

Miniaturisation du dépistage et Nanotechnologies

Chantal Fournier-Wirth

R&D-Agents Transmissibles par Transfusion
Site de Montpellier

ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG - PYRENEES MEDITERRANEE

- ✓ **Situation actuelle**
 - Maladies infectieuses
 - Verrous technologiques

- ✓ **Impact des micro/nanotechnologies**
 - Alternatives ?

- ✓ **Conclusions**

La situation actuelle dans le monde

Les maladies infectieuses sont provoquées par des virus, des bactéries, des parasites ou des champignons. Elles sont responsables de **14 millions de décès chaque année, partout dans le monde**. Plus de 90% de ces maladies surviennent dans les pays en développement : l'Organisation Mondiale de la Santé, dans son " Rapport sur la santé dans le monde, 1999 " estimait qu'un milliard de personnes étaient privées de " révolution sanitaire ".

Mais **les pays industrialisés ne sont pas pour autant à l'abri de la menace microbienne**. On observe en effet une nette émergence et ré-émergence des maladies infectieuses dans ces pays : leur incidence dans les pays occidentaux a **augmenté de 10 à 20%** ces quinze dernières années. La coqueluche, par exemple, est en pleine résurgence en France comme aux Etas-Unis.

Les maladies les plus meurtrières

Six groupes de maladies représentent à elles seules 90% des décès par infection dans le monde.

Sida	3,1 millions de décès en 2004
Maladies respiratoires aiguës bactériennes (pneumocoques) et virales (grippe, virus respiratoire syncytial)	3 millions de décès par an
Maladies diarrhéiques (rotavirus, shigellose, <i>Escherichia coli</i> pathogènes, choléra, fièvre typhoïde)	2,5 millions de décès par an
Tuberculose	Près de 2 millions de décès par an et 8 à 80% des cas, selon les pays, liés à l'épidémie de Sida.
Paludisme	Plus d'1 million de décès par an et 300 à 500 millions de cas cliniques annuels
Rougeole	750 000 décès par an, alors qu'il existe un vaccin qui pourrait prévenir cette mortalité...

POURQUOI Y AURA-T-IL TOUJOURS DES MALADIES INFECTIEUSES ?

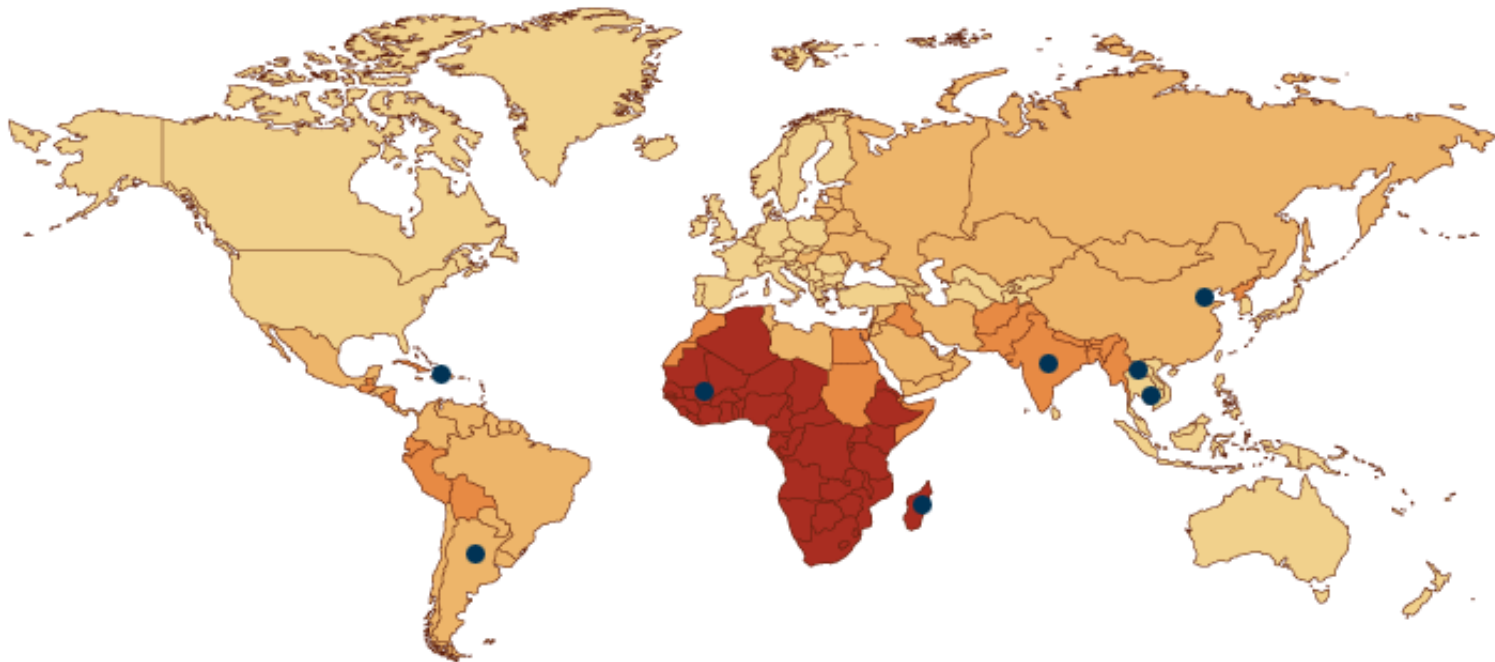
- Les microorganismes nous dépassent de loin en nombre et en plasticité génétique. Les bactéries ont une capacité extraordinaire, par mutation ou par transfert horizontal de gènes, à s'adapter à leur environnement, en particulier animal et humain. Or, plus la population humaine augmente, plus elle donne prise aux microbes pathogènes, les amplifie et les transmet. **Nous ne connaissons d'ailleurs pas même 1% des espèces bactériennes vivant sur notre planète. En fait, à l'échelle de l'évolution, les maladies infectieuses et parasitaires ne font probablement que commencer !**

Il existe toujours une espèce bactérienne adaptée à une situation donnée : *Listeria monocytogenes*, bactérie transmise par l'alimentation, est capable de se multiplier à 4°C, donc dans les réfrigérateurs...

