

Ecole d'été de Physique Lyon Août 2002

Les « laboratoires sur puces »

Jean-Louis Viovy
Laboratoire Physico-Chimie Curie (UMR CNRS 168)
Institut Curie Section de Recherche

Jean-Louis Viovy, Institut
Curie e2phy (Villeurbanne
26-29 Aout 2002)

Nouveaux enjeux pour la biologie

- Génomique, protéomique

Exploitation de l'information du génome

- On connaît (à peu près) tous les gènes
- mais on ne connaît la fonction que d'un petit nombre d'entre eux!
- Leurs interactions encore moins...
- **Nouvelle approche** globale, systémique de la biologie
- **Changement d'échelle** considérable dans les besoins d'analyse
- 1 individu:
 - $\sim 2 \cdot 10^9$ paires de bases
 - $\sim 30\,000$ gènes
 - $\sim 10^5$ protéines

– **Criblage de populations**

Jean-Louis Viovy, Institut
Curie-e2phy (Villeurbanne
26-29 Aout 2002)

Enjeux pour la Médecine

- Pharmacogénomique: accélération de la **recherche de médicaments** sur la base des données de la génomique
 - Maladie / gène; recherche **directement molécules agissant sur le gène**
- Substitution des études sur cellules aux études sur animaux et cliniques
- Diagnostic
 - Identification des organismes pathogènes (allergie, bactéries, virus)
 - Diagnostic moléculaire (maladies génétiques, typologie des cancers)

Exemple: Prédisposition au cancer du sein: 1 patiente, 15 kb à séquencer,
Techno actuelle: 3-6 mois, 20 kF.

Demandes

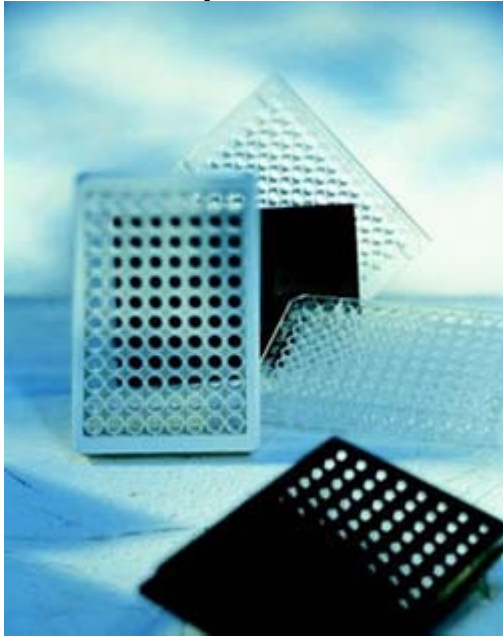
- Volume de données à produire
+++
 - Volume d'échantillons - -
 - Sans explosion de temps, coût...
-
- Parallélisme, automatisation

• Actuellement:

Plaque(s) de microtitration

Appareils « monotâche »

Robots mécaniques

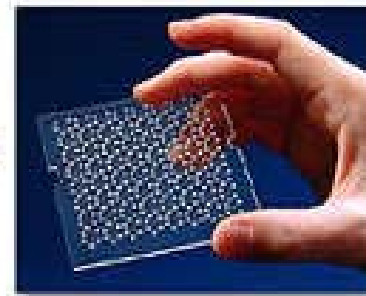
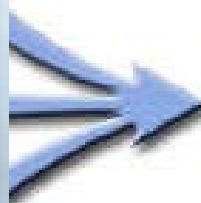


Futur:

Laboratoires sur
puces:

Miniaturisation

Intégration



One step using LabCard™
microfluidic array

Intégration: Analogie avec le développement de la microélectronique

- **Circuit intégré**
 - Electrons
 - Photons

 - Diode
 - Transistor
 - Ampli
 - Conversion,
 - Etc...
- **Microlaboratoire:**
 - Fluides
 - Particules
 - Molécules
 - Cellules

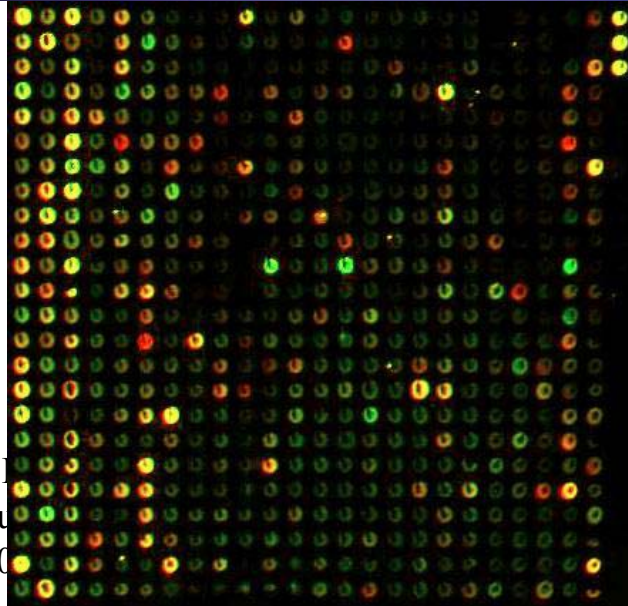
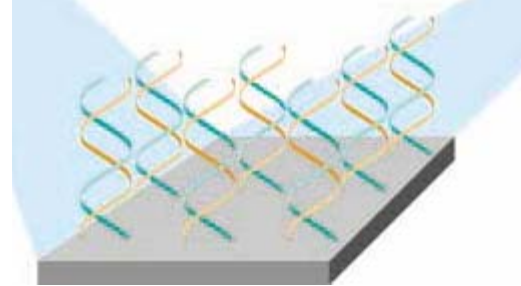
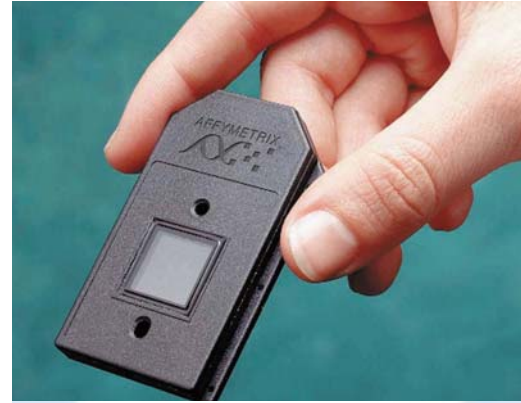
 - Cultiver
 - Séparer
 - Analyser
 - Détecter
 - Transporter
 - Mettre en interaction
 - Réactions chimiques...

Quelques exemples ...

Jean-Louis Viovy, Institut
Curie e2phy (Villeurbanne
26-29 Aout 2002)

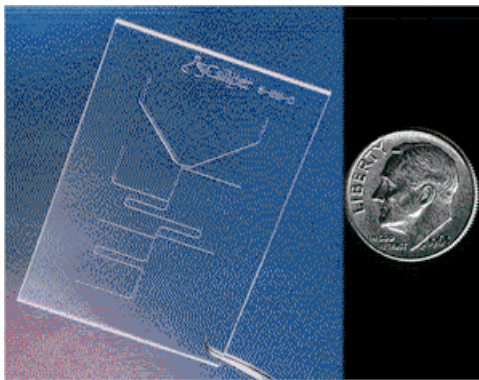
« Puces à ADN »

- Surface
 - Qq cm²
 - 10²-10⁵ plots de 0.01 mm²
 - ADN marqueurs de gènes(sondes)
- Solution
 - ADN inconnus
 - « Vert » sujet normal
 - « Rouge » patient malade
- Incubation
 - Hybridation/ plots correspondants
- Détection fluo
 - Vert: sous-exprimé
 - Rouge: surexprimé
 - Jaune: gène non impliqué



« Laboratoires sur puces »: Canaux, transport de fluides

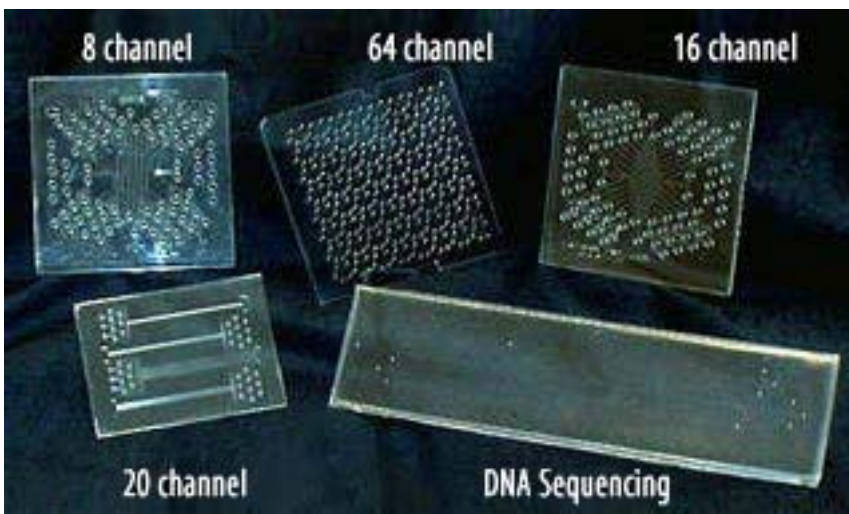
« Lab on chip » (Agilent, Caliper)



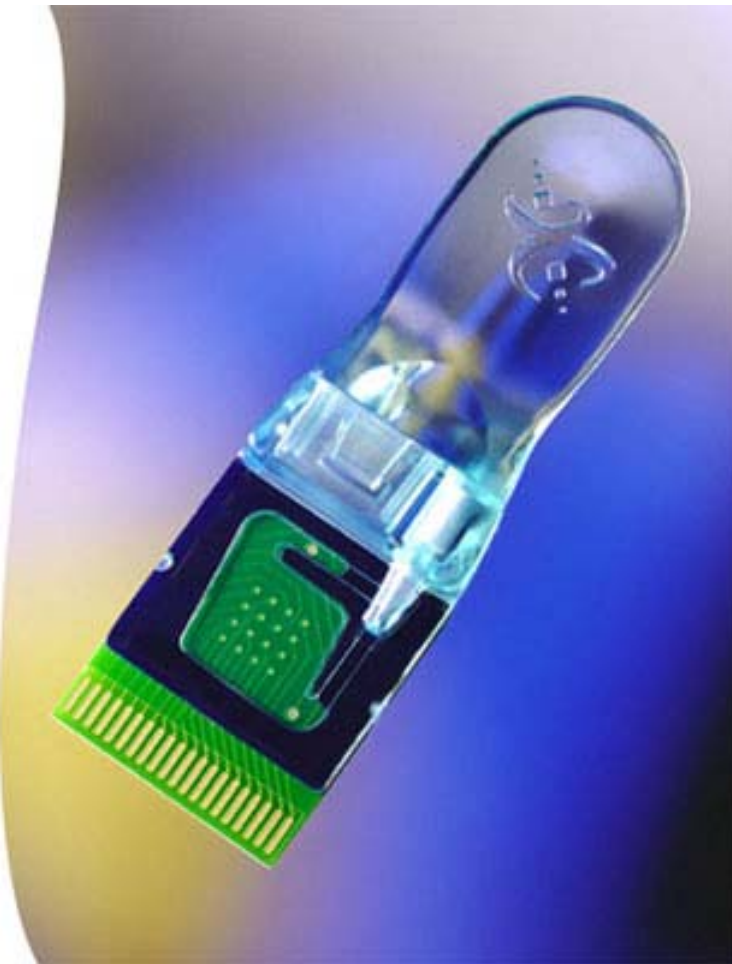
Matériau: Verre
Détection fluo

Applications: Separation ADN, ARN
Protéines
Cellules

Aclara « Labcards » (polymère)



Combinaison (« Biochip » Motorola)



Matériau:
circuit imprimé, hybride Si-
plastique
Détection électronique
Groupement « étiquette »
électroactif
-> transfert d'électrons)

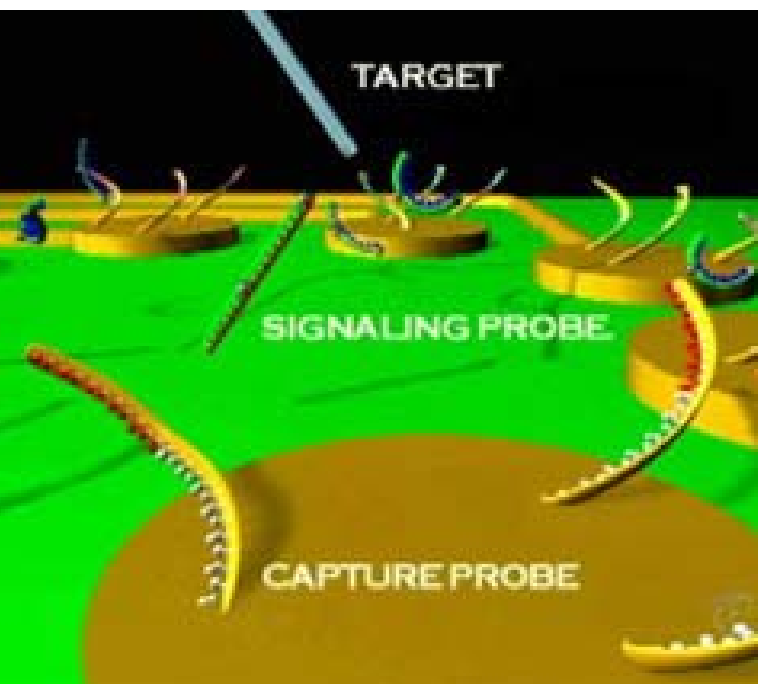
Applications: « puces à
ADN »:

