impression, application au nanoadressage", L.MALAQUIN, F.CARCENAC, C.VIEU.

Gordon Research Conference on Nanostructure Fabrication (GRC), 2002, Tilton School, Tilton (US) "Nano-Imprint Lithography Using Thermo or UV Curable Resists", L.MALAQUIN, F.CARCENAC, C.VIEU.

Proceedings de conférences, séminaires et communications orales ou par affiche

MicroTAS 2016 – The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. Oct. 2016

- MICROFLUIDIC INKING PROCESSES FOR LARGE-SCALE AND MULTIPLEXED MICRO-CONTACT PRINTING J. Foncy , C. Colin , A. Degache , A. Estève, J.-C. Cau , B. Berteloite , E. Trévisiol , C. Vieu , and L. Malaquin (oral)
- MICROCHANNELS EQUIPED WITH FORCE SENSORS FOR THE INVESTIGATION OF THE MECHANICAL FORCES EXERTED BY LIVING CELLS DURING MIGRATION, E. Desvignes, E. Desvignes, A. Bouissou, L. Malaquin, R. Poinclou, C. Thibault, C. Vieu
-

MNE 2016 - The 42th International Conference on Micro and Nano Engineering – Vienna, Sept.2016

- LARGE-SCALE AND MULTIPLEX BIOPATTERNING COMBINING AUTOMATED MICROFLUIDIC INKING AND MICRO-CONTACT PRINTING Julie Foncy et al. (oral)
- MICROCHANNELS EQUIPED WITH FORCE SENSORS FOR THE INVESTIGATION OF THE MECHANICAL FORCES EXERTED BY LIVING CELLS DURING MIGRATION. Emma Desvignes et al.(Oral)

MicroTAS 2015 – The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. Oct. 2015

- INTEGRATED MAGNETIC TWEEZERS IN A DROPLET MICROFLUIDIC LAB-ON-A-CHIP FOR BIOCHEMICAL ANALYSIS, Marco Serra, Davide Ferraro, Jerome Champ, Emilie Gontran, Jean-Louis Viovy, Laurent Malaquin, and Stephanie Descroix (oral)

- THE SMALL SIDE OF THE FORCE: A FEW STORIES AND PRINCIPLES IN MICROFLUIDIC MANIPULATION, J. Autebert, A. Bendali, J. Champ, S. Descroix, I. Ferrante, D. Ferraro, L. Geremie, I. Hajji, L. Malaquin, I. Pereiro, R. Renault, M. Serra, E. Tuluckuoglu, C. Villard, and Jean-Louis Viovy

- EPHESIA: DIGITAL DETECTION OF SINGLE HER2-HER3 PROTEIN INTERACTIONS IN CIRCULATING TUMOR CELLS FOR PRECISION MEDICINE, Ezgi Tulukcuoglu Guneri, Cécile Bureau, François Clément Bidard, Jean Yves Pierga, Laurent Malaquin, Jean Louis Viovy, and Stephanie Descroix

- HIGHLY REGULAR AXON ARRAY IN A MICROFLUIDIC CHIP, Ayako Yamada, Maéva Vignes, Cécile Bureau, Bastien Venzac, Catherine Villard, Stéphanie Descroix, Jean-Louis Viovy, Jean-Michel Peyrin, and Laurent Malaquin (oral)

- AN ISOTHERMAL DNA AMPLIFICATION AND LABEL-FREE DETECTION BASED ON ELECTROHYDRODYNAMIC AGGREGATION IN LAB-ON-CHIP FORMAT. Bastien Venzac, Jérôme Champ, François Amblard, David Herthnek, Stéphanie Descroix, Laurent Malaquin, and Jean-Louis Viovy

- MICROFLUIDIC ROLLING CIRCLE AMPLIFICATION FOR IMPROVED MOLECULAR CANCER DIAGNOSTICS, Iago Pereiro, Ivan Hernandez-Neuta, Qiongdi Zhang, Sanae Tabnaoui, Laurent Malaquin, Jean-Louis Viovy, Monica Brivio, Mats Nilsson, Stéphanie Descroix, and Annika Ahlford

- INTEGRATING HYPER ELASTIC MEMBRANES IN MICROFLUIDIC DEVICES FOR FLUID STORAGE AND AUTONOMOUS DELIVERY, Florian Pineda, Frédéric Bottausci, Laurent Malaquin, and Yves Fouillet

MNE 2015 – The 41th International Conference on Micro and Nano Engineering – Vienna, Sept.2015

- REVERSIBLE MAGNETIC CLAMP OF A MICROFLUIDIC INTERFACE FOR THE SERIC DETECTION OF FOOD ALLERGIES ON ALLERGEN MICROARRAYS, Foncy, J. ; Crestel, E. ; Borges, J.-P. ; Esteve, A. ; Cau, J. C. ; Vieu, C. ; Malaquin, L. ; Trévisiol, E.

- MULTIPLEXED MICROFLUIDIC STAMP INKING FOR AUTOMATED MICRO-CONTACT PRINTING PROCESS , Foncy, J. ; Crestel, E. ; Borges, J.-P. ; Esteve, A. ; Cau, J. C. ; Vieu, C.; Trévisiol, E.; Malaquin, L. (oral)

- STEREOLITHOGRAPHIC TECHNIQUE FOR PRODUCTION OF MICROSTRUCTURES, REPRODUCING ACOUSTIC PROPERTIES OF THE TRABECULAR BONE FOR EARLY OSTEOPOROSIS DIAGNOSTICS. Petra Juskova, Jason Woittequand, Fabien Meziere, Marie Muller, Emmanuel Bossy, Arnaud Derode, Laurent Malaquin

MicroTAS 2014 – The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. Oct. 2014

- CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION IN DROPLETS: TOWARD FAST AND CHEAP ANALYSES, B. Teste, J. Champ, I. Draskovic, A. Londono−Vallejo, S. Descroix, L. Malaquin, J.L. Viovy, and G. Mottet (oral)

- DROPLET MICROFLUIDIC PLATFORM FOR AUTOMATED ASSEMBLY OF MULTIFUNCTIONAL NANOSTRUCTURES, D. Ferraro, Y. Lin, B. Teste, D. Talbot, L. Malaquin, S. Descroix, and A. Abou−Hassan (oral)

- EPHESIA: COMBINING MICROFLUIDICS AND PROXIMITY LIGATION ASSAY TO ANALYZE PROTEIN−PROTEIN INTERACTIONS IN SINGLE CIRCULATING TUMOR CELLS: AN NEW TOOL FOR PHARMACEUTICAL RESEARCH AND PERSONALIZED MEDICINE, E. Tulukcuoglu Guneri, C. Bureau, J. Champ, G. Mottet, K. Perez−Toralla, F.−C. Bidard, J.−Y. Pierga, L. Malaquin, J.−L. Viovy, and S. Descroix

- MICROFLUIDIC MAGNETIC FLUIDIZED BED FOR BACTERIA EXTRACTION, GROWTH AND DETECTION, I. Pereiro, J. Kucerova, L. Alexandre, B. Dupuy, Z. Bilkova, J.−L. Viovy, L. Malaquin, and S. Descroix
-

MNE 2014 − The 40th International Conference on Micro and Nano Engineering – Lausanne, Sept.2014

- USING MICROFLUIDIC DEVICES AS HYPERELASTIC STRAIN SENSORS: EXPERIMENTAL AND THEORETICAL ANALYSIS, Florian Pineda, Frédéric Bottausci, Yves Fouillet, Laurent Malaquin.

MicroTAS 2013 - The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences Oct. 2013

- MAGNETIC FLUIDIZED BED IN MICROFLUIDICS: HYDRODYNAMIC CHARACTERIZATION AND VALIDATION TO IMMUNOCAPTURE, S. Tabnaoui, I. Pereiro, M. Fermigier, S. Descroix, J.L. Viovy, and L. Malaquin 7.