- L'augmentation rapide de la population de la planète, particulièrement dans les pays en développement, maintient une situation alarmante en matière de maladies infectieuses du fait de l'accroissement du réservoir potentiel de pathogènes et de la facilitation de leur transmission par la pauvreté, l'hygiène insuffisante, la malnutrition, la carence en prévention, le mauvais usage des traitements antimicrobiens sélectionnant des résistances aux agents anti-infectieux.
- Les **modifications écologiques** majeures induites dans certaines régions du globe par l'expansion territoriale de l'espèce humaine établissent des conditions, auparavant inexistantes, au cours desquelles l'homme se trouve brutalement au contact d'espèces animales ou de vecteurs lui transmettant des microorganismes (dont ils sont porteurs sains le plus souvent). Rarement, mais de façon dramatique, ces microorganismes peuvent s'avérer particulièrement pathogènes pour l'homme : virus Ebola, VIH, *Borrelia burgdorferi*...
- L'absurdité des comportements humains génératrice de **guerres**, de **famines**, de déplacements massifs de populations avec établissement de **camps de réfugiés à l'hygiène précaire**, est cause d'épidémies dramatiques. En 2004 au Darfour, une épidémie d'hépatite E et une épidémie de shigellose ont sévi dans des camps de déplacés. Les maladies diarrhéiques sont la première cause de mortalité dans les camps, également menacés par des infections respiratoires aiguës, mais aussi par le paludisme (dans les pays du Sud) ou les méningites.
- Enfin, les **voyages**, notamment en **avion**, permettent aux microbes, à travers ceux qui les hébergent, de se déplacer rapidement d'un bout à l'autre de la planète. Le tourisme représente chaque année la plus grande migration de la planète : selon l'Organisation Mondiale du Tourisme, 700 millions de voyages touristiques ont été effectués en 2002. La France est la première destination touristique mondiale, avec 75 millions d'arrivées en 2003.

<http://www.fondation-merieux.org>

Carte des Maladies Infectieuses



Décès dus aux maladies infectieuses et parasitaires, pour 10 000 habitants

■ < 3 (‰) ■ 3-15 (‰) ■ 15-50 (‰) ■ > 50 (‰) ● Présence de la Fondation Mérieux

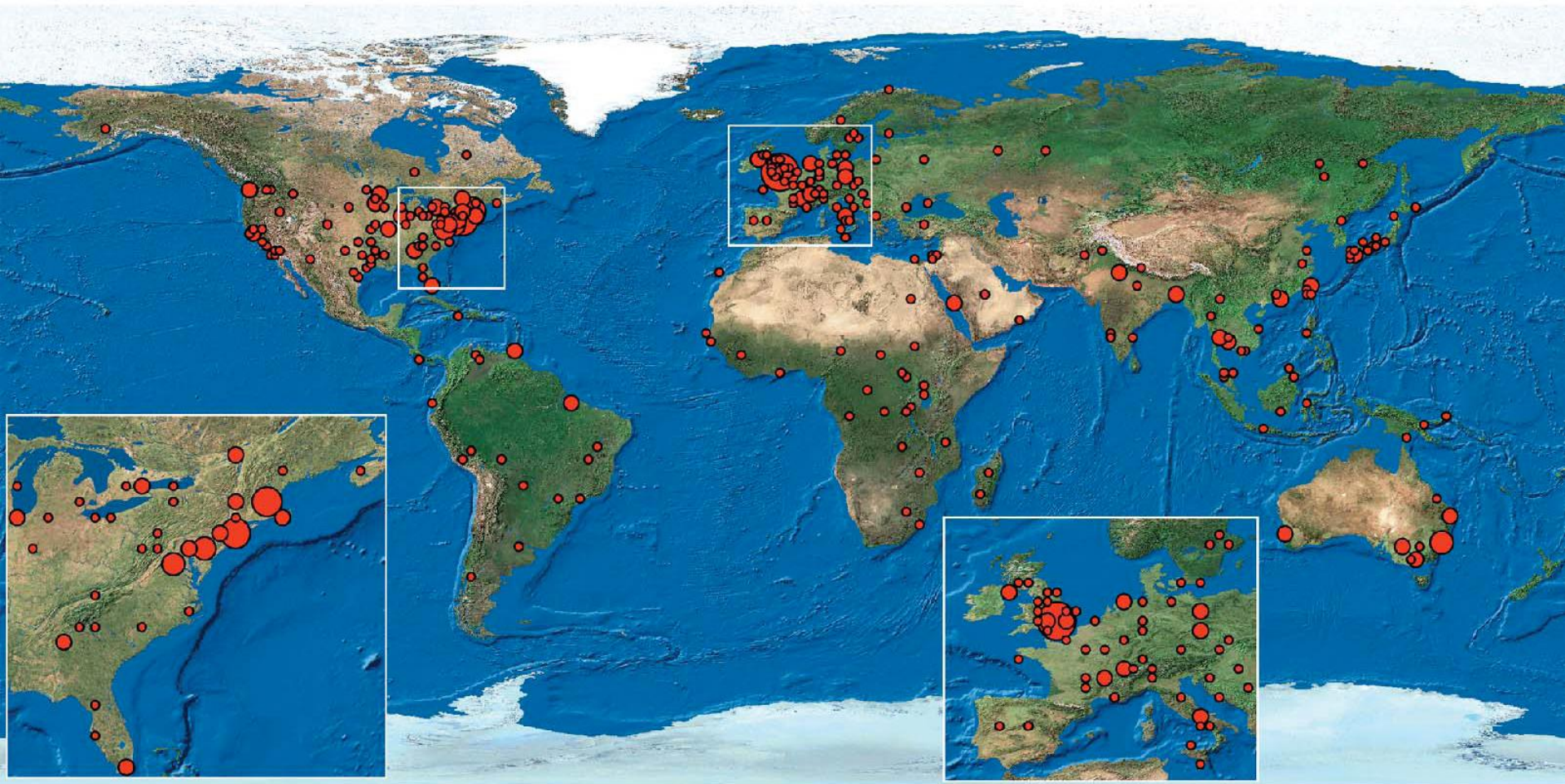
Maladies infectieuses émergentes

Jones K. et al

Global trends in emerging infectious diseases

Nature 2008 (451) : 990-994

Global richness map of the geographic origins of EID events from 1940 to 2004. The map is derived for EID events caused by all pathogen types.