Chaque plot porte un ADN
simple brin différent

Si la solution contient
l'ADN complémentaire,
reforme une double hélice
(hybridation): -> signal

électrique

y, Iéto
lleurbanne



Pays fortement impliqués

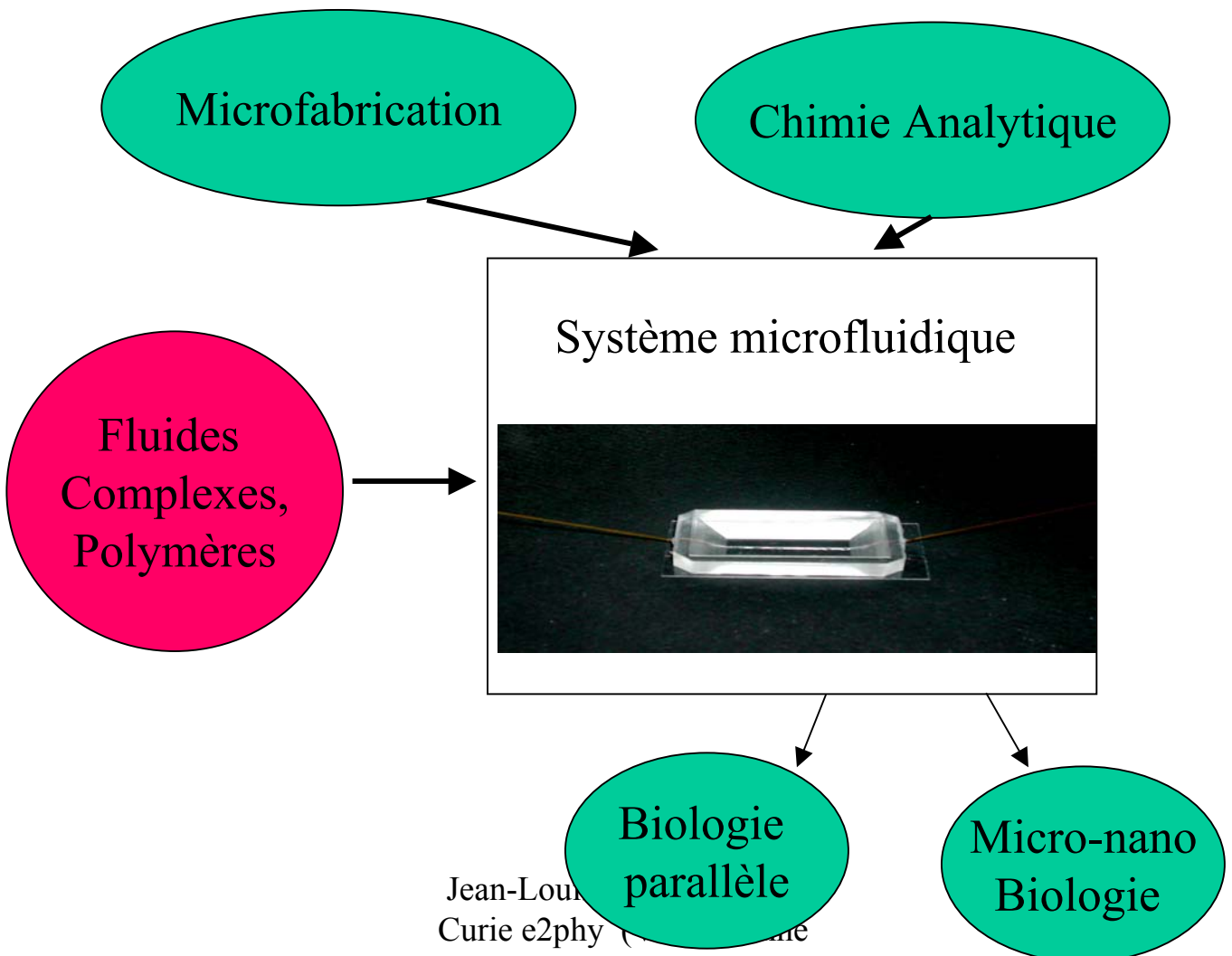
- USA
 - Industriels
 - ABI
 - MD
 - NEC
 - Motorola
 - Académique et institutionnel
 - MIT
 - Harvard
 - Berkeley
 - Princeton
 - Cal. Tech
 - NIH
 - Oak Ridge
 - DOE
 - Startups
- Japon
 - Mitsubishi
- Suède
 - Pharmacia (Gyros)
 - KTH, Uppsala
- GB
- Allemagne
- Danemark
- Suisse

En France

- Lyon-Grenoble
 - CEA-*LETI*, Bio-Mérieux, ApiBio, ENS, Centrale-Lyon...
- Paris et région parisienne
 - ENS, ESPCI, Institut Curie, Cachan, *LPN*
- Lille, Compiègne
 - *IEMN*
 - UTC
- Rennes
 - ENS
- *Toulouse*
- *besançon*
- **Nancy (Chimie)**

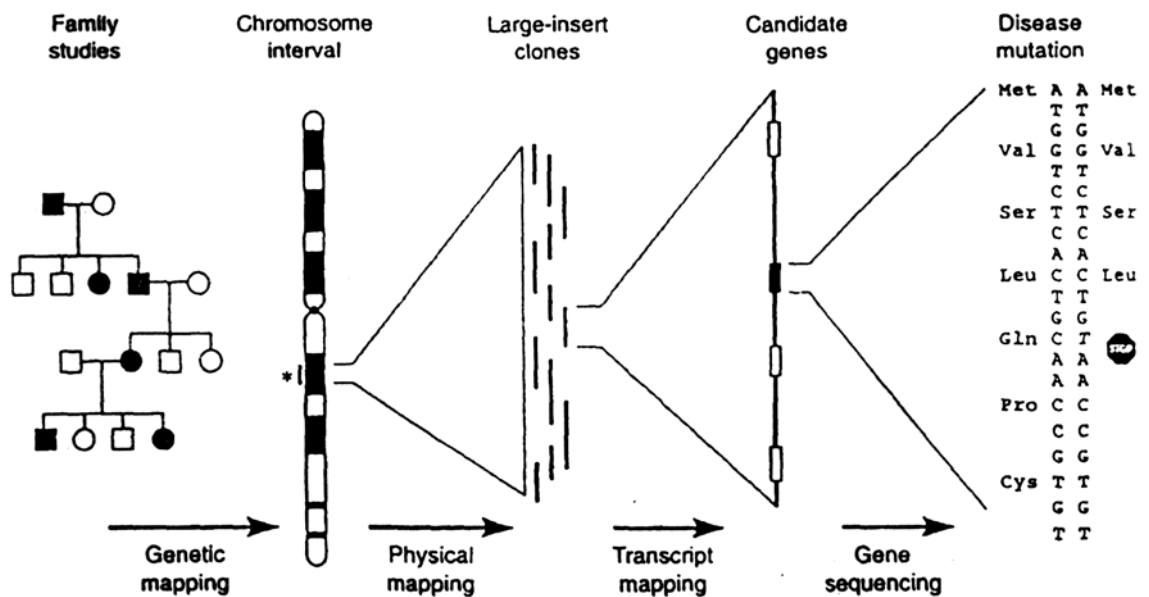
Quelques projets Microfluidique à l'Institut Curie

*Macromolécules et Microsystèmes en Biologie et Médecine
(JLV, G. Cappello): Séparation, analyse, molécules uniques*



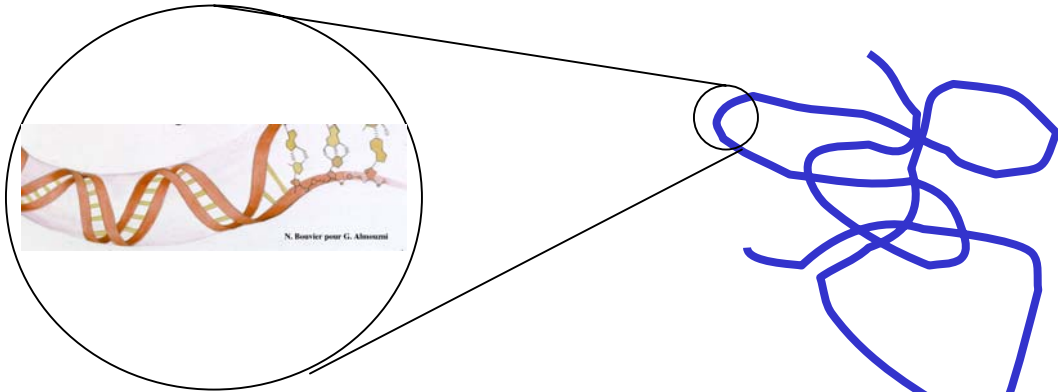
Séparations d'ADN:

- Tailles d'ADN mises en jeu



M_w : Mbp kbp 1 base
 10^{11} 10^9 10^6 10^3

...la molécule d'ADN



Longueur de persistance: 50 nm
Diamètre: 1 nm

- *Macromolécule:*

Double hélice

Linéaire

Flexible

Uniformément chargée
(squelette phosphodiester)

- → Séparation par **électrophorèse**

- →

Séparations de l'ADN par électrophorèse

Applications: sequençage
 Cartographie des gènes
 Mutations
 Diagnostic, etc...

- densité de charge uniforme:
 - >pas de séparation en taille en liquide simple
- ->nécessité d'une **matrice**:

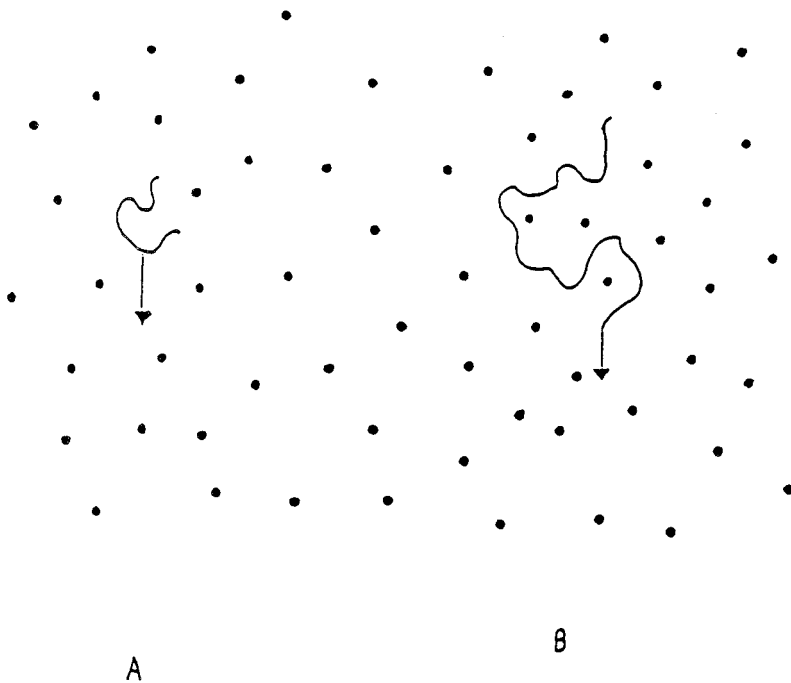
Traditionnellement: électrophorèse en gel



Acrylamide, Agarose
pores: 10 nm \approx 0.5 μ m

Mécanismes de séparation en électrophorèse sur gel:

Utiliser les interactions stériques avec les obstacles du gel.



Molécule plus longue:

Parcours plus « tortueux »

Vitesse moins grande

mécanisme de « reptation » (de Gennes)

Problèmes avec l'électrophorèse sur gel:

- Lent (échauffement; champ faible 10 V/cm)
- encombrant
- laborieux
- usage unique

Nouvelle génération:

électrophorèse capillaire, microfluidique

<100 μm ID => meilleure dissipation => 100-1000 V/cm

- Rapide
- Automatisable
- Parallélisme (96, 384, ...)