- ULTRA-HIGH PURITY CAPTURE OF CIRCULATING TUMOR CELLS AND GENE MUTATIONS DETECTION, J. Autebert, B. Coudert, J. Champ, F.C. Bidard, J.Y. Pierga, S. Descroix, L. Malaquin, and J.L. Viovy
-

MicroTAS Conference 2012 The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Okinawa Japan)

- A LOW COST AND HIGH THROUGHPUT MAGNETIC BEAD−BASED IMMUNO−AGGLUTINATION ASSAY IN CONFINED DROPLETS B. Teste, A. Ali−Cherif, S. Descroix, J. L. Viovy, and L. Malaquin (oral)

- A LOW−COST, LABEL−FREE DNA DETECTION METHOD BASED ON DIRECT ELECTRONIC READ IN LAB−ON−CHIP FORMAT, WITH APPLICATION TO LONG−RANGE PCR M. L. Diakite, J. Champ, S. Descroix, L. Malaquin, F. Amblard, and J.−L. Viovy (oral)

- FULLY AUTOMATED IMMUNOMAGNETIC LAB−ON−CHIP FOR RARE CANCER CELLS SORTING, ENUMERATION AND IN−SITU ANALYSIS J. Autebert, B. Coudert, F.−C. Bidard, J.−Y. Pierga, S. Descroix, L. Malaquin, and J.−L. Viovy

- INTEGRATED MICROFLUIDIC FLUIDIZED BED FOR SAMPLE PRECONCENTRATION AND IMMUNOEXTRACTION S. Tabnaoui, L. Malaquin, S. Descroix, and J.−L. Viovy

- MULTIPLEXED CELLS MICROPATTERNING USING CAPILLARY ASSEMBLY F.−D. Delapierre, G. Mottet, V. Taniga, and L. Malaquin
-

MicroTAS 2011 - The 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences – Seattle, USA, October 2-6, 2011.

- A PLATFORM COMBINING ACTIVABLE MAGNETIC TWEEZERS AND BIPHASIC FLUIDIC PLUGS FOR ULTRA-LOW VOLUME AND HIGH THROUGHPUT BIOASSAY, Ali Cherif, S. Begolo, S. Descroix, JL. Viovy, L. Malaquin
-

MNE 2011 - The 37th International Conference on Micro and Nano Engineering - Berlin, Germany, September, 19-23, 2011.

- A PLATFORM COMBINING ACTIVABLE MAGNETIC TWEEZERS AND BIPHASIC FLUIDIC PLUGS FOR ULTRA-LOW VOLUME AND HIGH THROUGHPUT BIOASSAY, Ali Cherif and L. Malaquin (oral)

- ULTRA FAST CAPILLARY ASSEMBLY FOR SURFACE PATTERNING OF COLLOIDS AND LIVING OBJECTS François-Damien Delapierre, Laurent Malaquin, Jean-Louis Viovy

ASME2011 - (ICMNMM) The Ninth International Conference on Nanochannels, Microchannels, and Minichannels, 19-22 June 2011, Edmonton (Canada)

- FISH IN CHIPS: MOLECULAR TYPING OF HER2 BIOMARKER FOR RAPID AND LOW COST CANCER DIAGNOSIS, K. Perez-Toralla, G. Mottet, I. Draskovic, L. Malaquin, J-L Viovy (oral)

- . LAB ON A CHIP FOR BACTERIA DETECTION, V. Taniga, G. Mottet, S. Miserere, L. Malaquin, J.L. Viovy, F. Kivlehan, F. Mavre, D. Marchal, B. Limoges, A. Le Nel, J. Goulpeau

MicroTAS 2010 - The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences - Groningen, The Netherlands, October 3-7, 2010 9.

- REAL TIME ELECTROCHEMICAL DNA QUANTIFICATION IN A COC LAB ON A CHIP: TOWARDS LOW COST DIAGNOSIS, V. Taniga, G. Mottet, L. Malaquin, J-L Viovy (oral)

ASME 2010 3rd Joint US-European Fluids Engineering Summer Meeting and 8th International Conference on Nanochannels, Microchannels, and Minichannels Montreal, Canada, 1-5 Août 10.

- PRODUCTION OF FLUOROPOLYMER MICROCHIPS FOR DROPLET MICROFLUIDICS AND DNA AMPLIFICATION. S. Begolo, G. Colas, L. Malaquin, JL. Viovy (oral)

MicroTotal Analysis Systems 2009, Jeju, Korea, Nov 1-5 11.

- HIGH THROUGHPUT/HIGH CONTENT CAPTURE AND TYPING OF RARE CELLS FOR CANCER DIAGNOSIS AND PROGNOSIS, Saias L, Saliba AE, Autebert J, Pierga JY, Vielh P, Farace F, Malaquin L, Viovy JL

Micro Total Analysis Systems 2007, Paris - JL Viovy, P. Tabeling, S Descroix, L. Malaquin, CBMS Eds, 400-402 12.

- HIGHLY PARALLEL FABRICATION OF MICROFLUIDIC CHIPS FOR LONG DNA MOLECULE SEPARATION, Shi J, Fang AP, Malaquin L, Viovy JL, Pépin A, Decanini D, Chen Y.

Micro and Nano Engineering Conference (MNE), Septembre 2005, Vienne (Autriche) 13.

- « High-precision particle alignment through directed assembly », L. MALAQUIN, T. KRAUS, E. DELAMARCHE, H. SCHMID, N.D. SPENCER, H. WOLF. (oral)

Micro and Nano Engineering Conference (MNE), Septembre 2001, Grenoble 8 14. "Using PolydimethylSiloxane as thermo-curable resist for a soft imprint lithography process", L.MALAQUIN, C.VIEU, F.CARCENAC, M.MAUZAC.

Activités d'enseignement

2017	En préparation : Master NanoBio INSA Toulouse (Cours, TD, TPs) En préparation : Master Microfluidique ESPCI/IPGG Paris (Cours, TPs)
2016	Master NanoBio, 20 h de cours magistraux et travaux pratiques (Microfluidique, Impression 3D et BioImpression), Etudiants de Master 2, Génie Physique – INSA Toulouse, France
2016	Cours Magistral « Microfludics for health Sciences » (3h) , Master Biotechnologies, Etudiants Master 1, Faculté de Pharmacie de Toulouse, France
2015	Cours Magistral « High resolution 3D printing an bioprinting » (2h), IPGG – Groupement de Recherche (GdR) Microfluidique, Doctorants, Post Doctorants, Chercheurs, Paris France
2014	Cours Magistral « Microfabrication applied to microfluidic devices » (2h) - IPGG – Formation interne BioRAD, 2014, Ingénieurs et Chercheurs R&D, Université Pierre and Marie Curie, Paris France.
2012	Cours magistral « Microfabrication applied to microfluidic devices » (3h) - Master Systèmes complexes – Parcours Microfluidique – ESPCI, Paris, 2012
2011	Organisation de travaux pratiques « Dispositifs microfluidiques pour la capture de cellules cancéreuses » (2 jours) et d'un cours magistral « Laboratoires sur puces : introduction aux technologies de fabrication » (2h) dans le cadre de l 'école thématique organisée par le Pôle Scientifique Evry – Val de Seine. Janvier 2011
2011	Cours Magistral « Microfluidics and applications» (2h) - MNE 2011 - The 37th International Conference on Micro and Nano Engineering – Toulouse, France, September, 16-20
2009	Cours magistral « Microfabrication applied to microfluidic devices » (3h) Master chimie analytique, physico-chimique et théorique , ESPCI, Paris, 2009
2005	Ecole d'été Européenne organisée dans le cadre du projet européen NaPa : Encadrement de 40 heures de travaux pratiques destinés à des doctorants européens.
2004	Workshop « PDMS materials and Stamps fabrication », organisé dans le cadre du projet européen NaPa,: 16 heures de travaux pratiques et d'enseignements destinés à des doctorants européens.
2001 à 2003	Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse: Encadrement de 100 heures de Travaux Pratiques dédiés aux Microsystèmes pour des élèves ingénieurs de 5ème année.