1er janvier 2000

- **Etablissement public placé sous la tutelle du ministère de la Santé**
Opérateur unique de la transfusion sanguine en France
- **Missions :**
 - **assurer la sécurité transfusionnelle et la satisfaction des besoins en PSL**
 - **préparer l'avenir en soutenant des programmes de recherche :**
 - Axes prioritaires :**
 - Le don, la qualité, la gestion des risques**
 - Les composants du sang: caractérisation, prélèvement, préparation**
 - Le risque microbiologique et immunologique (interfaces hôtes-produits)**
 - La médecine transfusionnelle**
 - Les produits de demain: ingénierie cellulaire et tissulaire**
 - Surveillance des innovations technologiques.**
 - technologies miniaturisées ?**

Dépistage des agents transmissibles : pays développés

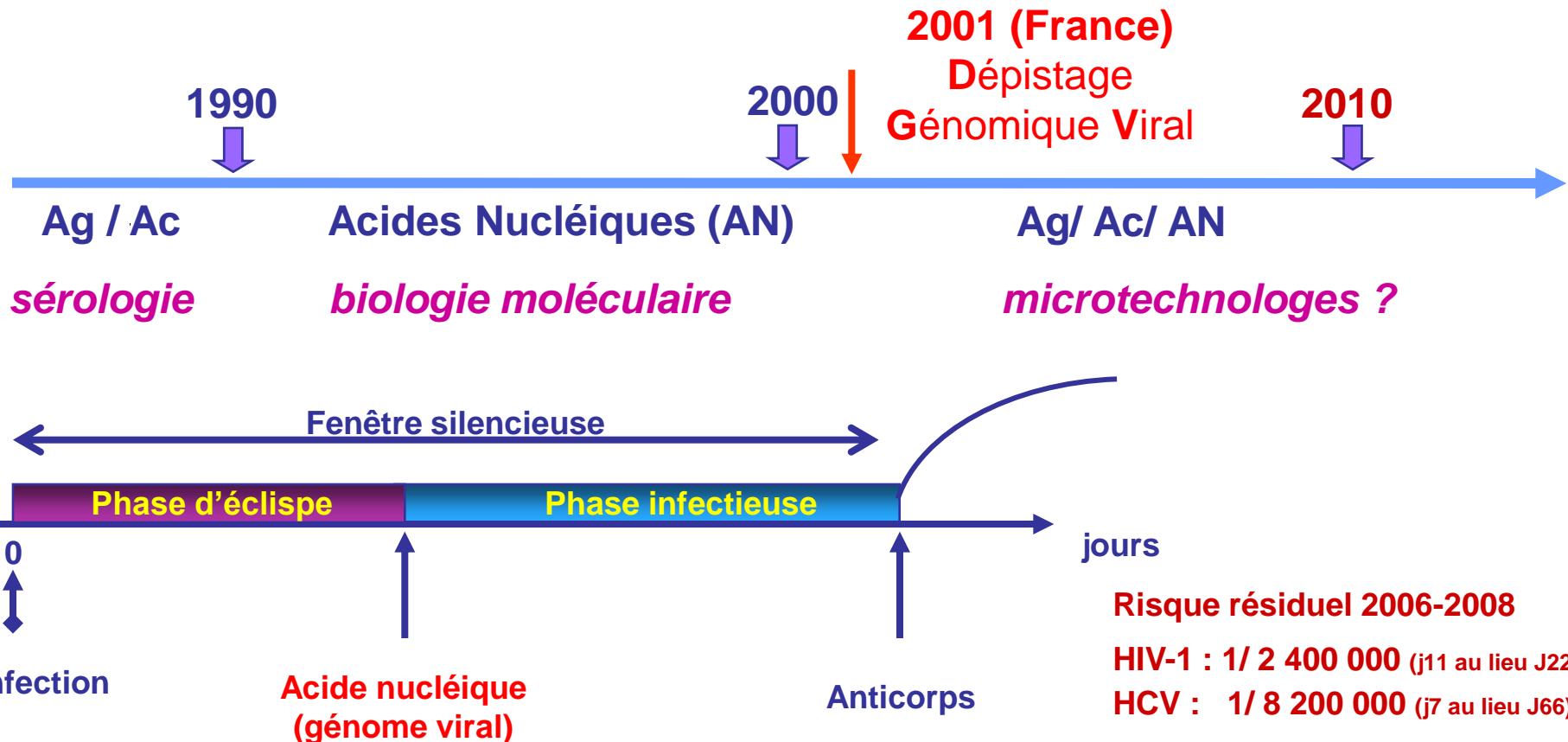
Avancées technologiques

EFS

Fournier-Wirth C, Coste J.

Fitting New Technologies into the Safety Paradigm: use of Microarrays in Transfusion.

Advances in Transfusion Safety vol IV. Developments in Biologicals 2007



DGV : 2^{ème} génération

Chiron Blood Testing : TIGRIS



- Extraction
- Amplification
- Détection

Roche Diagnostics : cobas s201



- **Avantages : Multiplexage 3 agents (HIV, HCV, HBV)**
- **Inconvénients :**
 - **Manque de souplesse**
 - **Durée des essais**
 - **Coût**
 - **Pas de modification majeure de la chaîne**

Coste J.

Residual Risk in Transfusion : a strategic perspective.

In Transfusion Medicine: looking to the future. John Libbey Eurotext Ed, Paris 2006.