• Mais

- Impossible d'utiliser des gels
(problèmes de dégradation)
- Peut utiliser des solutions de polymères enchevêtrés bien adaptés à la séparation des molécules assez petites (séquençage)
- Viscosité élevée peu compatible avec les lab on chips

Séquençage de l'ADN

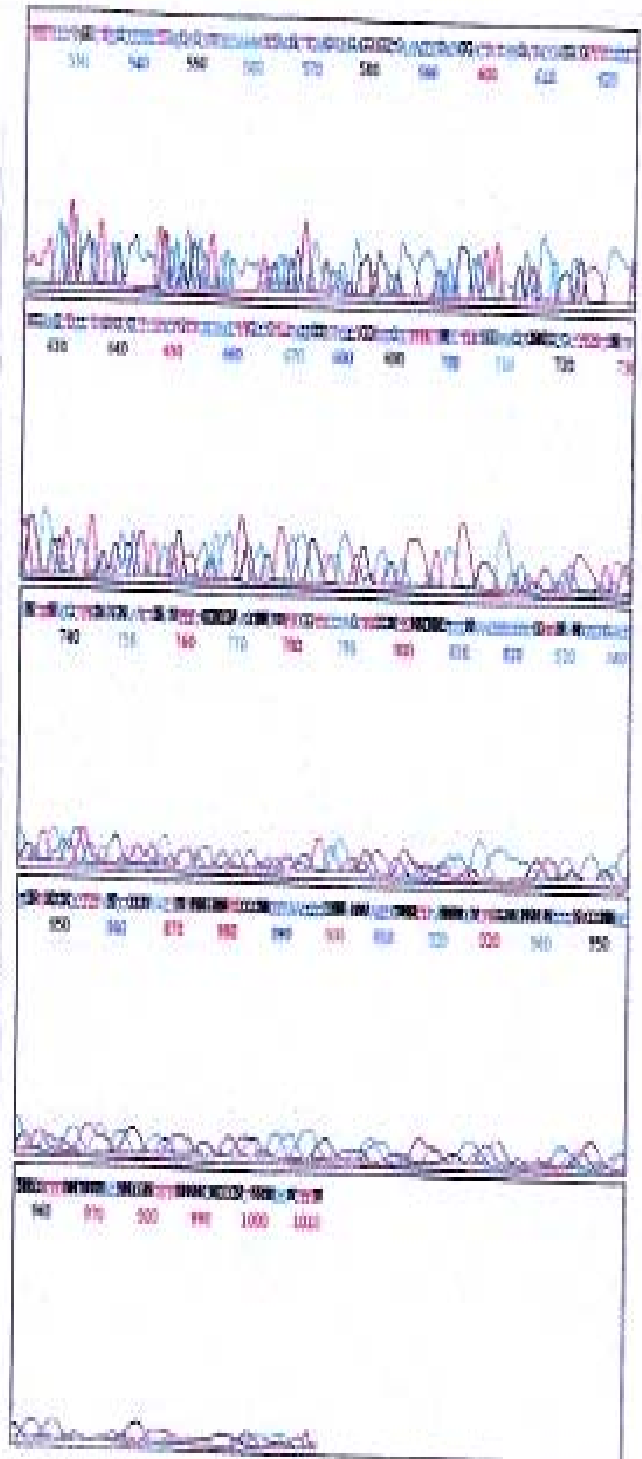
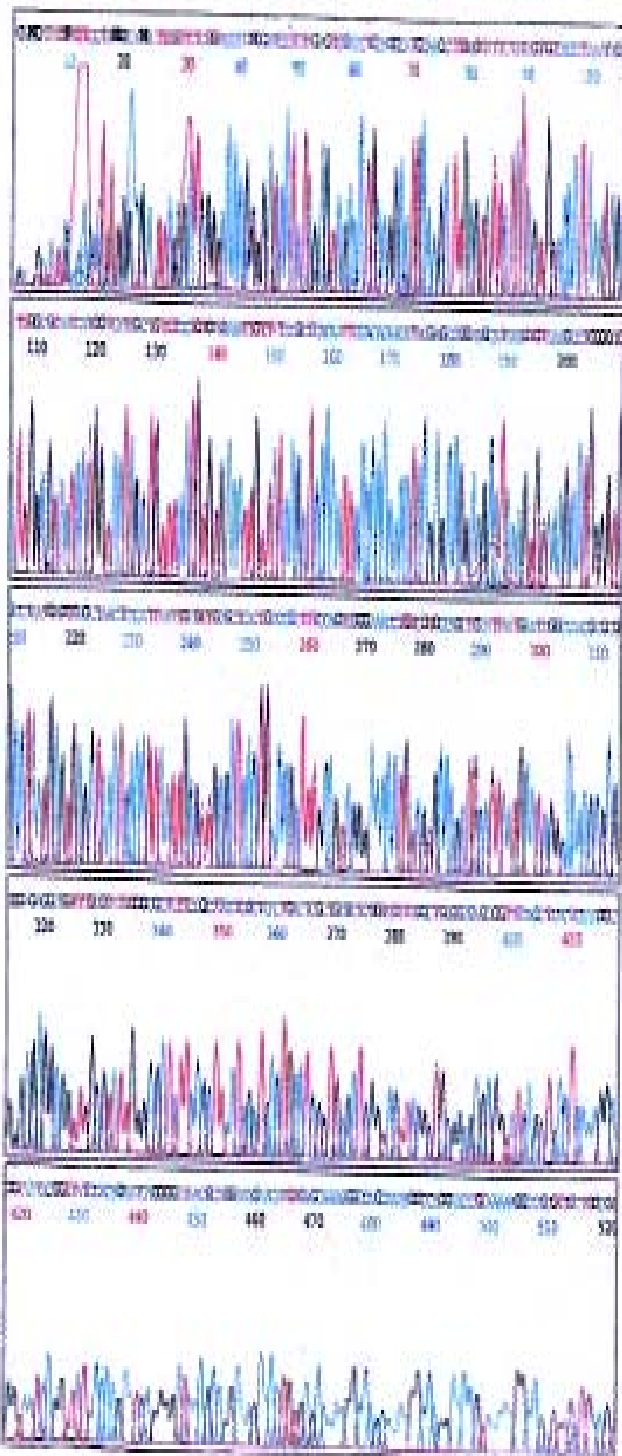
- Détermine la séquence
- Réaction de séquençage
 - Clonage -> ADN inconnu
accroché à amorce de réplication connue
 - Effectue la **réplication** (polymérase), avec qq % de
 - A* bleu; T*vert; G*jaune;C*rouge
 - Dideoxy (arrête réplication)
 - -- « échelle » d'ADN de toutes les **tailles** possibles; **couleur** signe le **dernier nucléotide**
 - Séparation en taille à très haute résolution (1/1000)

DNA Sequencing

Polymer: 5% pAM2pNIPAMa4

Temperature: 60°C

Sample: obtained from Centre National de Séquençage



Applications haute résolution (séquençage): Problèmes de viscosité

Solution: **transition liquide/gel
thermostimulable et réversible**

- Collaboration
ESPCI (D. Hourdet)
- greffons « LCST »
 - Solubles à 20°C
 - Micelles à 60°C
- Réversible
- Adaptation
 - Viscosité
 - Taille de pore
(conc.)
 - Température de
transition
- Pores: 2 ~ 100 nm

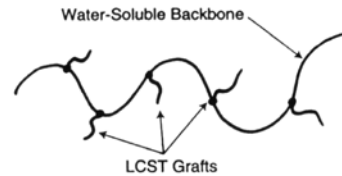
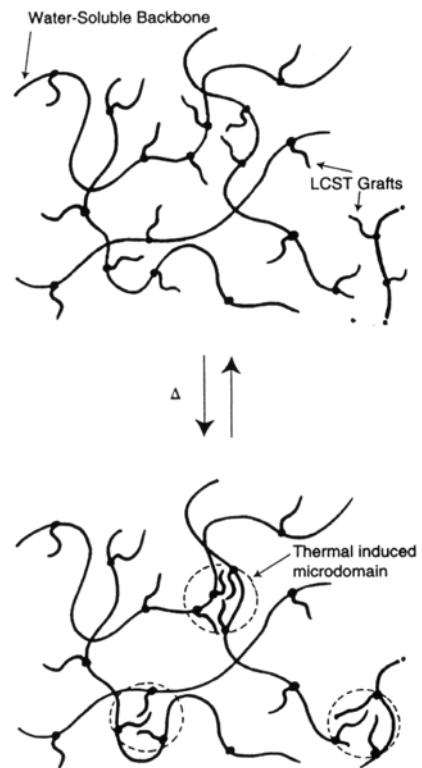


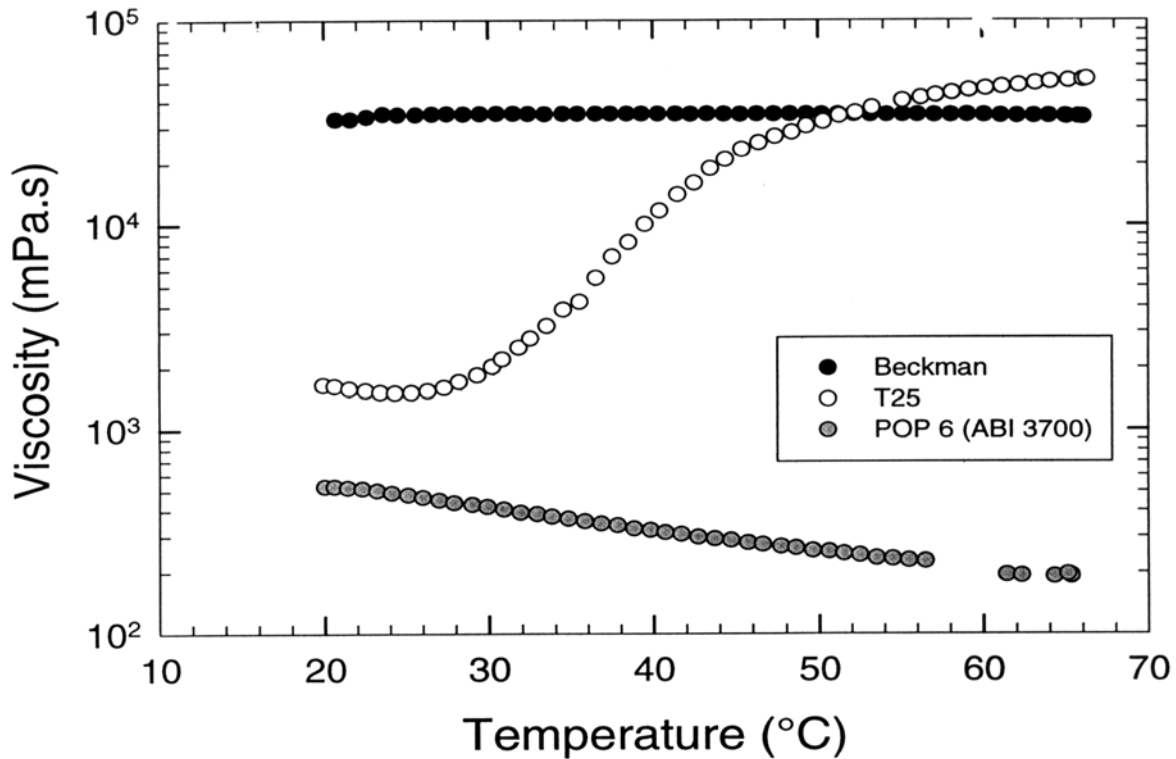
Figure 2
Possible chemical structure of a "thermoassociative"
polymer.



Viscosité/température

Remplissage: 25°C

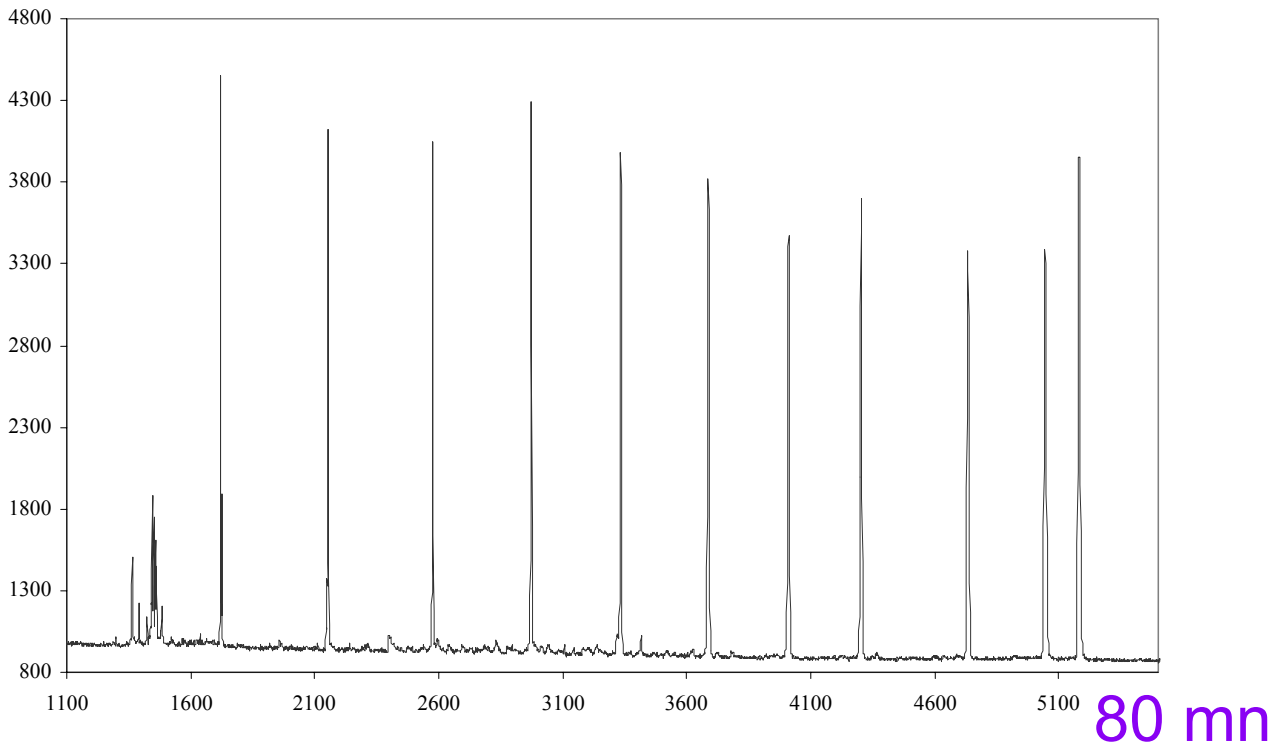
Séquençage: 50°C



Separation: 100-1500 bases ladder

100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1250, 1500 bases

T25 13/07 3% 12,2kV MC11 30/08/00 15h15 1e Run



Jean-Louis Viovy, Institut
Curie e2phy (Villeurbanne)
26-29 Aout 2002)

Application à la détection de mutations

→ **Collaboration D. Stoppa-Lyonnet, Hopital Institut Curie Hospital**

→ **BRCA1, BRCA2: Prédiposition** au cancer du sein (20% des cas) (plusieurs milliers/an en F)

→ Env. 20 000 bases à tester par patiente.