ACTIVITES D'ENCADREMENT

<u>Post doctorants (Encadrement direct):</u>

2015 - 2017	A. Accardo, LAAS CNRS, France
2015 - 2017	J. Foncy, LAAS CNRS, France
2012 – 2014	P. Juskova, Institut Curie, Paris, France
2011 – 2014	B. Teste, Institut Curie, Paris, France
2010 – 2013	G. Mottet, Institut Curie, Paris, France

<u>Doctorants (Co-encadrement):</u>

2015 – pres.	Justine Creff, co-advisor LAAS-CNRS / CRCT INSERM Toulouse
2015 – pres.	Lucile Alexandre, co-advisor LAAS-CNRS / UMR 168 Inst. Curie Paris

2013 – 2016 B. Venzac. Institut Curie, Paris, France.
2011 – 2015 V. Taniga, Institut Curie, Paris, France.
2011 – 2015 F. Pineda, Institut Curie, Paris, France / CEA LETI France
2010 – 2013 J. Autebert, Institut Curie, Paris, France.
2008 – 2012 F.D. Delapierre, Institut Curie, Paris, France.
2008 – 2011 A. Ali Cherif, Institut Curie, Paris, France
2008 – 2012 S. Tabnaoui, Institut Curie, Paris, France
2008 – 2011 Stefano Begolo, Institut Curie, Paris, France
2007 – 2010 Virginie Audonnet, Institut Curie, Paris, France
2007 - 2009 A.E. Saliba, Institut Curie, Paris, France

Etudiants Master 1&2 (Encadrement Direct):

2017 F. Véron (M2), LAAS CNRS, Toulouse, France
2017 E. Raude (M2), LAAS CNRS, Toulouse, France
2017 G. Saint Martin (M2), LAAS CNRS, Toulouse, France
2016 B. Garlan (M2), LAAS CNRS, Toulouse, France
2015 A. Esteve (M2), LAAS CNRS, Toulouse, France
2015 E. Crestel (M2), LAAS CNRS, Toulouse, France
2014 A. Allitrault (M2), Institut Curie, Paris, France
2014 E. Gontran (M2), Institut Curie, Paris, France
2014 M. Serra (M2), Institut Curie, Paris, France
2013 J. Woittequand (M1), Institut Curie, Paris, France
2013 N. Jamond (M2), Institut Curie, Paris, France
2013 Y. Lin (M2), Institut Curie, Paris, France.
2012 J. Boisselier (M2), Institut Curie, Paris, France
2011 R. Olive (M2), Institut Curie, Paris, France
2007 F.D. Delapierre (M2), Institut Curie, Paris, France.

VI – AUTRES

Participation à la vie du laboratoire

- Membre du conseil de laboratoire du LAAS CNRS (2015 – présent)
- Membre de la commission ITA BIATSS du LAAS CNRS (2015 - présent)
- Membre du conseil de laboratoire de l'UMR 168 – Institut Curie (2011 – 2014)

Organisation de conférences internationales

- Organisateur du workshop « BioFabrication & Cancer » Cancéropôle GSO, 19 juin 2017, Toulouse

- Co-organisateur de la conférence internationale Micro Total Anaysis Systems (MicroTAS), Paris, Porte de la villette, 2007 – J.L. Viovy, P. Tabeling, S. Descroix, L. Malaquin

Programmes de Financement

Programme / Budget	Titre	Coordinateur	Période
FEDER/Occitanie Project MultiFAB - Fablab 1,8 M Euros	MultiFAB Plate Forme de fabrication additive multimatériaux et multi-résolution	L. Malaquin	2017-2020
European Project - H2020 – Pilot Line 5M Euros	HoliFAB *Holistic digital-to-physical prototyping and production pilot for microfluidic MEMS*	A. Le Nel	2017- 2020
Défi Instrumentation aux limites CNRS Mission Interdisc. 22kEuros	CELL3D *Bio Impression 3D haute résolution et multi-matériaux pour la fabrication de modèles cellulaires fonctionnels*	L .Malaquin	2017-2018
Cancéropôle GSO Soutien ERC 20kEuros	VESTA *Bioprinting, Tissue engineering, Cancer, Microenvironment model*	L. Malaquin	2017-2018
ANR Neuraxe 415kEuros	NEURAXE *Oriented supramolecular gels as a guide for neural stem cells*	J. Fittreman	
Cancéropôle GSO Emergence 20kEuros	3DCELL *Microenvironnements cellulaires tridimensionnels pour l'analyse des processus tumoraux*	L. Malaquin	2015-2016
ANR Nano Biotech Total 7300 k€	DIGIDIAG *Diagnostic Digital*	A. Griffiths	2012-2017
EU FP7 NMP Large 1230 k€	NADINE *Nanodevices for the Diagnosis of Neurodegenerative diseases*	J Kutter	01/09/2010-30/08/2015
EU FP7 Health 966 k€	DIATOOLS *Molecular tools for cancer diagnosis*	U. Landegren	01/11/2010-30/10/2014
ANR Blanc SVSE 5 Total 500 k€	ImmunoMeca *Caractérisation du rôle de la mécanique dans l'immunité: vers un modèle intégré de l'activation des cellules T*	A. ASNACIOS	2012-2015
FP7-ICT-2011.3.2 500 k€	LOVEFOOD *Love Wave Fully Integrated Lab-on-chip Platform for Food Pathogen Detection*	E. Giselli	2012-2015
FP7-NMP-2013-SMALL-7 453 k€	NAPES *Next Generation Analytical Plateforms for Environmental Sensing.*	E. Giselli	2013-2017
ERA-NET NEURON JTC2012	MicroDeg *Neuronal Networks in microfluidic chips for the study of propagative neuronal disorders*	J.M. Peyrin	2013-2016

NMP FP7	CAMINEMS *Integrated MicroNano-Opto Fluidic systems for high-content-diagnosis and studies of rare cancer cells.*	J.L. Viovy	2009-2012
ANR	MICAD *Système microfluidique de tri et typage de cellules cancéreuses pour le diagnostic moléculaire, le pronostic du risque métastatique, et la médecine personnalisée du cancer.*	Fluigent	2008-2011
ANR P3N Total 200 k€	AUBAINE *Analyse Ultra-sensible Bas-coût par Assemblage Intégré de micro-Nano objEts*	JP Peyrade	01/01/10-31/12/13

ANNEXE I : Travaux de Doctorat

« Dispositifs ultra-sensibles pour le Nano-Adressage électrique. Application à la détection de Biomolécules »
LAAS CNRS (2000-2004)

Publications CV n°46 à 54

Brevet n°14

Les travaux de recherche que j'ai pu mener durant ma thèse dans le groupe NanoAdressage NanoBiotechnologie du LAAS CNRS ont été dédiés au **développement de nanosystèmes pour l'adressage électrique de biomolécules et de nanoparticules** ainsi qu'à l'étude des phénomènes de transport électrique liés. Une des applications visées était la détection de biomolécules et plus particulièrement d'anticorps (détection immunologique). Ce projet de recherche multidisciplinaire a été mené en étroite collaboration avec la « *Plate-forme Transcriptome-Biopuces* » du Génopôle Toulouse Midi-Pyrénées qui réunit les compétences de plusieurs laboratoires toulousains dans les domaines de la chimie, de la biologie, des micro- et nanotechnologies.