- Sécurité transfusionnelle vis-à-vis des ATT : augmenter la flexibilité

→ **faire face à l'émergence de nouveaux risques infectieux :**

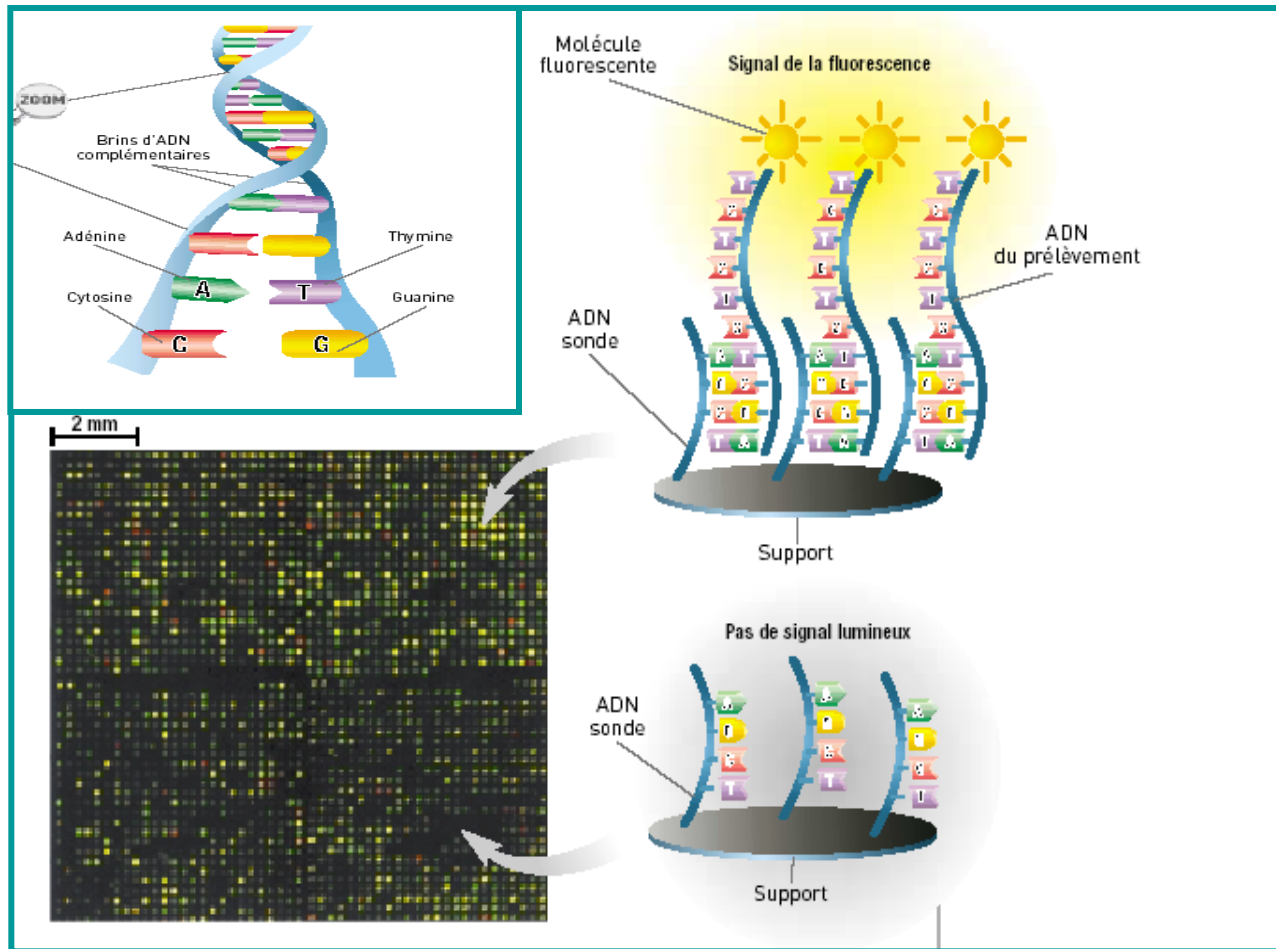
- mutations génomiques de virus connus (HBV, HCV, HIV) à l'origine de variants susceptibles d'échapper au diagnostic
- nouveaux virus (SRAS, H5N1)
- virus ré-émergents (virus West Nile)
- autres : bactéries (Gram+/-), parasites (Plasmodium falciparum, Trypanosoma cruzii)
- protéine pathologique du prion (vCJD).

- Simplifier la QBD

- équipements, technologies,
- acquisition des résultats, libération des produits sanguins labiles.

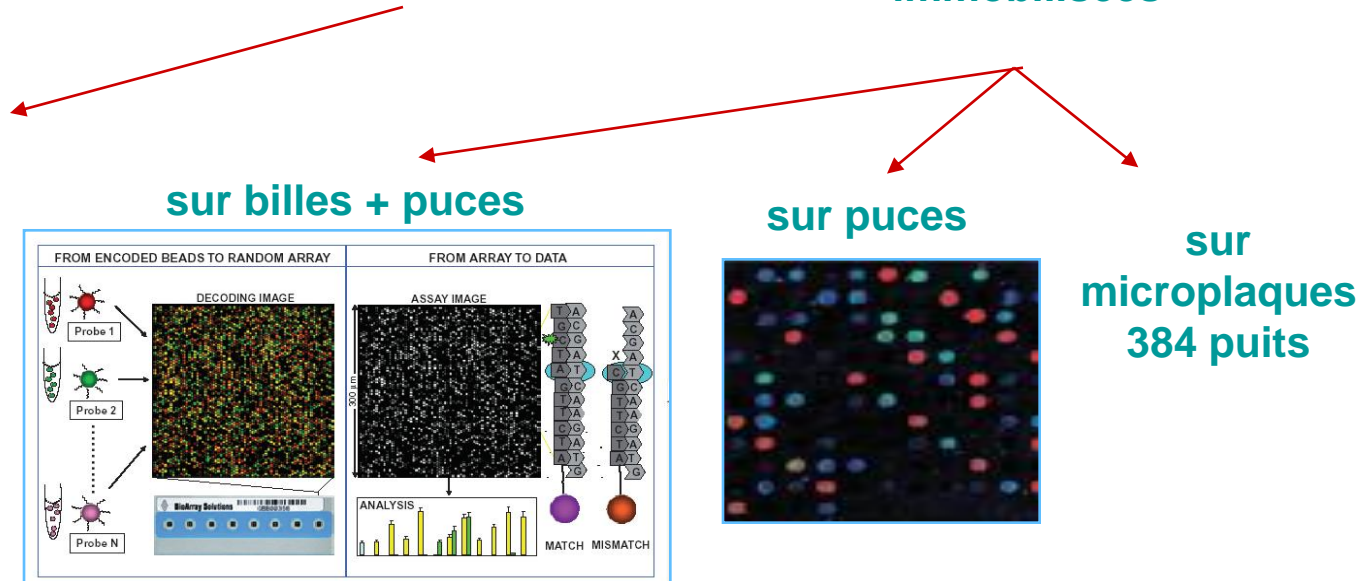
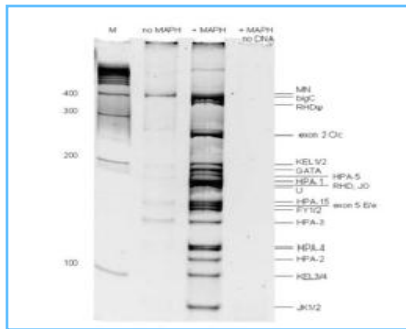
- Diminuer le coût.