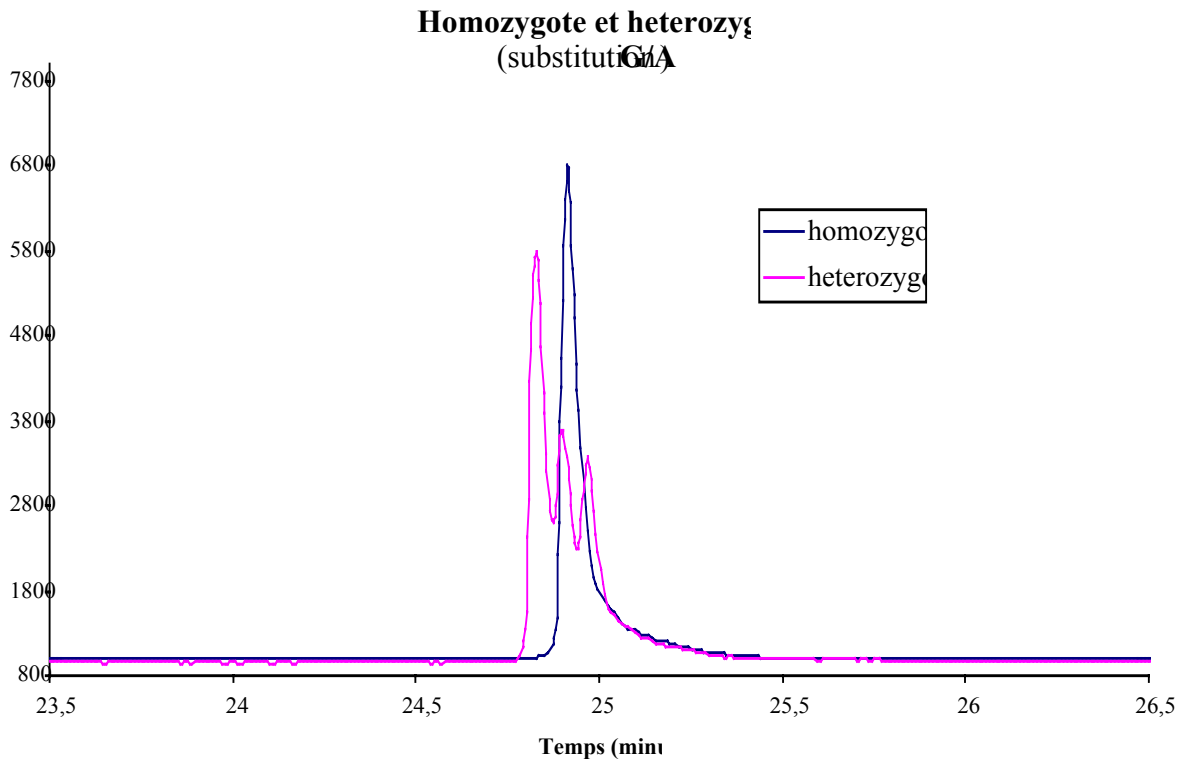
Actuellement: chromatographie, 6 mois

→ **Projet: utiliser les séquenceurs d'ADN multicapillaires**

mutations hétérozygotes (deux copies du gène légèrement différentes)

Exemple

Patiente: Substitution A/G sur BRCA1



Personne normale (bleu): 1 pic

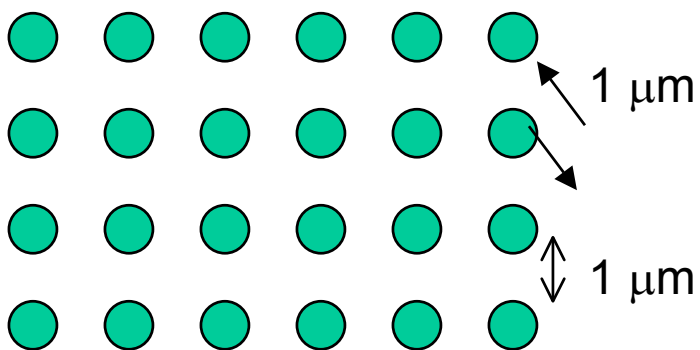
**Mutation (violet): 2 à 4 pics suivant
réappariements**

**Electrophorèse parallèle multicapillaire:
de 6 mois à 1-2 semaines**

Pour des molécules de taille micronique: (grands ADN) Laboratoires sur puces: microfabrication

Réseaux d'obstacles gravés sur silicium

*(Groupe de Bob Austin,
Princeton 1992-2002)*



Problèmes: fabrication délicate,

Jean-Louis Viovy, Institut
Curie e2phy (Villeurbanne)
26-29 Aout 2002)

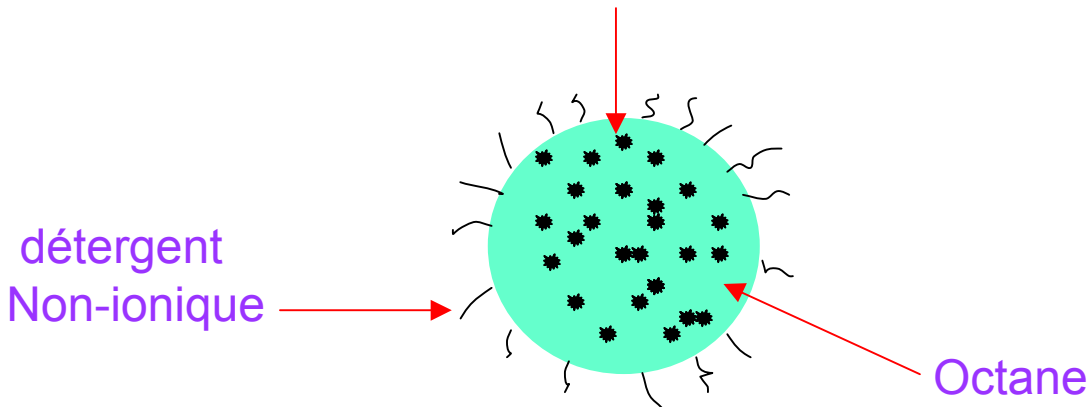
systemes plus robustes?

Utilisation de l'AUTO-ORGANISATION de la matiere

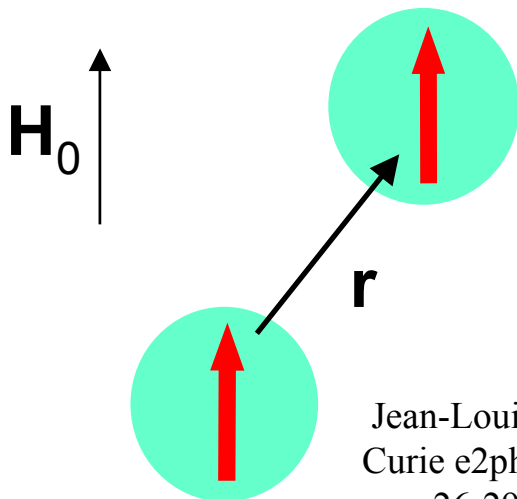
(collaboration avec *Jerôme Bibette, ESPCI*)

Particules magnetiques "chevelues"
diametre = 0.2-0.7 μm

Fe_2O_3 grains ($\sim 10\text{nm}$) (nano-aimants, desordonnes)

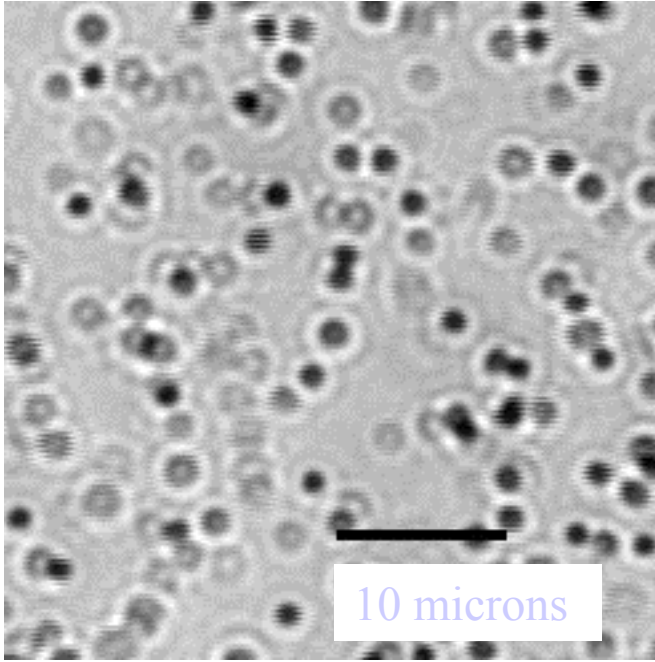


En presence d'un champ magnetique: dipoles s'orientent \rightarrow micro-aimants, ordonnes
Attraction dipole - dipole

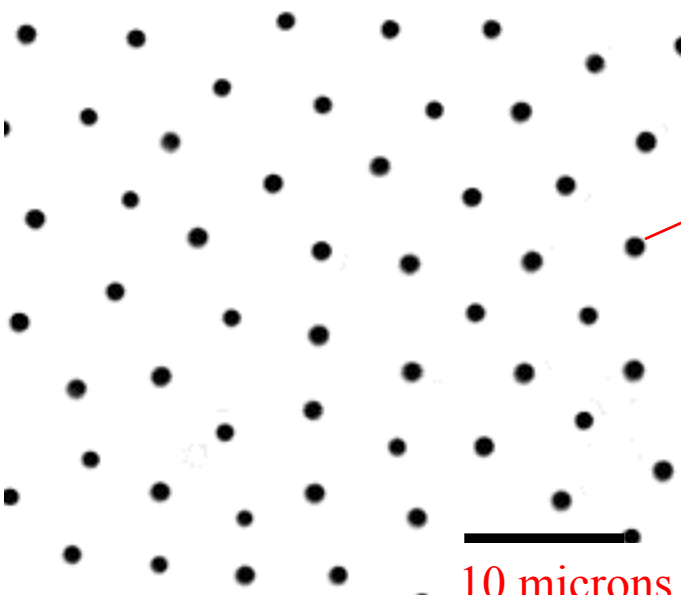


Jean-Louis Viovy, Institut
Curie e2phy (Villeurbanne)
26-29 Aout 2002)

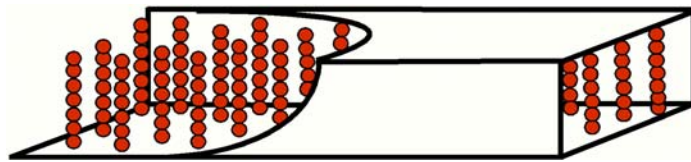
Comportement collectif: Canal mince perpendiculaire à H Réseau hexagonal de colonnes



Sans champ H:
Liquide



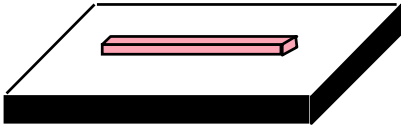
Champ magnétique:
Réseau fixe



10 microns

Réalisation du canal: Cellules « souples » silicone

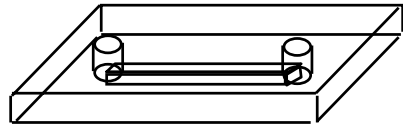
1) Préparation du moule négatif



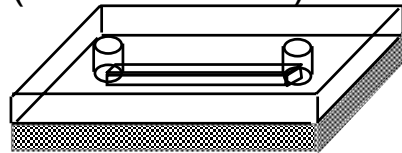
2) Moulage



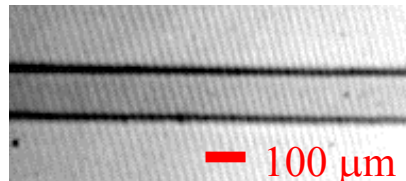
3) Retrait du moule et perçage



4) Scellement du canal (Van de Waals)