Partant de l'idée d'utiliser les propriétés électriques de biomolécules et de nanoparticules pour leur détection, la première partie de mes recherches a été consacrée à la mise au point de procédés technologiques pour la **fabrication de dispositifs de type nanoélectrodes** dont les dimensions caractéristiques permettent une connexion à l'échelle d'une molécule ou d'une nanoparticule unique :

L'utilisation de la lithographie électronique haute résolution m'a permis de développer la fabrication d'électrodes planaires métalliques présentant des **espaces inter-électrodes inférieurs à *10 nm*** sur substrat silicium. Les structures visées étaient de type réseaux denses d'électrodes inter-digitées et nano-jonctions simples. Ces premiers travaux m'ont valu le deuxième prix du concours IMAPS (2001).

Un deuxième procédé de fabrication abordé était la Nano-Impression. Cette technique de lithographie est basée sur la **réplication de nanostructures par moulage de polymère**. Mon étude a été orientée vers la recherche de polymères de faible viscosité et à l'optimisation de l'écoulement de polymère dans des nanostructures. Ces expériences furent à l'origine de la rédaction d'un chapitre de livre dédié à la Nano-Impression (*Alternative Lithography,* C.M.Torres - 2003) et de l'organisation d'un Séminaire Matériaux Organiques pour les Micro et Nano technologies (2003). Ce dernier a réuni l'ensemble des acteurs Toulou-

sains dans le domaine des polymères (Laboratoire de Chimie de Toulouse, Laboratoire de Chimie de Coordination, LAAS, INSAT).

La deuxième partie de mes travaux a été dédiée à la caractérisation électrique des structures fabriquées et à leur utilisation pour la **détection électrique de nanoparticules et de biomolécules**. J'ai recherché des stratégies permettant de passer outre le caractère isolant de la plupart des biomolécules qui empêche toute détection directe. Pour cela, j'ai développé un procédé utilisant les propriétés conductrices de nanoparticules métalliques greffées aux molécules d'intérêts.

Dans un premier volet, à caractère fondamental, j'ai étudié la **réponse électrique des dispositifs lors du greffage de nanoparticules d'or (***diamètre 60 – 100nm*) sur leur surface active (Cf Figure A1). Ces travaux m'ont permis de valider la pertinence de cette approche et ont démontré la très haute sensibilité de la détection (détection sensible à 1 nanoparticule).

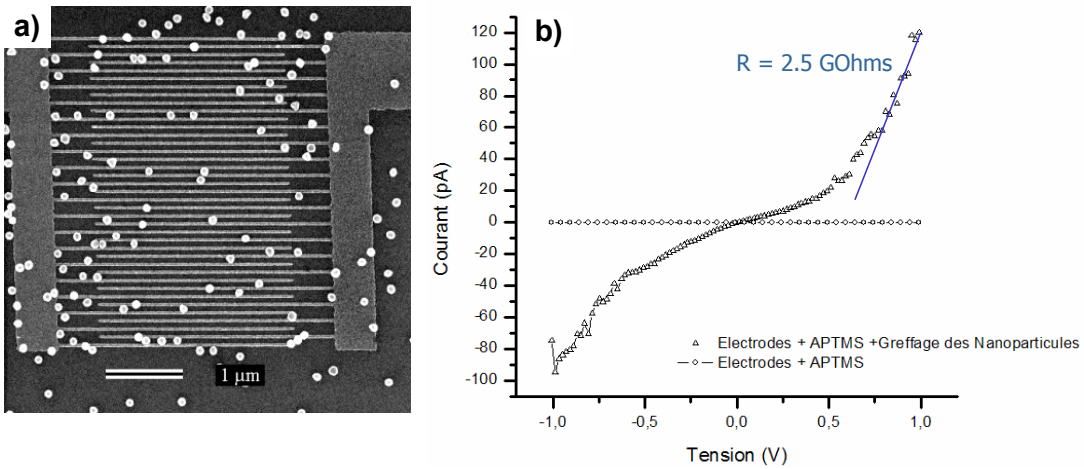


Figure A1. Image en microscopie électronique de nanoparticules d'or de 100 nm immobilisées par interaction electrostatiques sur la surface d'un réseau planaire de nanoélectrodes interdigitées (a). Caractéristique I(V) des dispositifs après greffage des nanoparticules et séchage sous azote (b).

Le deuxième volet de ces travaux de recherche a été consacré au développement de stratégies de greffage et de fonctionnalisation permettant d'utiliser ces nano-dispositifs pour la **détection d'interactions entre protéines** (anticorps). *L*a stratégie de détection est basée sur une interaction entre des anticorps « sondes » immobilisés sur la surface du capteur et des anticorps « cibles » greffés à la surface de nanoparticules d'or de *80 nm* de diamètre. Ces nano-dispositifs présentent des niveaux de sensibilité très élevés (quelques biomolécules), ils sont compatibles avec une analyse quantitative et sont utilisables pour des mesures dynamiques en solution.

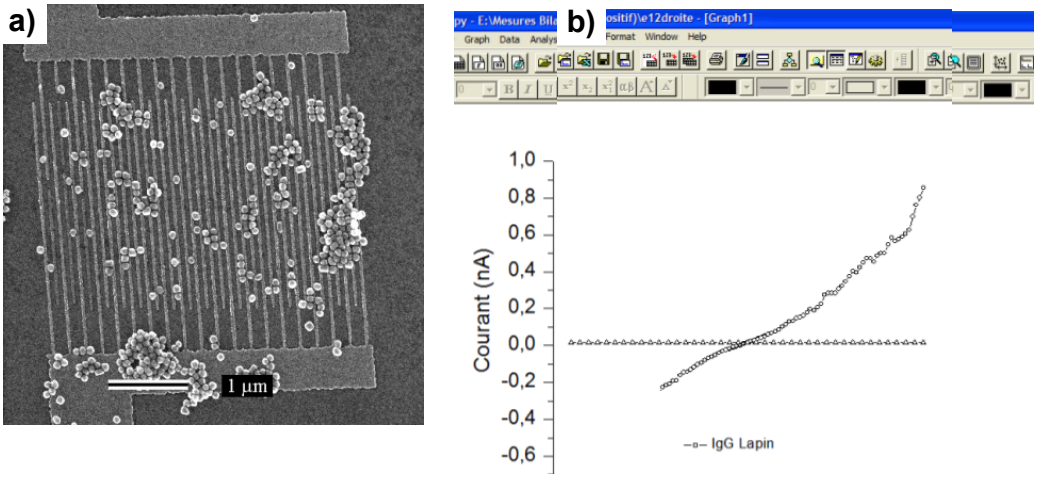


Figure A2. Image en microscopie électronique de nanoparticules d'or de 80 nm fonctionnalisées (biotine) permettant de révéler la formation d'un complexe antigène-anticorps sur un réseau de nanoélectrodes interdigitées (a). Caractéristiques I(V) des dispositifs avant et après greffage des particules (b).

L'ensemble de mes études doctorales m'a conduit à travailler en salle blanche où j'ai acquis une solide expérience concernant les différentes étapes technologiques de la **micro et nano structuration de matériaux.** Cela m'a également permis d'acquérir des compétences dans des domaines tels que : la **physique des polymères**, les **phénomènes de transports électriques** dans des systèmes de basse dimension, les **traitements chimiques de surface** et la **biologie moléculaire** (hybridation et dénaturation de l'ADN, immunodétection).