Puces à ADN : principe



Puces à ADN : en IH

Concept : ADN génomique → **PCR multiplexe > 12 amplicons** → **Détection optique hybridation sur sondes immobilisées**



A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *G. Hashmi, et al. Transfusion, 2005 ; 45 : 680-688*

Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *S. Beiboer, et al. Transfusion, 2005 ; 45 : 667-679*

New York Blood Center

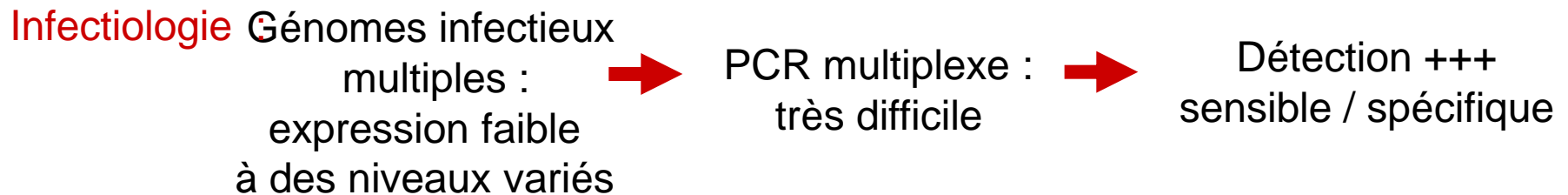
Sanquin Research, Amsterdam

High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *GA Denomme et al. Transfusion, 2005 ; 45 : 660-666*

Canadian Blood services, Toronto

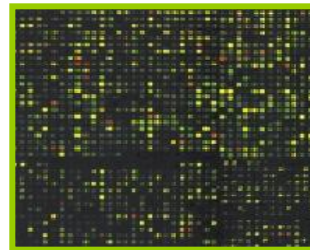
Puces à ADN : en infectiologie

Verrous technologiques supplémentaires



→ Limites des puces de première génération

Puces à ADN
 préparation
 PCR
 détection optique
 contrôle de qualité
 coût



Puces à protéines
 préparation
 stabilité Ag/Agc
 détection optique
 production
 coût

Des puces en transfusion ?

ACTUELLEMENT

- **Immunohématologie :**
 - des plateformes apparaissent : PCR multiplexe + hybridation sur billes ou sur réseaux + détection optique
 - premiers essais sur puces à protéines
- **Infectiologie :**
 - difficultés de la PCR multiplexe pour les pathogènes
 - pas de plateforme décrite / sensibilité /spécificité +++

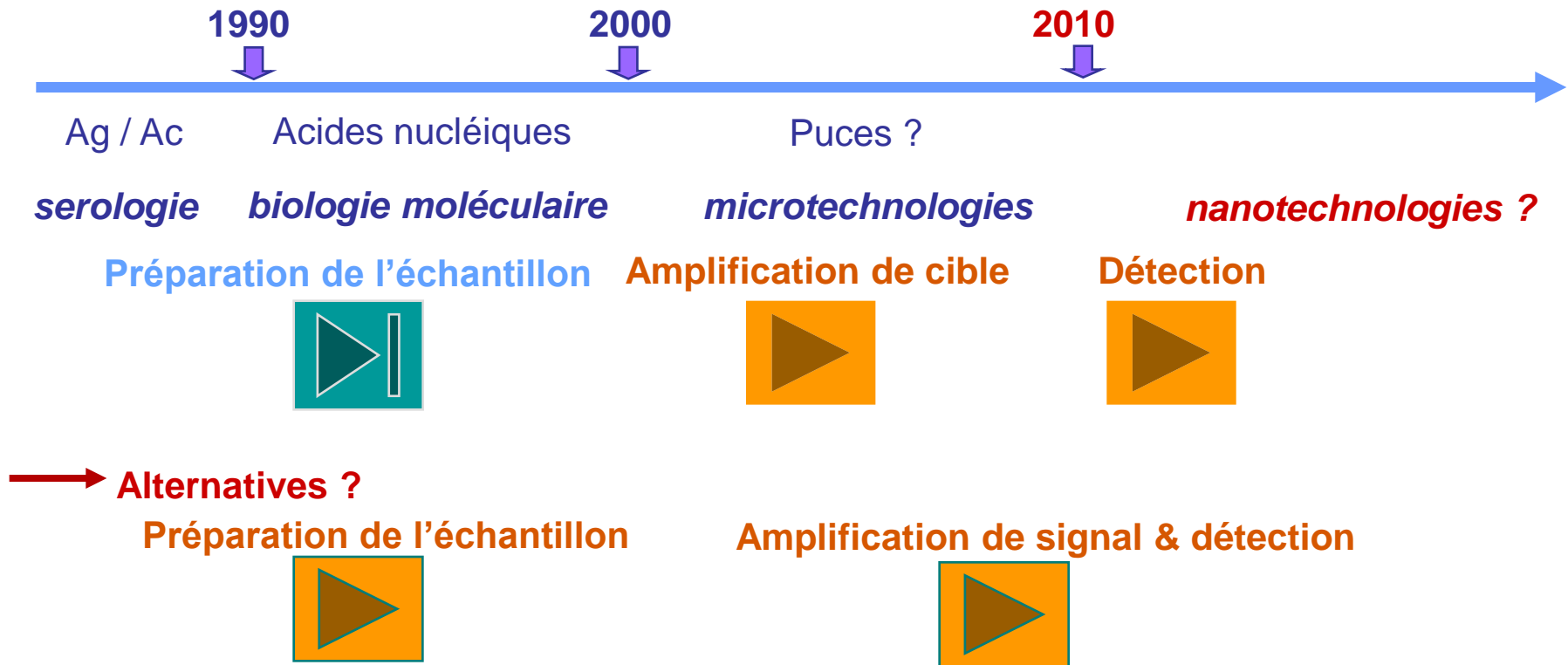
—————→ **Alternatives ?**

Miniaturisation du dépistage

Fournier-Wirth C, Coste J.

Nanotechnologies for pathogen detection : future technologies ?