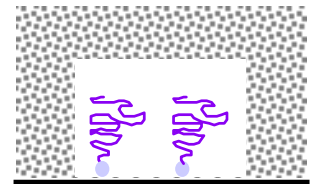


Exemple



Avantages

- Adhère spontanément au verre
- Réutilisable
- Bon marché et rapide
- Possibilité de fonctionnalisation



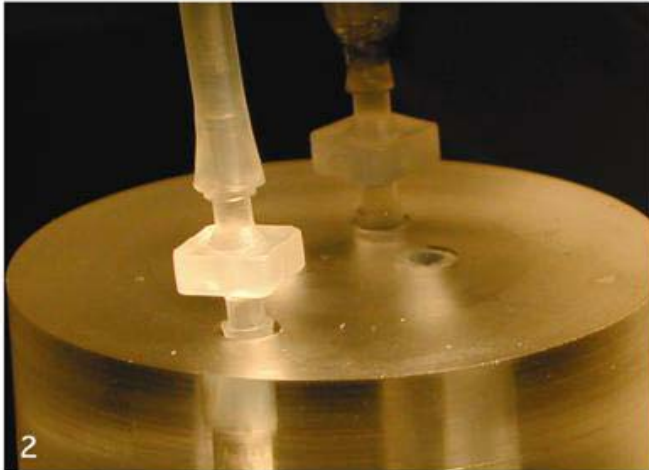
Vers un laboratoire sur puce

Ephesia, un "tamis moléculaire" à base de micro-billes pour repérer ou isoler des ADN ou des cellules



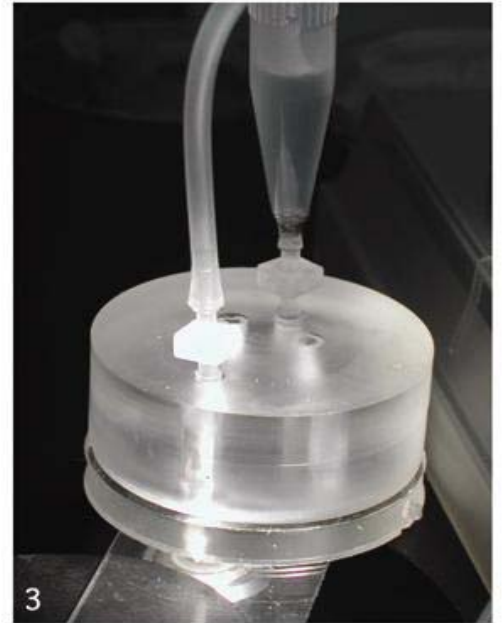
1. Puce : "Galette" de silicone de 4 cm de diamètre, au sein de laquelle sont finement moulés des micro-canaux.

© Institut Curie



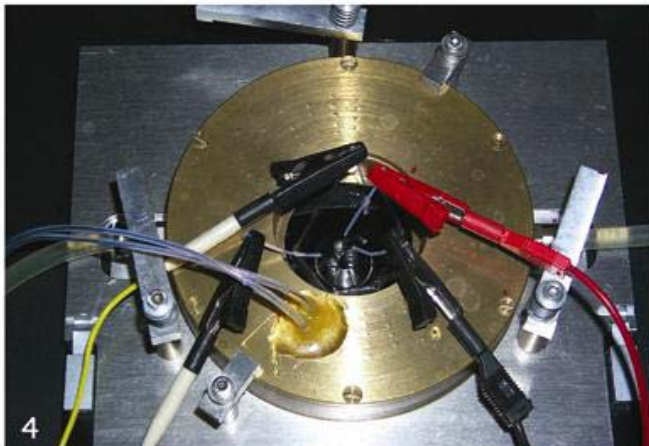
2. 3. Injection du liquide contenant les micro-billes dans un micro-canal, puis injection des molécules à trier dans un autre canal.

© Institut Curie



4. Un champ électrique est utilisé pour "pousser" les molécules à travers le tamis.

© Institut Curie



Images disponibles au Service de Presse de l'Institut Curie

Tél. 01 44 32 40 51/40 63
service.presse@curie.fr

*L'Institut
Curie*

Observation

ADN Fluorescent

PDMS

Canal

Objectif

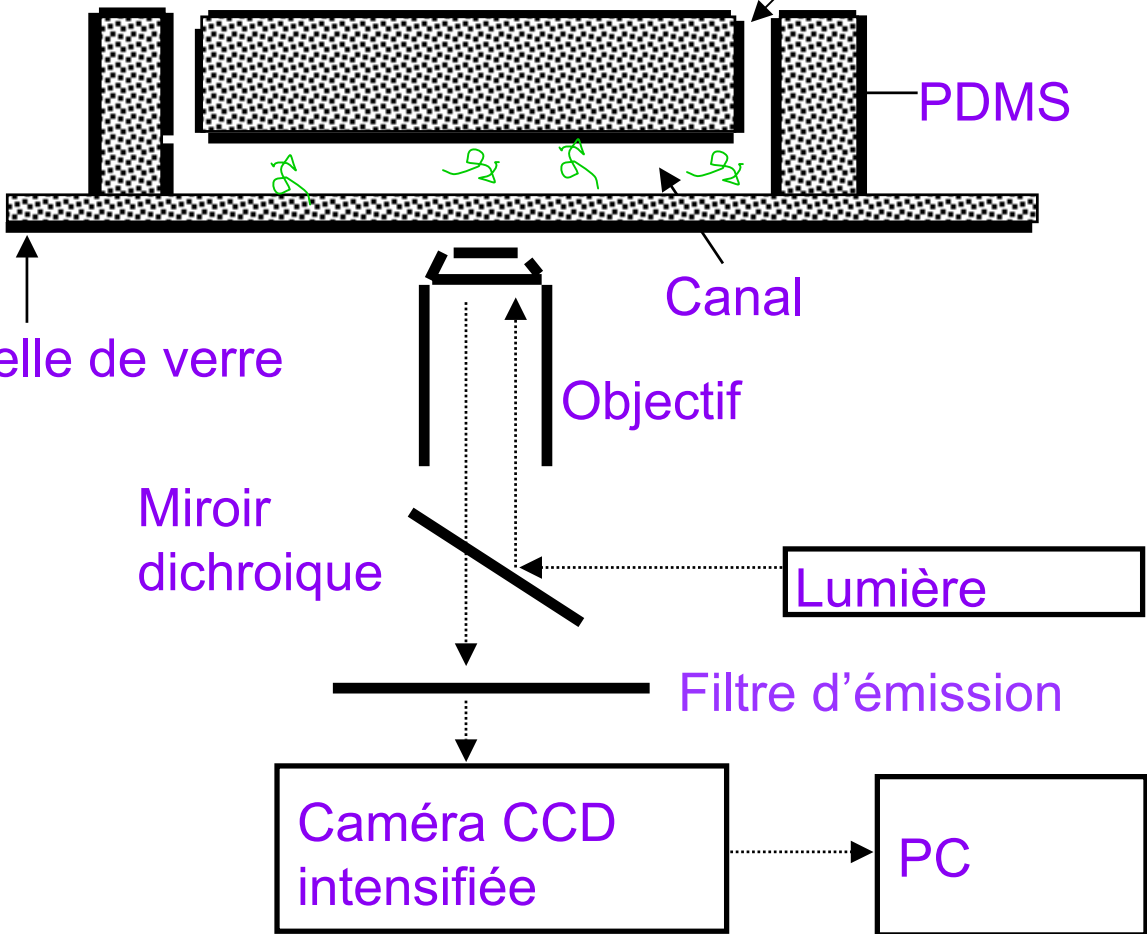
Miroir
dichroïque

Lumière

Filtre d'émission

Caméra CCD
intensifiée

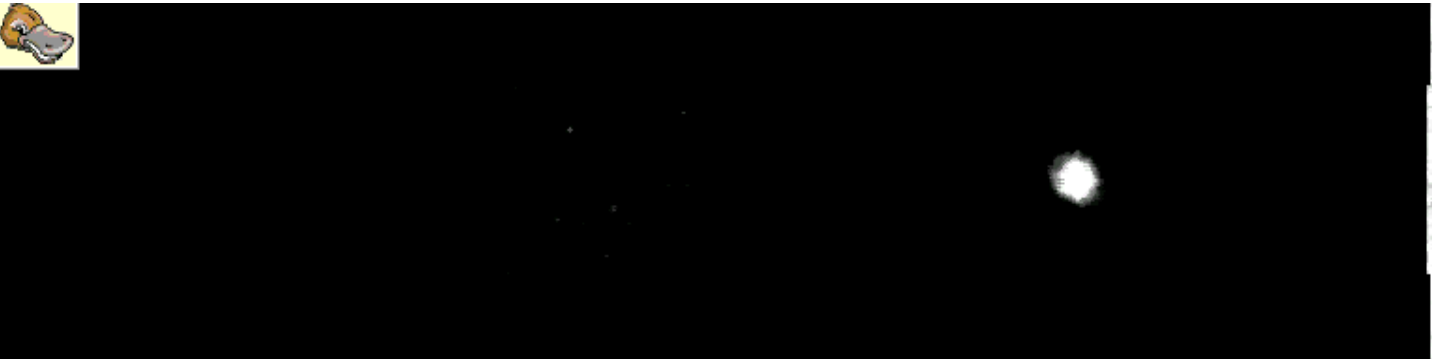
PC



Molécule individuelle d'ADN entre en collision avec Une colonne individuelle

T4- DNA (167 kbp, 72 μm)
 $E=10 \text{ V/cm}$

← E

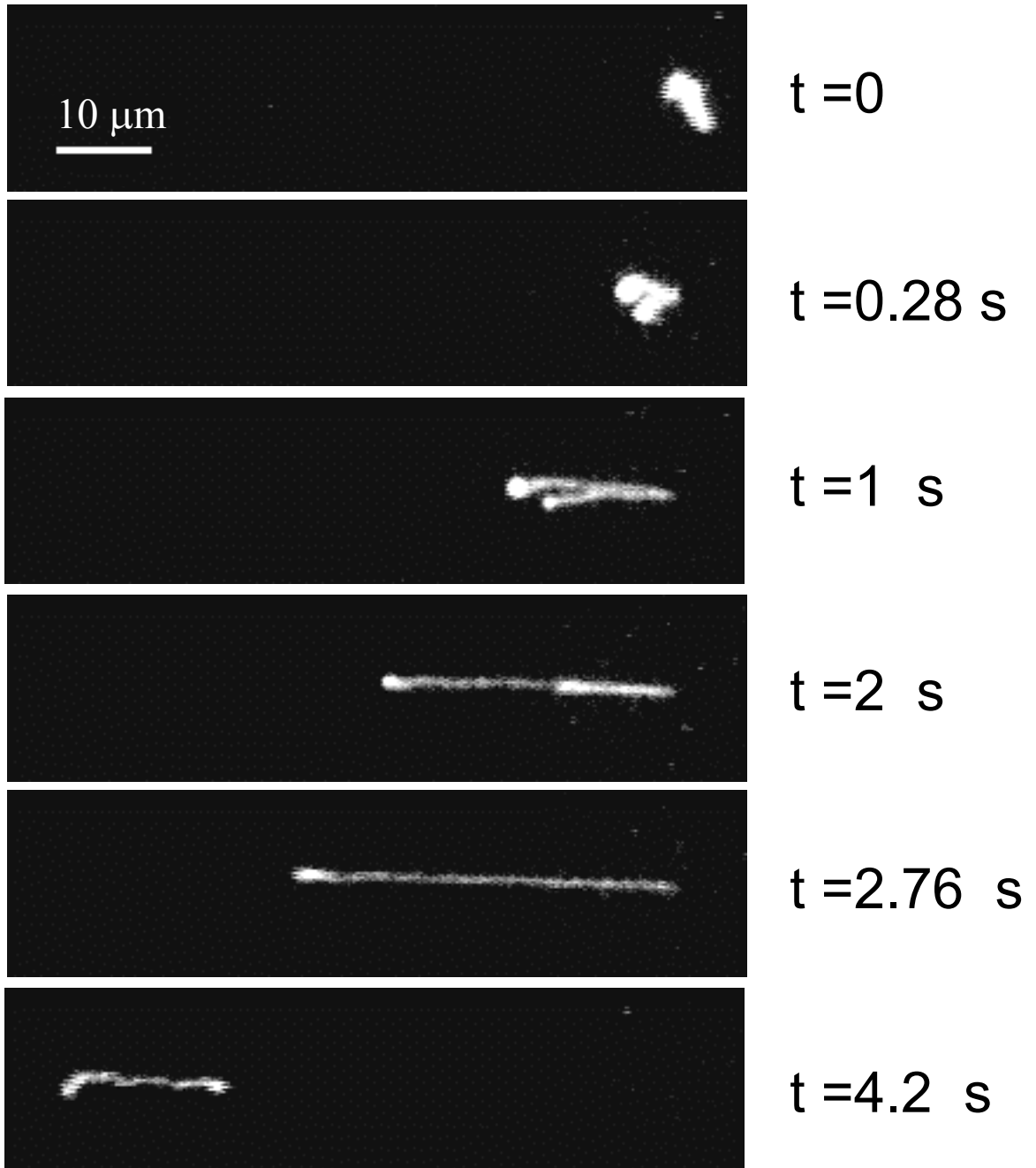


Interaction entre 1 ADN et une colonne

T4- DNA (167 kbp, 72 μm)