Par ailleurs, toujours dans le cadre de ces travaux, j'ai été amené à travailler en étroite collaboration avec le Laboratoire de Chimie de coordination de Toulouse pour la mise au point de méthodes de traitement localisé de surface (brevet co-signé sur la structuration de matériaux à transition de spin), l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale de Toulouse pour la mise au point des étapes de greffage d'anticorps sur des surfaces. Une collaboration interne au LAAS-CNRS avec le groupe Technologie des Micro et Nanostructures m'a permis de valoriser mes compétences dans les domaines de la réplication de structures par moulage de polymère et des traitements de surfaces pour développer des dispositifs de microfluidique intégrés dans des détecteurs chimiques ISFETs.

ANNEXE II : Travaux de Post-Doctorat

« *Assemblage dirigé de nanoparticules et applications* »

IBM Research Laboratory – Zurich (2004 –2006)

Publications CV n°37, 41 à 45

Brevet n°12

Projet Européen NaPa, PCRD 6

Le post-doctorat que j'ai effectué au sein du **Laboratoire d'IBM à Zürich** (Suisse) sous la responsabilité de Heiko WOLF s'est inscrit dans le cadre du projet Européen intégré NaPa (NanoPatterning) du 6^{éme} PCRD. Plus particulièrement, mon contrat était rattaché au sous projet SLASA dédié à l'étude des phénomènes d'Auto-assemblage et au développement de techniques de lithographies douces (Soft Lithographies). A ce titre, une partie importante de mes activités a été également consacrée à **l'administration et à la coordination technique du projet NaPa**.

L'objectif général de mes activités de recherche était de proposer des solutions au verrou technologique de **l'organisation et de l'intégration de nanoparticules** dans des dispositifs fonctionnels. Des progrès significatifs ont été effectués pour la synthèse de nanoparticules et le contrôle de leur taille, de leur composition et de leurs propriétés. Toutefois, la mise à profit de ces propriétés repose sur la possibilité de contrôler précisément la position et l'organisation des nanoparticules dans un dispositif. Citons deux exemples d'applications, tels que la fabrication de cristaux photoniques qui requiert un assemblage en réseau ordonné exempt de défaut ou encore l'emploi de nanoparticules d'or pour la résonance plasmon de surface qui nécessite une localisation précise de chaque nanoparticule.

Les méthodes d'assemblage alors proposées nécessitaient une structuration (chimique, 3D) de la surface, étape qui, dans de nombreux cas, engendre une altération des caractéristiques de ces mêmes dispositifs. La stratégie que j'ai développée consistait à séparer l'étape d'assemblage de l'étape d'intégration et permettait le transfert de nanoparticules sur des surfaces non structurées :

Auto-assemblage de nanoparticules:

L'approche que j'ai développée est basée sur l'utilisation des **forces capillaires** ainsi que des phénomènes de **mouillage** pour contrôler le confinement de nanoparticules sur des surfaces polymères structurées. J'ai

pu démontrer que l'utilisation des forces capillaires et des flux convectifs en solution permettent de manipuler individuellement des nanoparticules et également de contrôler leur organisation en réseaux réguliers. L'assemblage est réalisé par **évaporation au niveau de la ligne triple** d'une goutte déposée sur une surface structurée à l'échelle nanométrique. L'effet conjugué des forces capillaires et du confinement géométrique permet de programmer la position et l'organisation des nanoparticules. (Cf Figure A3)

Une partie importante de ce travail a été consacrée à l'étude des **forces capillaires entre nanoparticules et structures, des flux de solvant au niveau de la ligne triple** induits par l'évaporation de la goutte, ainsi que de la **dynamique de mouillage en présence de surfactants**. Pour cela, j'ai développé un une plate forme expérimentale permettant d'accéder aux paramètres principaux (température, angle de contact, vitesse de déplacement de la ligne triple) et d'observer en temps réel le mouvement des nanoparticules dans la suspension.

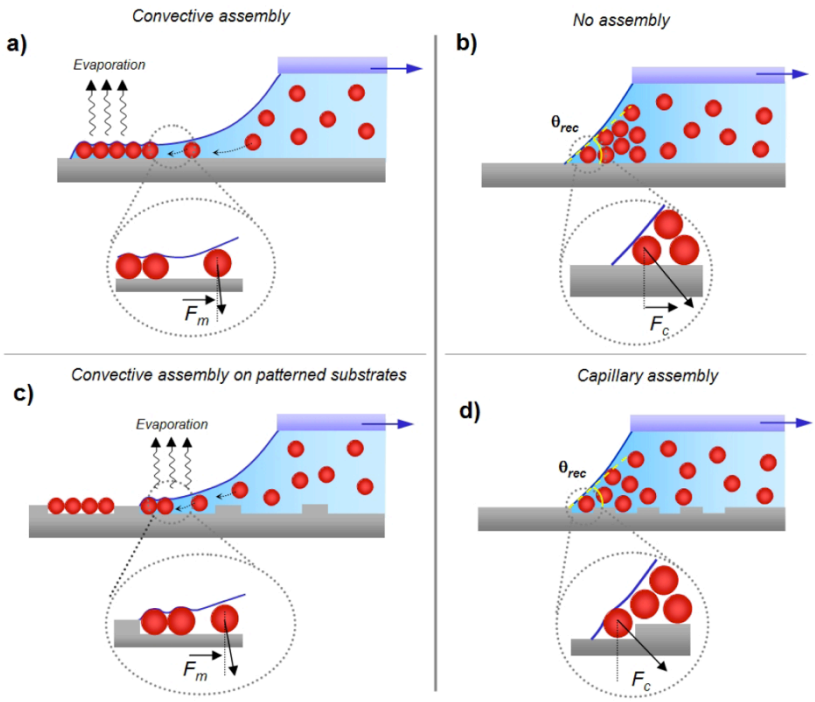


Figure A3 . Mécanismes d'assemblage obtenus par déplacement de la ligne triple d'une suspension colloïdale sur des surfaces planes ou structurées. Pour des angles de contact de faible (<10°) un mécanisme d'assemblage convectif permet l'organisation de structures continues à 2 ou 2,5D, alors que pour des angles compris antre 10° et 60°, le mécanisme d'assemblage capillaire permet le dépôt de particules individuelles et la génération de structures complexes.

Intégration de nanoparticules par impression :

Les techniques d'assemblage développées sont compatibles avec une large variété de substrats. Dans mon approche l'assemblage était effectué sur des substrats élastomères structurés obtenus par moulage de Poly-(DiMethylSiloxane) à partir d'un moule gravé en silicium. En mettant à profit les propriétés de conformation de ce matériaux et en optimisant ses propriétés de surfaces, il est possible de transférer par simple contact les nanoparticules assemblées sur une surface non structurée. J'ai pu démontrer le transfert de

nanoparticules de polystyrène de dimensions comprises entre *200 et 500 nm* sur des surfaces de silicium et de verre. Dans le cas de ces particules, le transfert était effectué en chauffant le substrat à une température supèrieure au point de transition vitreuse du polystyrène.

Une partie importante de ce travail a été dédiée à l'étude expérimentale et théorique des **forces d'adhésions** permettant ce transfert. Plusieurs études ont également été menées quant à l'influence de traitements chimiques de surfaces (greffage de silane, oxydation par plasma oxygène, traitement UV-Ozone) sur les propriétés d'adhésion des matériaux utilisés.

La figure A4 présente quelques exemples de nanoparticules de polystyrène assemblées par assemblage capillaire (Fig. A4a)) et assemblage convectif (Fig. A4b) puis transférées sur une surface de silicium en utilisant la méthode décrite précédemment.