Biologicals 2010, 38 (1) : 9-13



- ✓ Situation actuelle
 - Maladies infectieuses
 - Verrous technologiques et logistiques

- ✓ **Impact des micro/nanotechnologies**
 - **Alternatives ?**

- ✓ Conclusions

Qu 'est ce que le nanomètre ?

Nanovoyage à l'intérieur du corps humain ...

Cellule tueuse
(lymphocyte T)
>> Guide de Voyage

GUIDE DE VOYAGE

COMPARAISON DE TAILLE

1 m : 10 μm

Ø Terre : Terrain de football

ENTRAÎNEUR DU SYSTÈME DE DÉFENSE IMMUNITAIRE



Les cellules dendritiques (CD) sont des globules blancs, avec des tâches défensives spé-

Chapitre 1/2

ITINÉRAIRE :
PLONGÉE DANS LE CORPS

ÉTAPE :
T-26 EN MISSION SECRÈTE

TAILLE :
0,0000100000000000 m

10 μm
MICROMÈTRES

10⁻⁵



Double hélice d'ADN, image au microscope à balayage électronique

>> Guide de Voyage

GUIDE DE VOYAGE

COMPARAISON DE TAILLE

1 m : 10 nm

☉ Terre : Pamplemousse

GUIDE DE VOYAGE

La structure moléculaire d'ADN a été découverte par P.A. Levene en 1920. Il a prouvé la composition des bases organiques, du sucre et de l'acide phosphorique. La structure spatiale d'ADN a été expliquée en 1953 par Watson et Crick (Prix Nobel de 1962). Les informations génétiques sont codées dans la séquence de paires de base, une certaine section d'ADN est donc nécessaire pour stocker le plan de formation d'une protéine. Ces sections (séquences) sont les gènes ; les êtres humains en possèdent environ 40 000.

◀ ▶ Chapitre 1/1



ITINÉRAIRE :

PLONGÉE DANS LE CORPS

<http://www.cite-sciences.fr>

ÉTAPE :

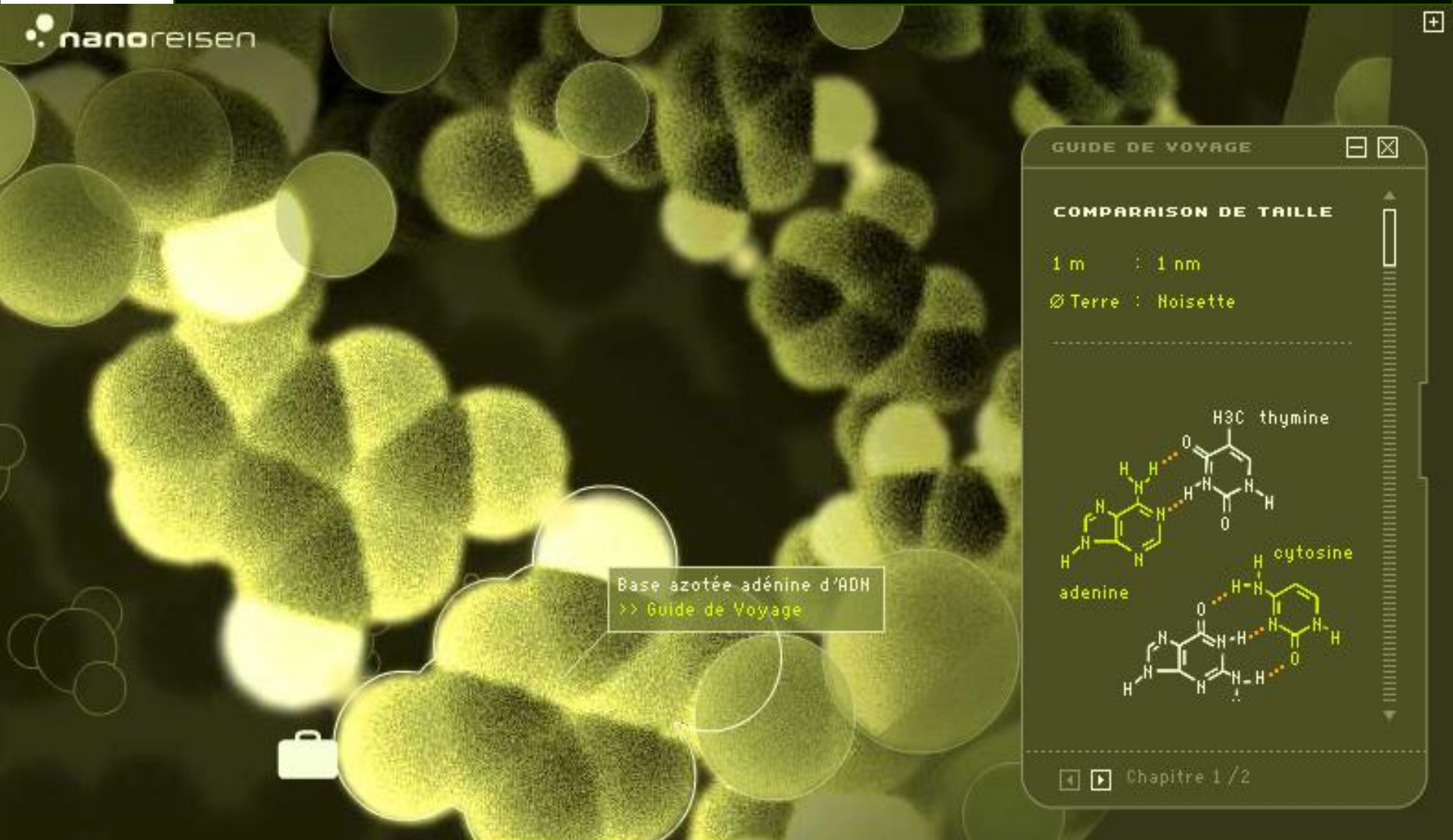
PARC D'ATTRACTIONS
DU MONDE HÉLICOÏDAL

TAILLE :