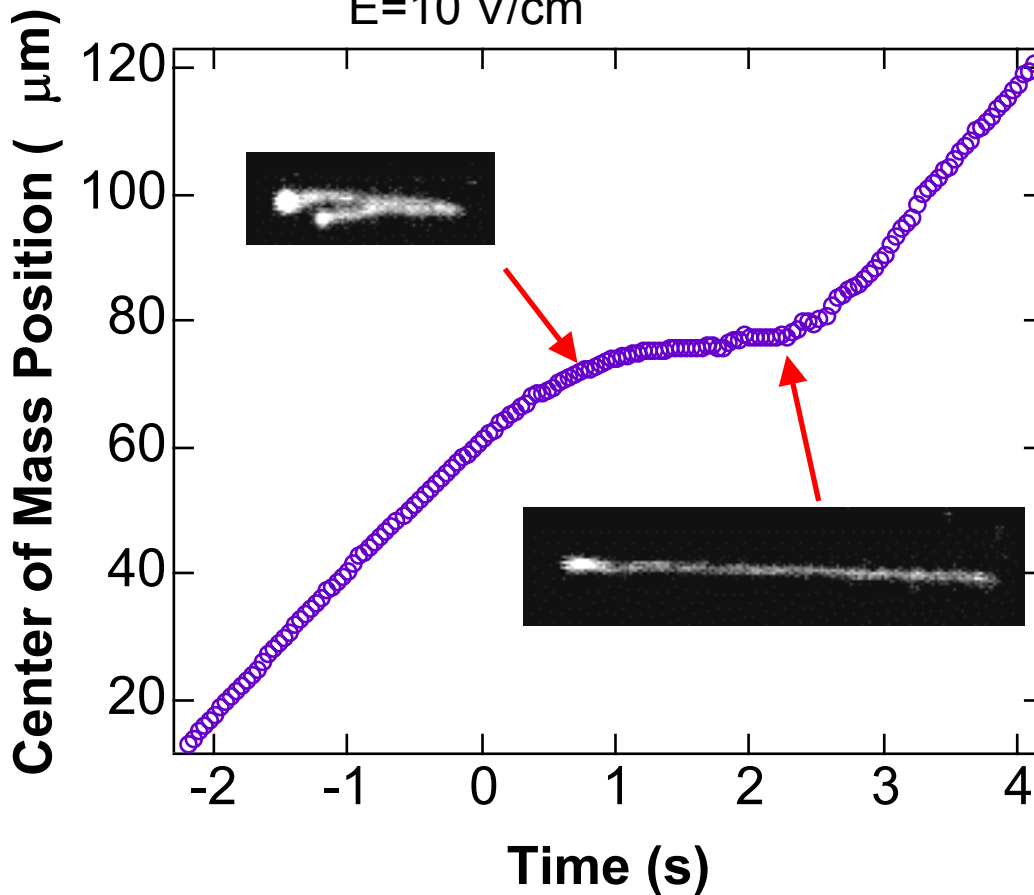
$E=10$ V/cm

 E



Déplacement au cours de la collision

T4- DNA (167 kbp, 72 μm)
 $E=10$ V/cm



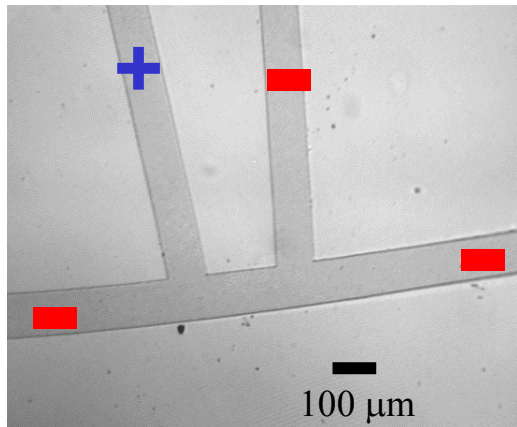
Temps moyen de contact:

$$\tau_4 = 2.9 \text{ s}$$

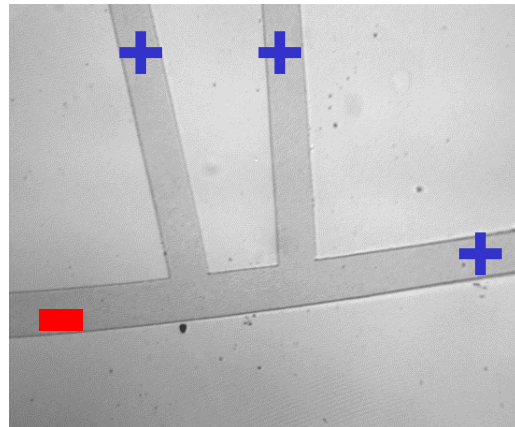
$$\lambda = 0.8 \text{ s}$$

Séparation d'une population de molécules: « starting blocks »

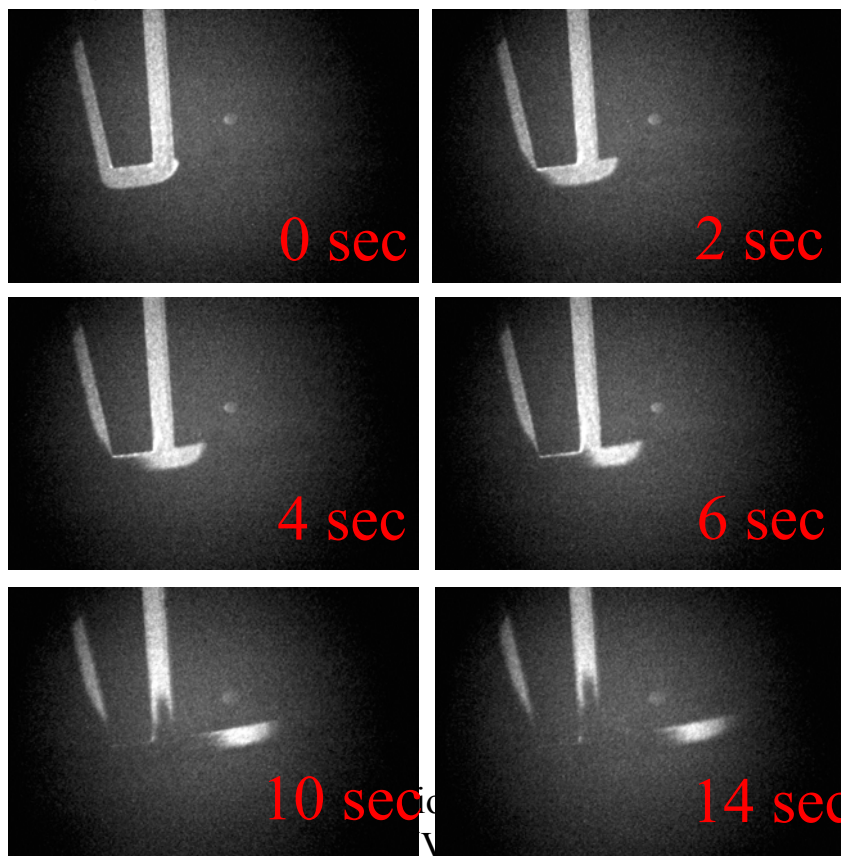
Chargement



Injection



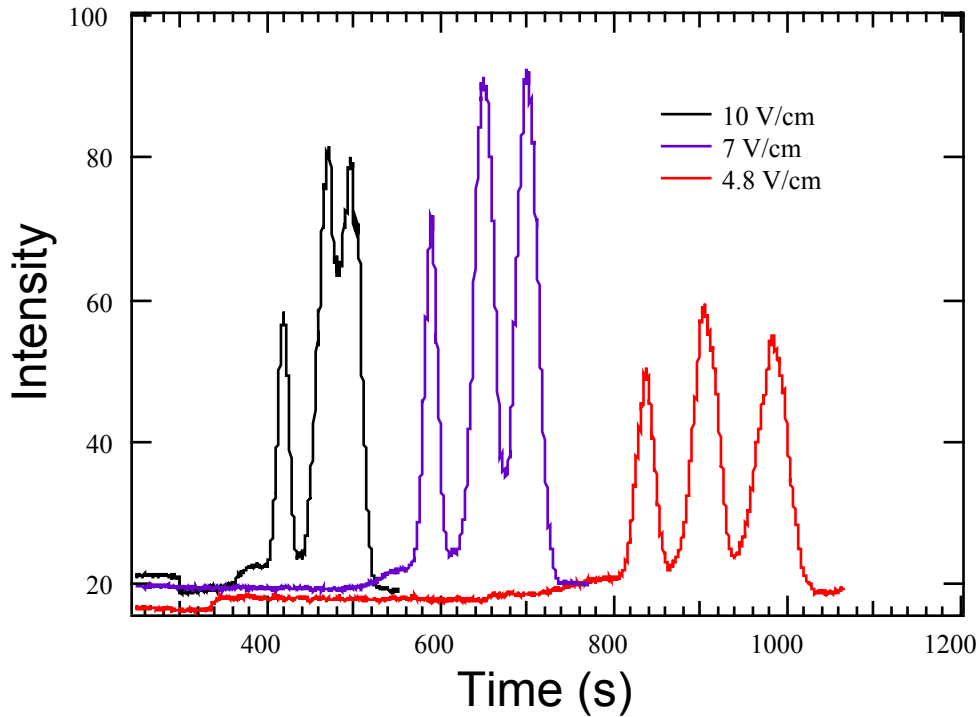
Injection at 10V/cm



Separation de « Xho-I Digested λ -DNA » (fragments de restriction)

λ -DNA, 48.5 kbp

Xho-I Digest, 33.5, 15 kbp



Pour comparaison: En gel, 12 heures

Autre application: tri cellulaire

- Séparation de cellules selon
 - Propriétés physicochimiques (taille, charge de surface, constante diélectrique, déformabilité)
 - **Propriétés biologiques** (anticorps de surface)
- **Enjeux**
 - Bactériologie (recherche, transfusion sanguine)
 - Cancérologie (recherche de micrométastases dans le sang, la moëlle osseuse) ($1/10^6$).

Cytométrie en flux

(spectroscopie de cellules une par une
« au vol » dans un flux)

Traditionnellement: machines macroscopiques

Récemment:
Microfluidique
(Oak Ridge, USA)

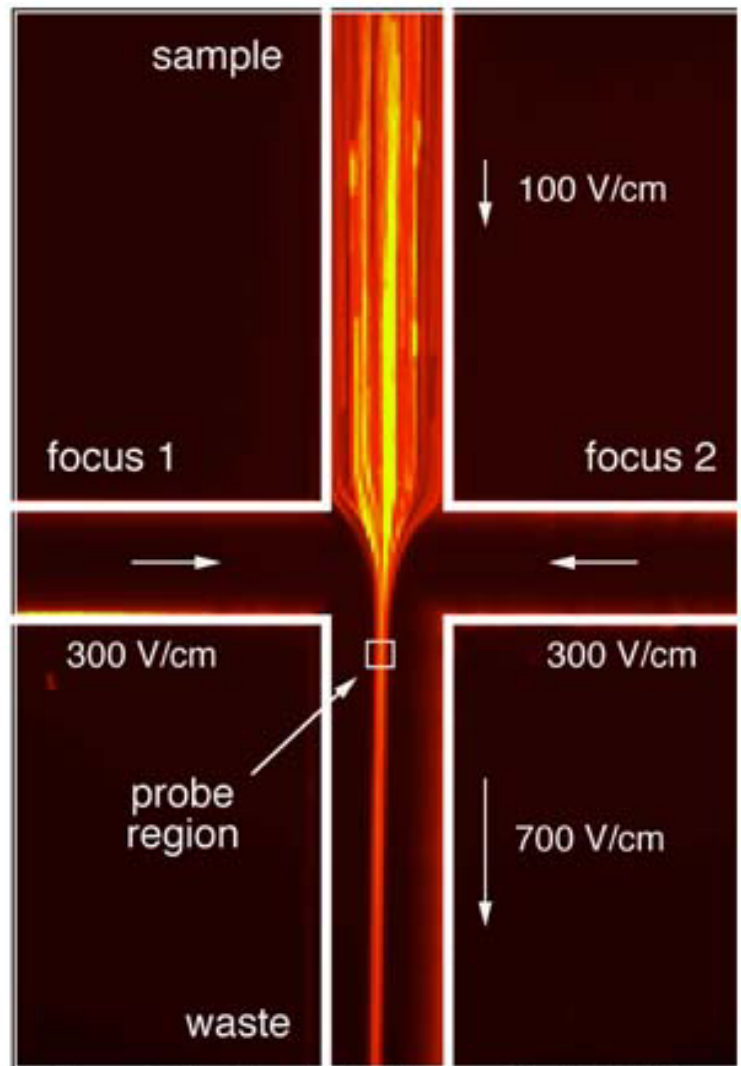


Figure 1. Time-integrated CCD image of electrokinetically focused 1.88 μm labeled particles on microchip A. The exposure time was 5 seconds with sample and focusing field strengths of 100 V/cm and 300 V/cm, respectively. Arrows depict direction of transport, and their lengths are proportional to average fluid velocities in each channel.