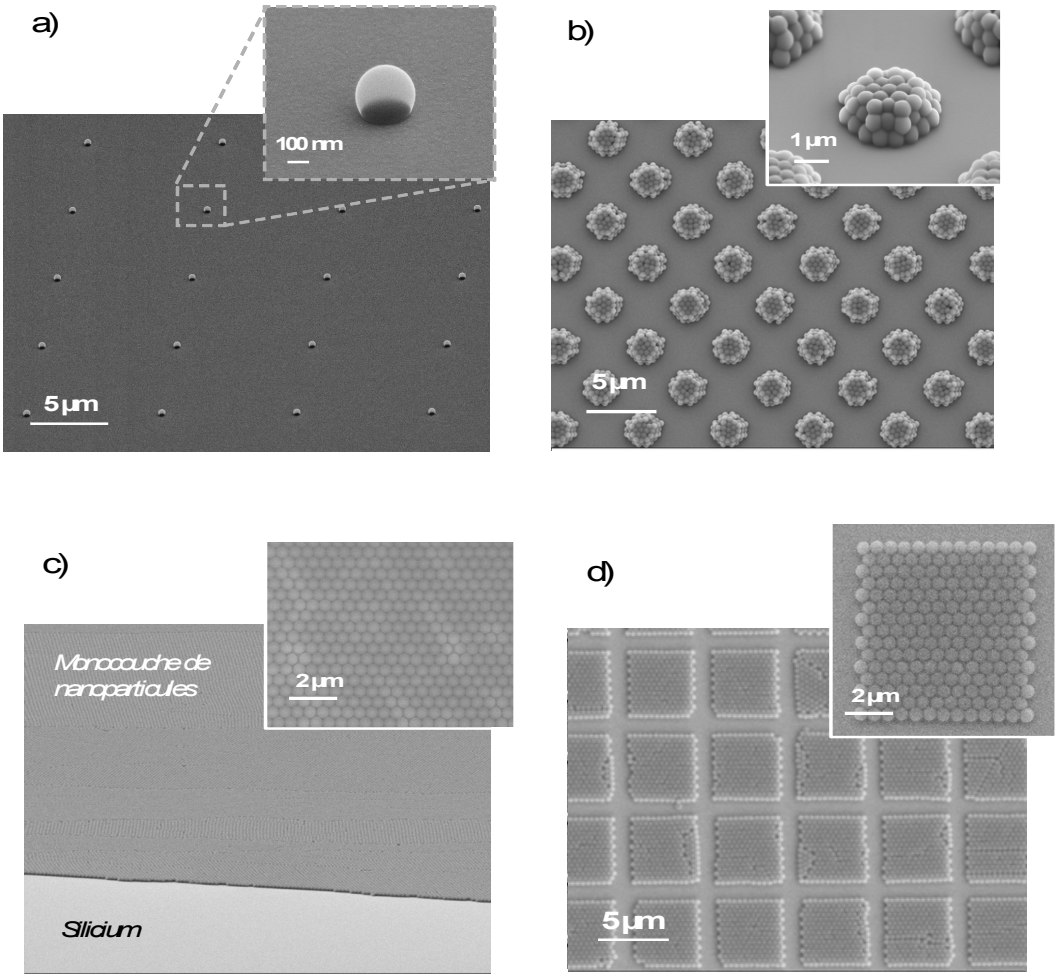


Figure A4. Images en microscopie électronique de nanoparticules de polystyrène de 500nm de diamètre assemblées sur un timbre PDMS par assemblage capillaire (a,b) et assemblage convectif (c,d) et transférées sur une surface de silicium (T = 120°C).

La figure A5 montre quant à elle la flexibilité cette méthode qui permet le transfert de structures à trois dimensions sur des surfaces courbes telles que celles de microparticules.

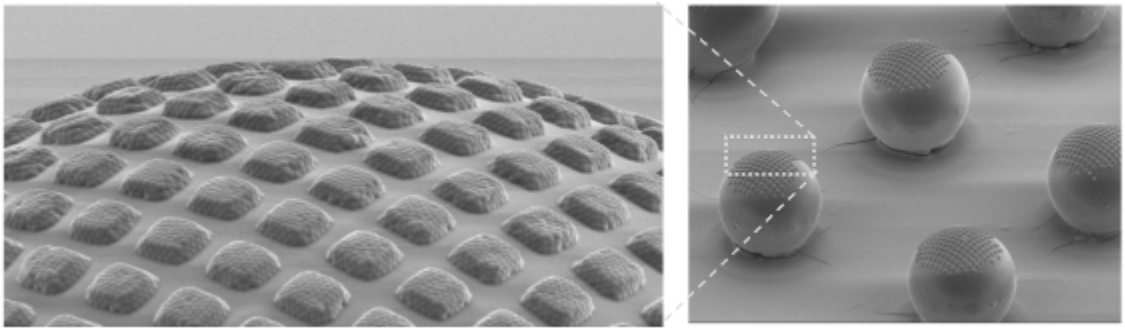


Figure A5. Images MEB de particules de polystyrène assemblées sur un timbre PDMS puis transférées par contact sur des billes de verre de 100 µm de diamètre. Le procédé de transfert préserve l'organisation d'origine des particules.

Ce projet a reçu le soutien de plusieurs laboratoires Européens impliqués dans le cadre du projet NaPa. Il s'agit de l'IPCF (Italie) en ce qui concerne la synthèse et la fonctionnalisation de Nanoparticules, du SMCT (Pays-Bas) pour le greffage de nanoparticules, de AMO Gmbh (Allemagne) pour la fabrication de moules, du Tyndall Institute (Irlande) en ce qui concerne la simulation du comportement et des interactions de Nanoparticules en solution et enfin du LAAS-CNRS (Toulouse) en ce qui concerne l'utilisation de ces techniques pour des applications de biodétection. Plusieurs laboratoires Européens (LAAS, INSA (Toulouse), SMCT) ont développé des systèmes d'assemblage basés sur le modèle développé à IBM. Mes derniers travaux à IBM ont été dédiés au développement d'un système d'assemblage de deuxième génération pour lequel un brevet a été déposé.

Une partie de mon projet de recherche a également été menée au sein d'une collaboration interne au laboratoire d'IBM avec l'équipe « Post CMOS ». Mes travaux ont concerné l'auto-assemblage de nanoparticules métalliques pour à la croissance de nanofils conducteurs de silicium et l'assemblage de ces derniers pour le développement de dispositifs électriques fonctionnels de dimension ultimes. A l'issue de mon post doctorat, j'ai pu démontrer l'assemblage de nanoparticules d'Or (50nm) individuelles ainsi que leur transfert par impression sur des surfaces de silicium. Cette approche qui continue d'être développée au sein du laboratoire constitue une alternative très avantageuse à des techniques de nanofabrication plus lourdes telles que la lithographie électronique (Cf. Figure A6).