0,0000000100000000 m

10 nm
NANOMÈTRES

10^{-8}



Base azotée adénine d'ADN
 >> Guide de Voyage

GUIDE DE VOYAGE ☐ ☒

COMPARAISON DE TAILLE

1 m : 1 nm

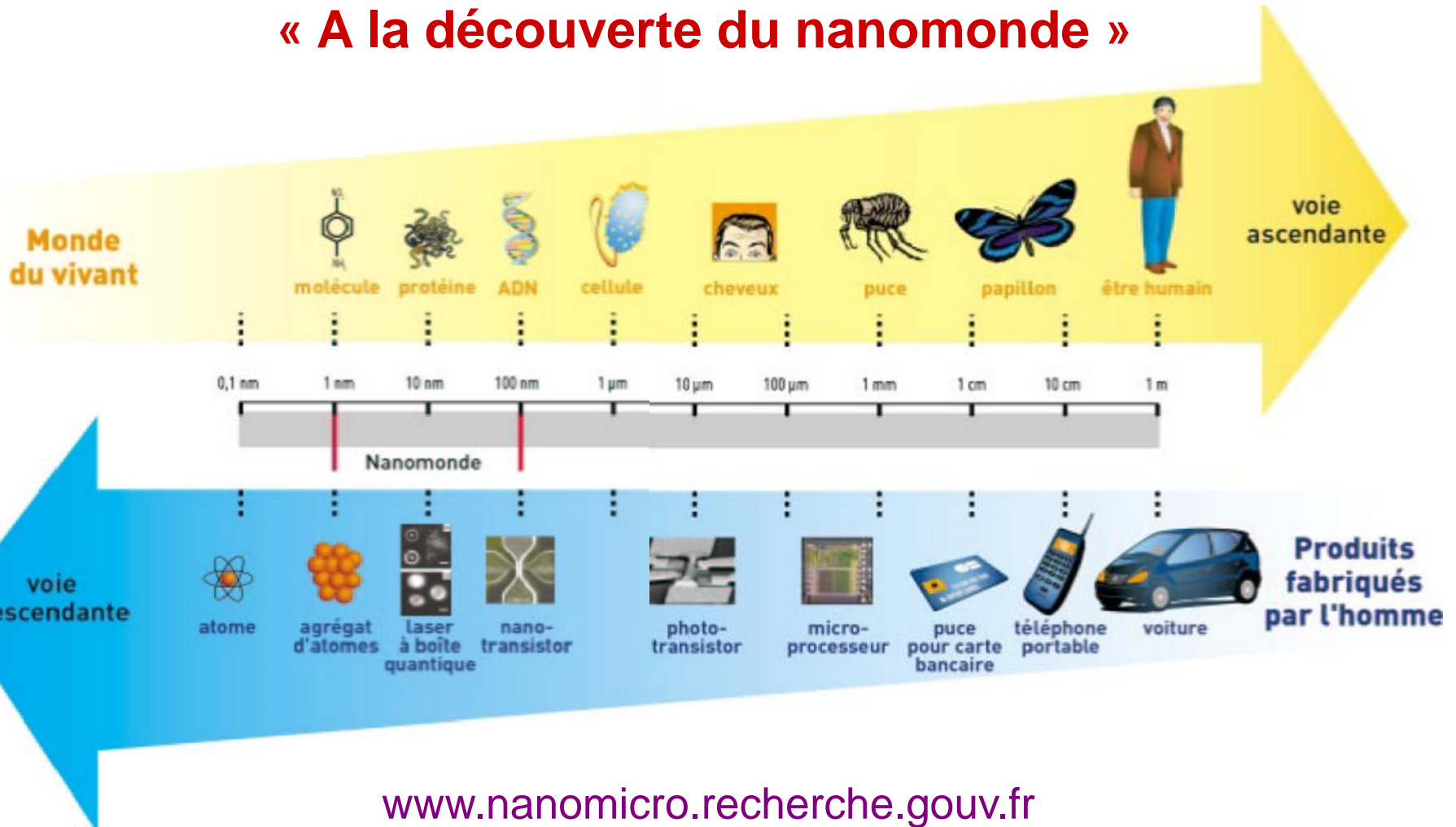
☉ Terre : Noisette

adenine H3C thymine

cytosine

⏪ ⏩ Chapitre 1 / 2

« A la découverte du nanomonde »



« C'est l'ensemble des techniques permettant de fabriquer, d'observer, de mesurer des objets, structures et systèmes dont la taille est de quelques nanomètres (1 et 100 nm) dans au moins une des dimensions de l'espace ».

« C'est aussi le domaine concernant les applications de la nanoscience »

- Nanomedicine en Europe : 3 axes stratégiques

- ✓ nanodiagnostic
- ✓ vectorisation de médicaments
- ✓ médecine régénérative

Vision document



Strategic agenda



➔ <http://cordis.europa.eu/nanotechnology/nanomedicine.htm>

Alternatives ?

Fournier-Wirth C, Coste J.

Nanotechnologies for pathogen detection : future technologies ?

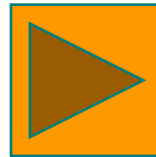
Biologicals 2010, 38 (1) : 9-13

Fournier-Wirth C, Jaffrezic-Renault N and Coste J.

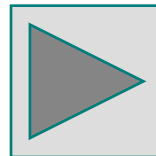
Detection of blood transmissible agents : can screening be miniaturized ?

Transfusion 2010 : in press

Préparation de l'échantillon



Amplification de signal & détection





Prise d'essai (volumes, type d'échantillon)



Concentration (peu de réactifs, + simple, sans centrifugation)

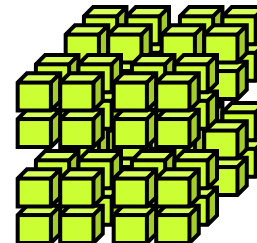
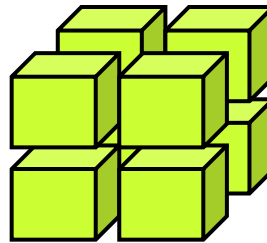
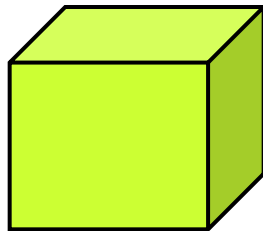


Extraction, séparation, lavages :

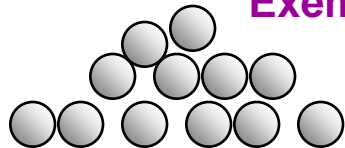
+ homogènes quel que soit l'échantillon
compatibles avec les stratégies de détection)

Nanoparticules / propriétés de surface

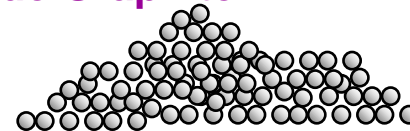
Pour une même quantité de matière, la surface est démultipliée...