Problèmes:

Complexe

Débit très limité

Jean-Louis Viovy, Institut
Curie e2phy (Villeurbanne)
26-29 Aout 2002)

Histogramme (propriétés spectroscopiques de particules individuelles)

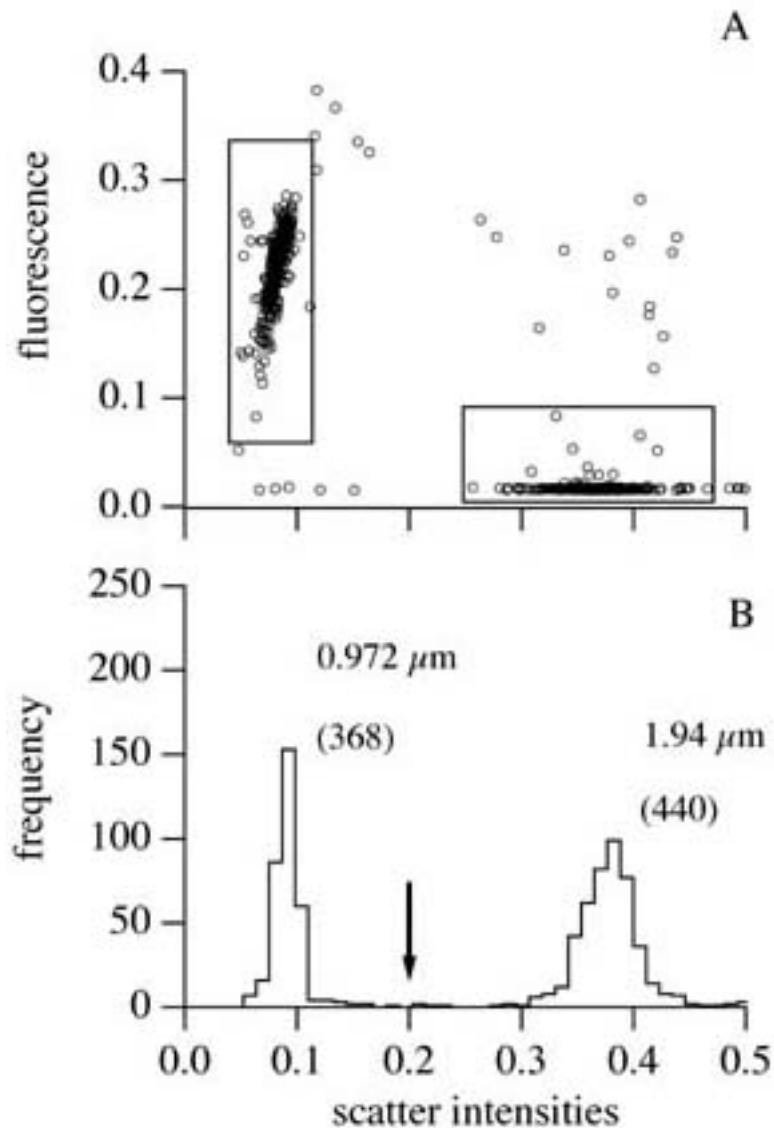
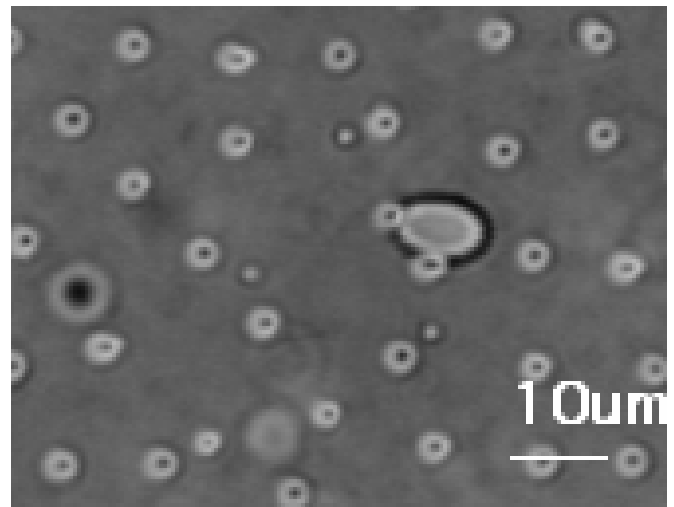
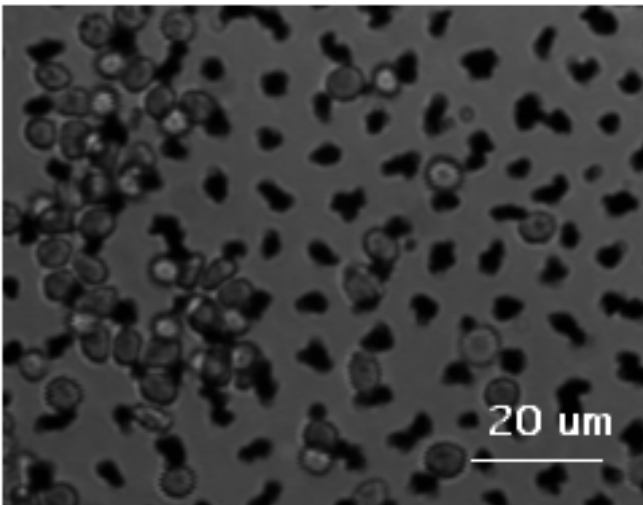


Figure 3. (A) Light scattering and fluorescent scatter plot and (B) light scattering histogram for the data shown in figure 2. The boxes in (A) contain 95% of all the detection events. The arrow drawn in (B) separates the particle distribution based on the number of fluorescence events observed.

Tri cellulaire en réseaux magnétiques

(C. Goubault,
Coll. J. Bibette, ESPCI, Ademtech
N. Blin, Institut Curie)

- Billes magnétiques porteuses d'anticorps spécifiques
- Réseau de colonnes à larges pores
- Système modèle, érythrocytes



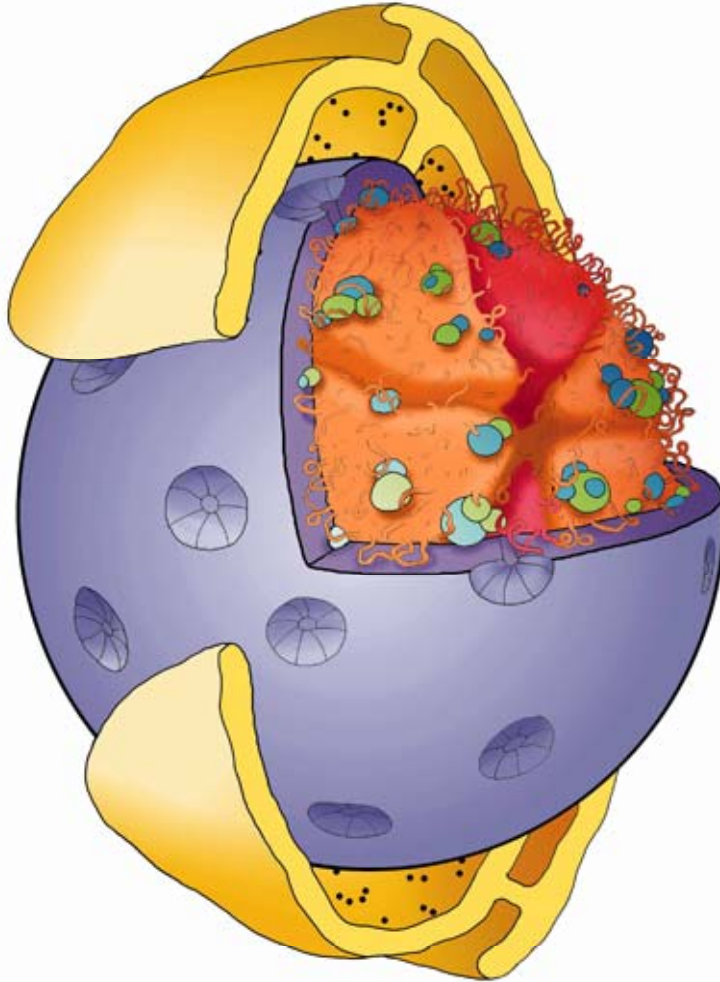
Résumé, colonnes magnétiques

- **Apport de la physicochimie de la « matière molle »**
- **Utilisation de l'auto-organisation**
- **Taille de pores adaptée pour des « gros » objets biologiques, systèmes mésoscopiques**
- **Mécanisme moléculaires et propriétés physiques originaux**

Avenir

- **Automatisation, intégration de plusieurs processus**
- **Fonctionnalisation des particules (Sélectivité biologique)**
- **ADN, Cellules, protéines**

Autre application:
Comprendre comment l'ADN est compacté
Dans le noyau cellulaire



Noyau d'une cellule de mammifère ~ 2 μm

Génome humain = 3 10^9 paires de bases ~ 1 m!

Jean-Louis Viovy, Institut
Curie e2phy (Villeurbanne
26-29 Aout 2002)

L'ADN est présent sous forme de CHROMATINE (complexe nucléoprotéique)

Compaction effectuée par des protéines:
Les HISTONES



Les histones:

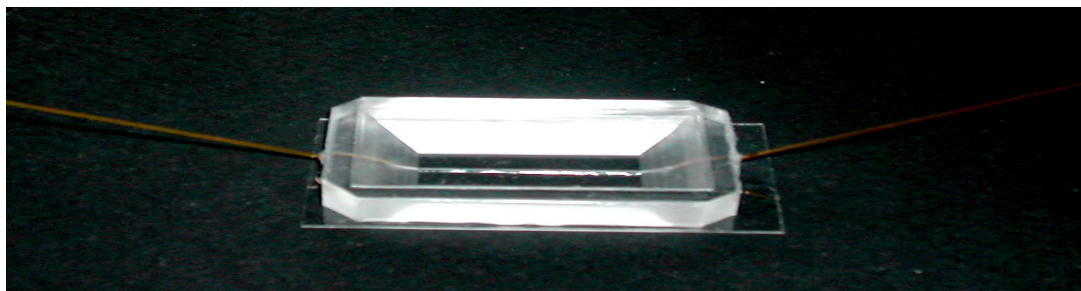
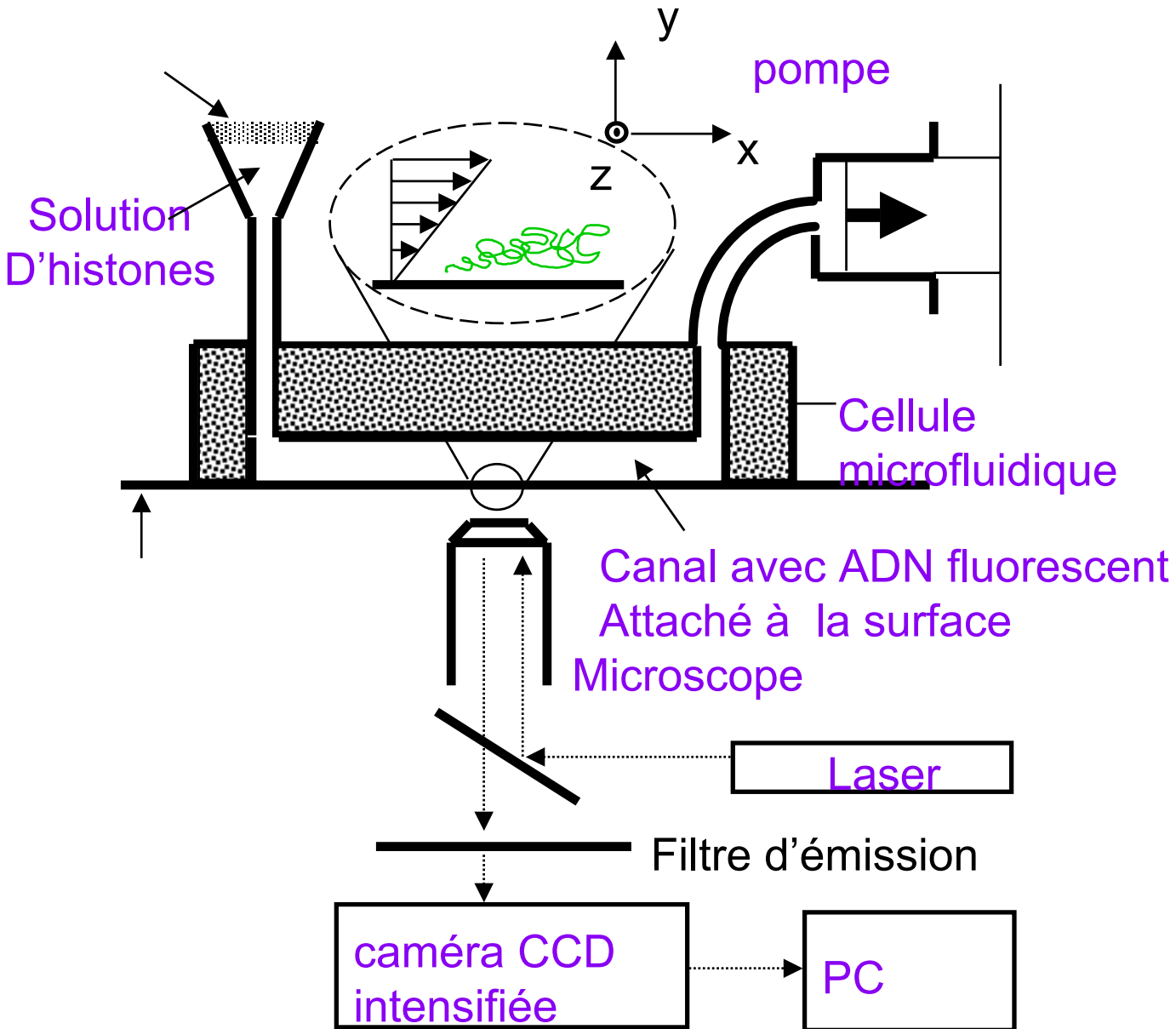
- * PROTEGENT l'ADN contre les mutations ,
- * MAIS: inhibent l'EXPRESSION des GENES