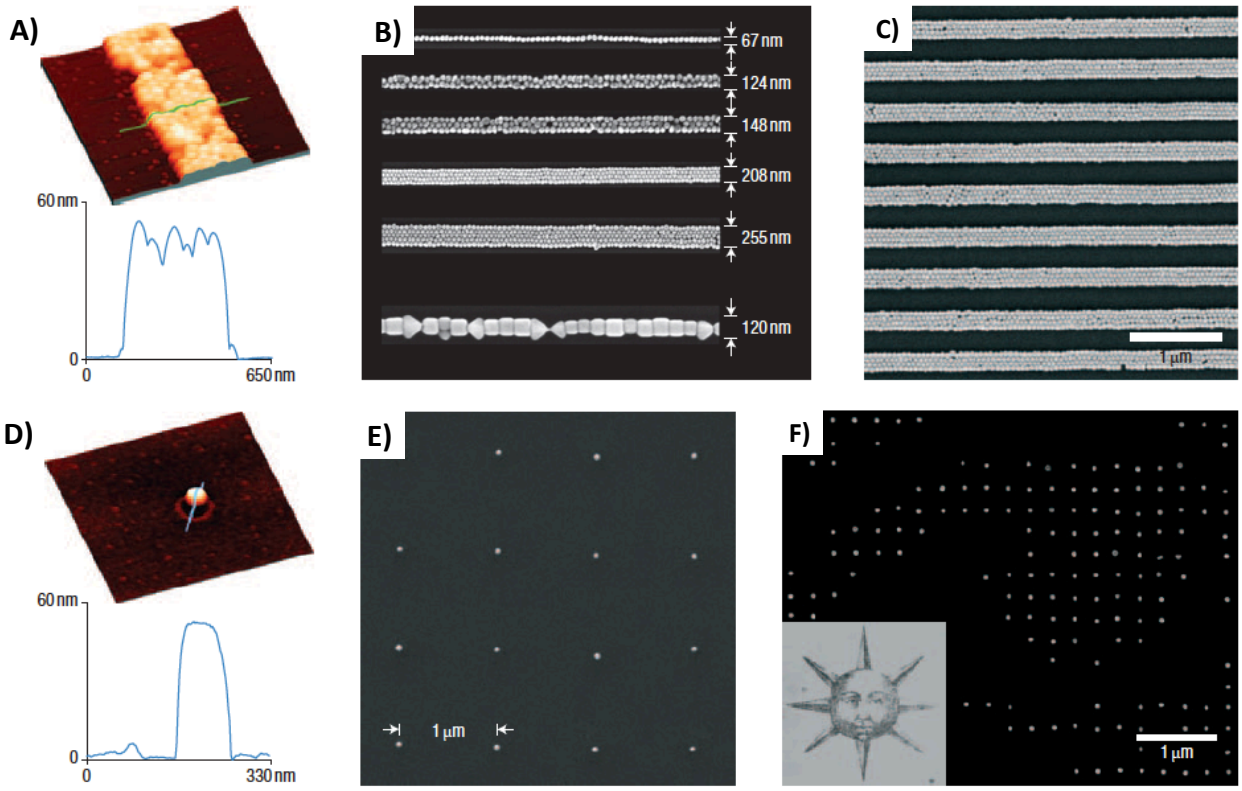


Figure A5. Images AFM (A,D) et MEB (B, C, E, F) de nanoparticules d'Or de 50 nm et 100 nm (B uniquement) sur un timbre PDMS puis transférées par contact sur une surface de silicium native. Le procédé de transfert préserve l'organisation d'origine des particules.

Dans le cadre de ce projet, j'ai également acquis des nouvelles compétences dans le domaine de la **fonctionnalisation de surfaces** (Poly(Dimethylsiloxane) PDMS, Si, SiO_2), de la **synthèse de matériaux à base de PDMS** pour la fabrication de timbres et enfin dans le domaine de la **microfluidique**.

« *Intégration de nanoparticules pour l'optique et la microfluidique»*

LPN CNRS – Marcoussis (2007- 2008)

Publications n°38 à 40

Projet Européen NaPa, PCRD 6

Le projet de recherche que je développe au sein du groupe Nanoflu (Nanotechnologie et Dispositifs Microfluidiques) du **Laboratoire de Photonique et de Nanostructures** (LPN-CNRS) vise à développer de nouvelles méthodes de nanostructuration parallèles et à bas coût pour le développement de dispositifs de séparation ou de détection de biomolécules intégrés dans des systèmes microfluidiques de type laboratoire sur puce. Une large partie de ces travaux s'inscrit dans le cadre du projet Européen intégré NaPa (NanoPatterning) du 6^{éme} PCRD.

Nanoimpression assistée par UV (Soft UV assisted Nano Imprint Lithography)

Le développement de techniques de nanostructurations alternatives aux techniques conventionnelles de lithographie à haute résolution (lithographie électronique ou extrême UV) combinant bas coûts et hauts rendements constitue un des verrous technologiques majeurs dans le développement des nanosciences. Le procédé de nanoimpression proposée par S.Chou en 1995 semble être un candidat très prometteur dans ce contexte. Cette technique repose sur la réplication de structures présentes à la surface d'un moule structuré dans une couche de polymère déposée sur un substrat (Cf. Travaux de thèse). Cette technique souffre cependant de contraintes principalement liées à la viscosité des matériaux utilisés (généralement des thermoplastiques) qui limitent les phénomènes d'écoulement et affectent la résolution et l'homogénéité de la réplication. Dans ce contexte, mes travaux de recherche visent à developper une technique dite de nanoimpression assistée par UV qui consiste à répliquer un matériau photoréticulable de faible viscosité par l'intermédiaire d'un moule transparent lui-même obtenu par moulage de PDMS (Poly(DiMethylSiloxane)). Dans ce projet, je mets à profit mon expérience dans le domaine de la reformulation et du traitement de surface du PDMS acquise au laboratoire d'IBM pour optimiser les propriétés mécaniques et chimiques des moules et améliorer leur capacités de moulage de nanostructures. J'ai pu montrer qu'une reformulation appropriée du PDMS basée sur des chaînes de faibles poids moléculaires ramifiées permet d'atteindre des résolution de l'ordre de 50 nm qui restent inaccessibles en utilisant les formulations commerciales du PDMS (ex : Sylgard 184 – Dow Corning).

Ces travaux sont appliqués à la réalisation de dispositifs microfluidiques intégrant des structures telles que des réseaux de nanopilliers. Ces structures seront utilisées comme « gels artificiels » pour l'électrophorèse et seront utilisées pour la séparation de molécules d'ADN dans une collaboration avec le groupe MMBM de l'Institut Curie. L'objectif est de démontrer que l'on peut utiliser les phénomènes de séparation entropiques combinés à des champs électriques pulsés pour améliorer le pouvoir de séparation de molécules d'ADN de grandes longueurs (> 160 kb soit environ 50µm).

Assemblage dirigé de nanoparticules

L'objectif de ces travaux consiste à utiliser la méthode d'assemblage capillaire que j'ai développé dans le cadre du projet Européen NaPa pour fabriquer des structures cristallines denses à trois dimensions qui seront utilisées comme matériaux nanoporeux dans des canaux microfluidiques. L'objectif est de démontrer que ces structures peuvent améliorer la séparation d'ADN dans des expériences d'électrophorèse ou pour préconcentrer des protéines en combinaison avec des flux électrosmotiques.

Cette approche présente plusieurs avantages : (i) les propriétés de perméabilité de tels assemblages dépendent essentiellement du diamètre des particules utilisées ainsi que de leur fonctionnalité de surface et pourraient être ajustées (ii) de part la haute régularité et cristallinité des réseaux, ces structures permettent d'accéder à des tailles de pores de l'ordre de la dizaine de nanomètres qui présentent une très faible dispersité en taille (iii) la méthode de fabrication par auto assemblage permet une fabrication simple, à bas coût et une intégration directe des dispositifs dans les canaux microfluidiques de tailles comprises entre quelques centaines de nanomètres et quelques dizaines de micromètres.

Durant ce projet, j'ai pu démontrer l'assemblage de particules de polystyrène et de verre de dimensions comprises entre 2 µm et 200nm en réseaux cristallins à trois dimensions dans des canaux microfluidiques de PDMS. Des premiers tests de migration de fluorescéine par flux électrosmotique m'ont permis, d'une part, de valider le procédé de fabrication et d'intégration des structures et d'autre part, d'évaluer la perméabilité de ces structures. La figure 4 présente une image en microscopie optique de réseaux de billes de polystyrène de 500 nm assemblées dans un canal microfluidique PDMS (Figure A6)

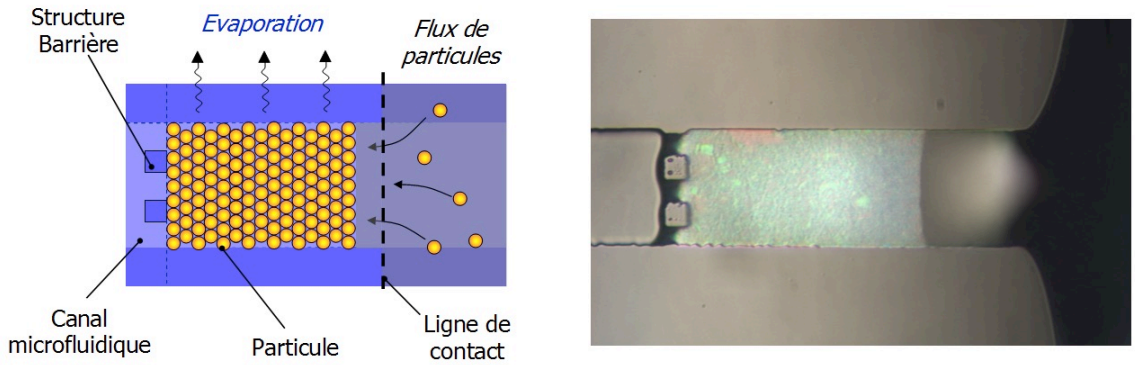


Figure A6. Images en microscopie optique d'un micro-canal PDMS dans lequel des particules de polystyrène (500 nm) ont été assemblées. La pression capillaire permet un remplissage sélectif des canaux jusqu'aux structures barrières. Les phénomènes d'évaporation induisent un flux convectif de nanoparticules qui permet leur assemblage en structures cristallines tridimensionnelles.

En parallèle de ce projet, dans le cadre du stage de Kévin Lhoste que j'ai encadré pendant 6 mois, j'ai poursuivi les développements dans le domaine de l'assemblage et de l'intégration de nanoparticules d'or que j'avais initié à IBM. Mon ambition était d'exploiter les propriétés de résonance plasmon de particules <100 nm pour crée des dispositifs de détection intégrés dans des canaux microfluidiques. Pour cela, j'ai pu démontrer l'assemblage puis le tranfer par micro contact printing d'assemblages réguliers, à haute densité de nanoparticules de tailles comprises entre 50 et 100 nm (Cf Figure A7).

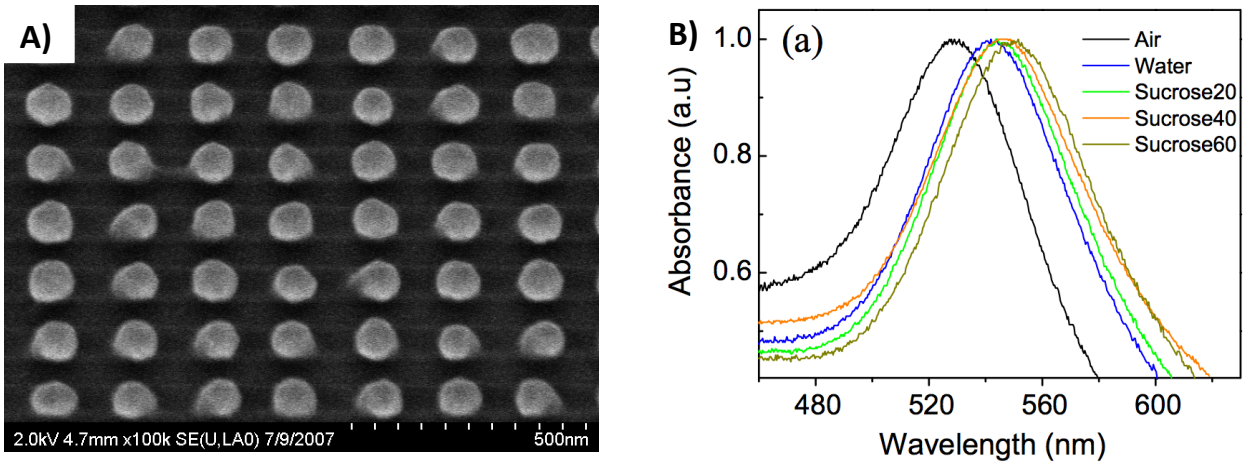


Figure A7. Images en microscopie optique d'un micro-canal PDMS dans lequel des particules de polystyrène (500 nm) ont été assemblées. La pression capillaire permet un remplissage sélectif des canaux jusqu'aux

Les réseaux de nanoparticules on été transférés sur de lames de verre par collage sur un couche de PMMA et intégrés dans des canaux microfluidiques PDMS. Des mesures optique en trasmission on montré un spectre d'absorption montrant clairement un phénomène de résonance plasmon. La longueur d'onde d'absorption maximale est sensible à l'environnement et ces variations ont pu être reliées par exemple à la concentration d'espèces en solution (ex : sucrose). Ces variations sont directement liées au changement d'indice optique du milieu environnant les particules. Ces résultats ont été obtenus en collaboration avec le Groupe GOSS : Groupe d'Optique des nanoStructures Semiconductrices).

Dans un cadre plus général, les méthodes d'auto-assemblages ont été mises a profit pour la nanostructuration de surface. Ces particules peuvent être utilisées comme masque de gravure chimique ou de gravure ionique réactive pour générer des structures nanométriques. Cette a été utilisée au même titre que la nanoimpression ou le micro contact printing comme technique alternative de nanofabrication au sein de la centrale technologique du LPN-CNRS.

L'ensemble de ce projet a reçu le soutien de plusieurs laboratoires Européens impliqués dans le cadre du projet Européen NaPa du 6ème PCRD. Il s'agit de l'IPCF (Italie) en ce qui concerne la synthèse et la fonctionnalisation de Nanoparticules, du SMCT (Pays-Bas) pour le greffage de nanoparticules, du LAAS-CNRS en ce qui concerne l'utilisation des techniques d'assemblage pour la biodétection, du Tyndall Institut (Irlande) en ce qui concerne la structuration de substrats par NanoImpression de polymères et la réalisation de structures de type cristaux photonique.

ANNEXE III :

Sélection de 5 publications

(1) Pereiro, I.; Tabnaoui, S.; Fermigier, M.; du Roure, O.; Descroix, S.; Viovy, J.-L.; Malaquin, L. Magnetic Fluidized Bed for Solid Phase Extraction in Microfluidic Systems. *Lab Chip* **2017**, *17*, 1603–1615.

(2) Ferraro, D.; Champ, J.; Teste, B.; Serra, M.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L.; de Cremoux, P.; Descroix, S. Microfluidic Platform Combining Droplets and Magnetic Tweezers: Application to HER2 Expression in Cancer Diagnosis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25540.

(3) Yamada, A.; Vignes, M.; Bureau, C.; Mamane, A.; Venzac, B.; Descroix, S.; Viovy, J.-L.; Villard, C.; Peyrin, J.-M.; Malaquin, L. In-Mold Patterning and Actionable Axo-Somatic Compartmentalization for on-Chip Neuron Culture. *Lab Chip* **2016**, *16*, 2059–2068.

(4) Ali-Cherif, A.; Begolo, S.; Descroix, S.; Viovy, J.-L.; Malaquin, L. Programmable Magnetic Tweezers and Droplet Microfluidic Device for High-Throughput Nanoliter Multi-Step Assays. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 10765–10769.

(5) Saliba, A.-E.; Saias, L.; Psychari, E.; Minc, N.; Simon, D.; Bidard, F.-C.; Mathiot, C.; Pierga, J.-Y.; Fraisier, V.; Salamero, J.; et al. Microfluidic Sorting and Multimodal Typing of Cancer Cells in Self-Assembled Magnetic Arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 14524–14529.