Vie => désassociation et réassociation
en permanence

Objectif: Comprendre cette dynamique à l'échelle
De la molécule d'ADN

Jean-Louis Viovy, Institut
Curie e2phy (Villeurbanne
26-29 Aout 2002)

Principe de l'expérience

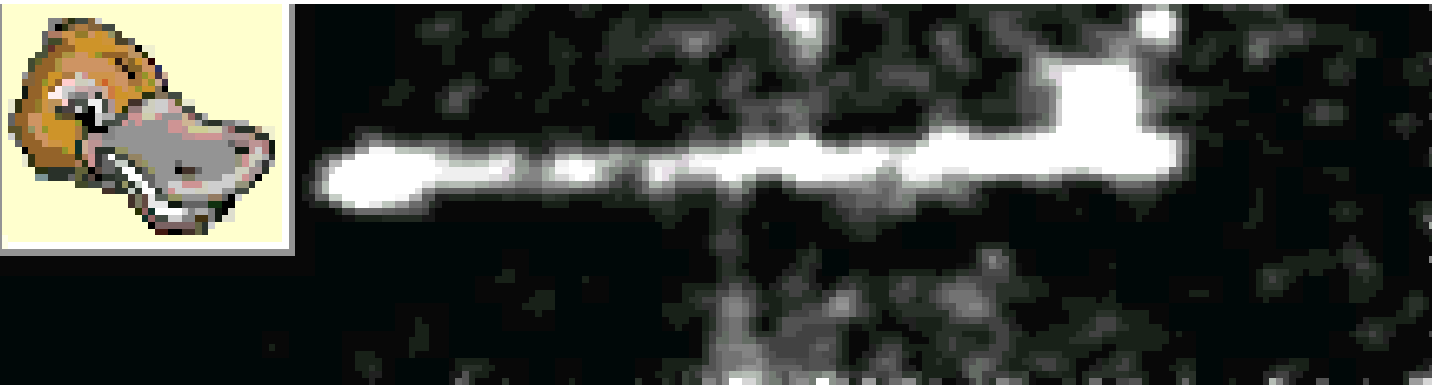


Videomicroscopie

ADN de « phage » (16 microns)

+

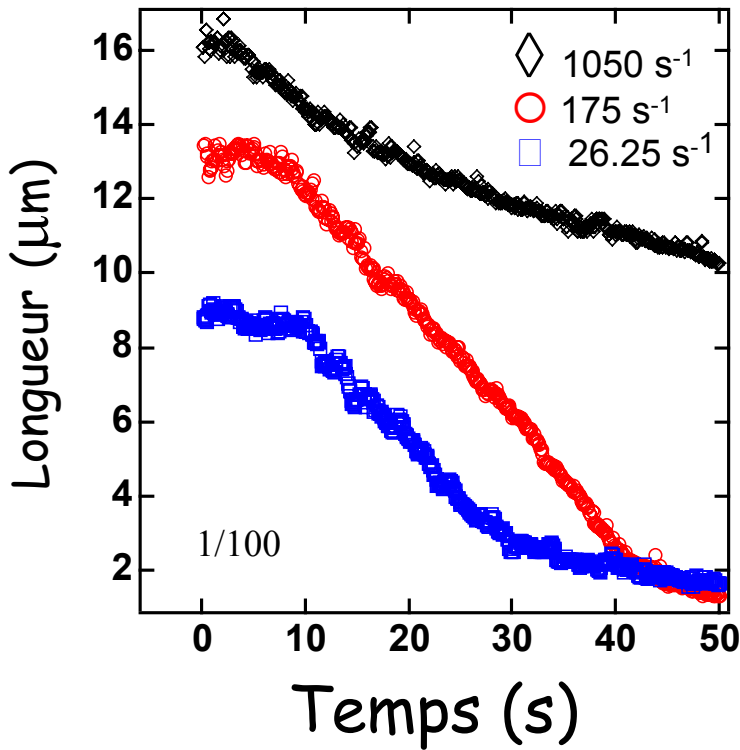
Extraits d'œufs de grenouille contenant
la « soupe d'histones »



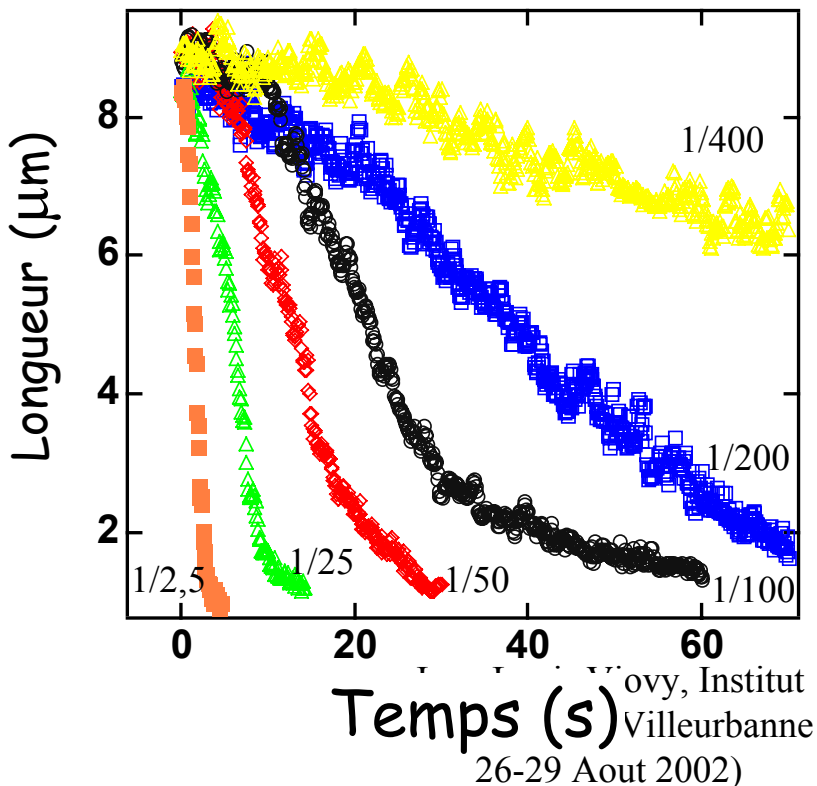
**Addition de détergent (dénature les
protéines:**



On peut faire de l'analyse d'image pour obtenir Des informations quantitatives

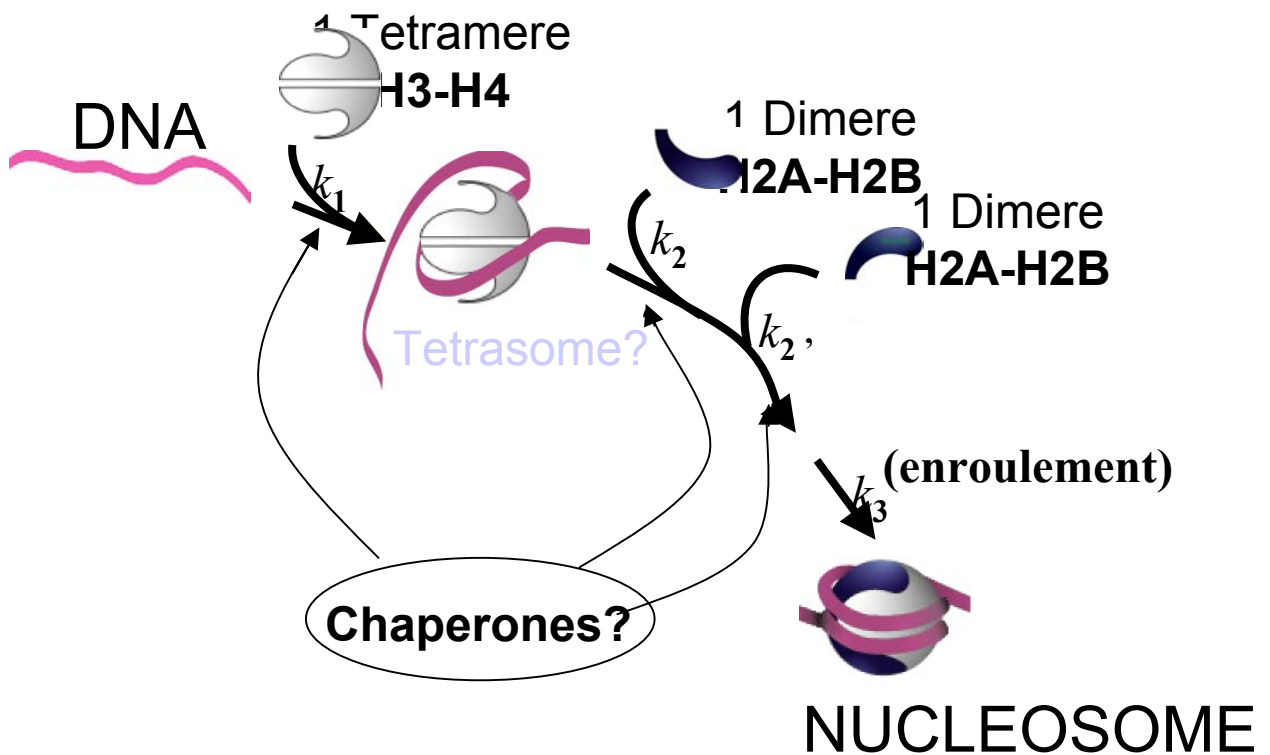


Effet de la vitesse
D'écoulement



Effet de la
Concentration en
histones

Et en déduire un modèle cinétique Pour la formation des nucléosomes



Constantes cinétiques:

$$k_{2,} = 1/2 k_2$$

$$k_1 \neq k_2 + k_{2,} \ll k_3$$

Jean-Louis Viovy, Institut
Curie e2phy (Villeurbanne
26-29 Aout 2002)

100 fois plus rapide qu'attendu!

Enjeux des microlaboratoires pour la biologie et la médecine:

- **Nombreux**
- **Importants**

- **Recherche**
- **Diagnostic**

Autres domaines:

- **Chimie combinatoire**
- **Réactions chimiques mieux contrôlées**
 - **Changements de température**
 - **Mélanges**

ULTRA-RAPIDES

Piles à combustible

Omniprésence de la physique et de la physicochimie

- Microfabrication
 - Microélectronique, microsystèmes
- Contrôle des phénomènes de transport
 - Electrophorèse
 - Champ de pression
 - Centrifuge (Gyros)
 - Capillarité
- Hydrodynamique
 - Bas nombre de Reynolds (écoulements laminaires): pb pour MELANGER!
 - Diffusion rapide
 - Forces capillaires très importantes
 - Évaporation rapide
- Thermique
- Systèmes de détection nouveaux ou adaptés

Remerciements



• Analyses microfluidique

- A. Asthana
- C. Goubault
- J.H. Codarbox
- C. Fuetterer
- N. Minc
- Z. Bilkova
- C. Gosse

– MIT: P. Doyle

• ESPCI

- J. Bibette
- M. Fermigier

– ADEMTECH

– LPN Marcoussis

- Y. Chen,
- A. Pépin

Molécules uniques •

- B. Ladoux; O. Du Roure (P. VII)
- P. Doyle
- A. Bancaud
- E. Karatekin
- R. Fulconis
- O. du Roure

Biologie Curie

- J.P. Quivy
- G. Almouzni
- M. Dutreix

Polymères

- V. Barbier
- J Weber

• ESPCI:

- D. Hourdet
- I. Iliopoulos

• Hopital Curie

- D. Stoppa-Lyonnet

• Optigene et Genoscope (Evry)

Financements: Europe, CNRS,
Jean-Louis Viovy, Institut
Curie e2phy (Villeurbanne)
MRL, ARC, FRM (P.D.), DGA
26-29 Aout 2002)