Exemple : 1 gramme de Graphite



Grains de 1 mm



Grains de 1 nm

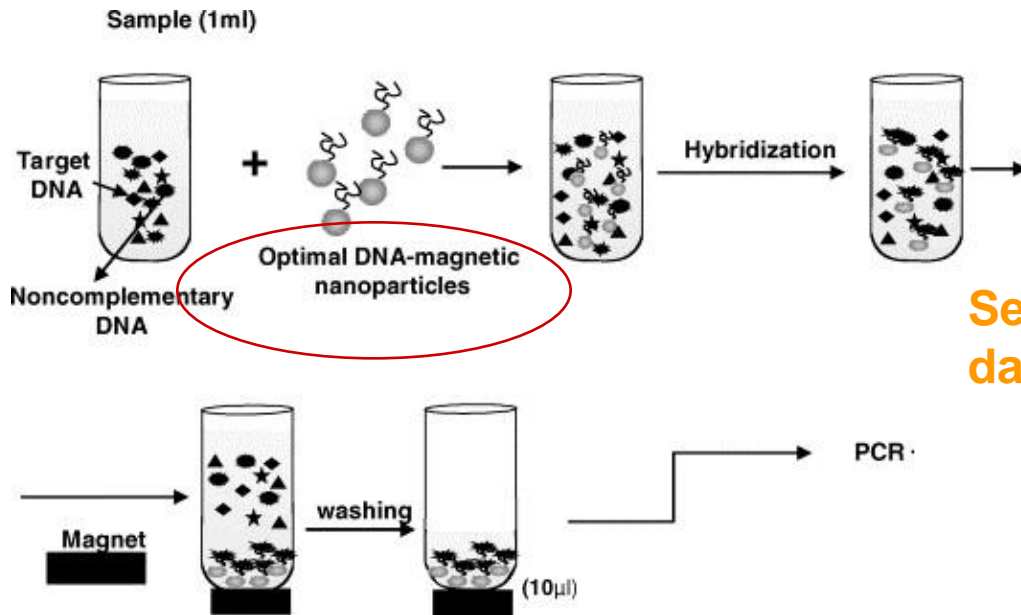
14 cm²



1400 m²



Nanoparticules / concentration & purification



Sensibilité : 2 molécules cDNA HCV dans 1 ml de solution

Fuentes et al.

Detecting minimal traces of DNA using DNA covalently attached to superparamagnetic nanoparticles and direct PCR-ELISA. Biosensors and Bioelectronics 2006 : 1574-1580.

Alternatives ?

Fournier-Wirth C, Coste J.

Nanotechnologies for pathogen detection : future technologies ?

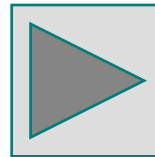
Biologicals 2010, 38 (1) : 9-13

Fournier-Wirth C, Jaffrezic-Renault N and Coste J.

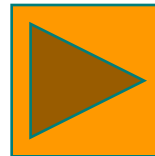
Detection of blood transmissible agents : can screening be miniaturized ?.

Transfusion 2010 : in press

Préparation de l'échantillon



Amplification de signal & détection



Amplification de signal : micro et nanoparticules

- nanocristaux fluorescents
- particules d'or
- biocodes-barres

Biocapteurs

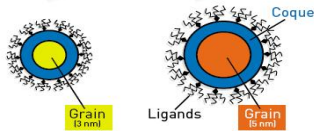
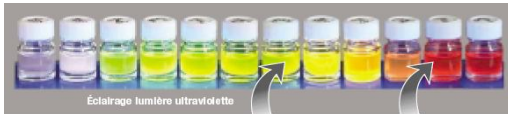
Microfluidique et systèmes intégrés

Nanoparticules / amplification de signal

1. Nanocristaux fluorescents

-Quantum Dots :
-noyau
-coque (ligands)

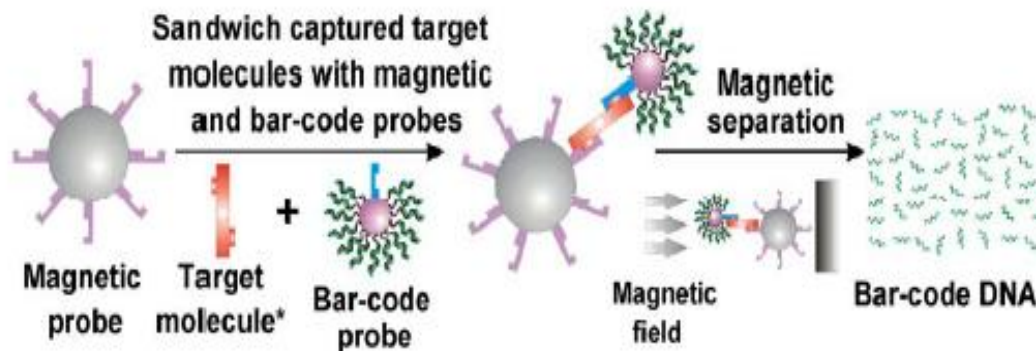
-Fluorophores stables et très lumineux :
- spectre d'excitation large
- spectre d'émission étroit (taille/nature du noyau)



www.nanomicro.recherche.gouv.fr

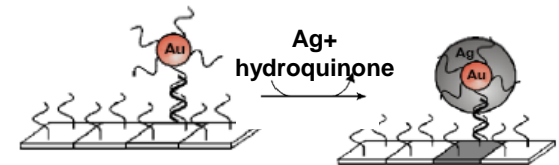
→ Diagnostic multiplexe : « spectral bar-coding »

3. Biocode-barres



From Thaxton et al, Clin Chim Acta 2006

2. Nanoparticules d'or



From Taton et al, Science 2000

→ Détection scanométrique

• PROTEINES : 10^{-18} M
Nam JM et al. Science 2003

• ADN : 10^{-21} M
Nam JM et al.
J. Am Chem Soc. 2002 & 2004

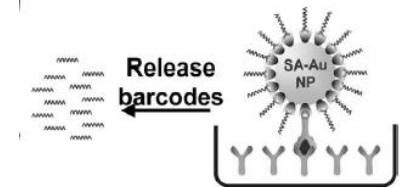
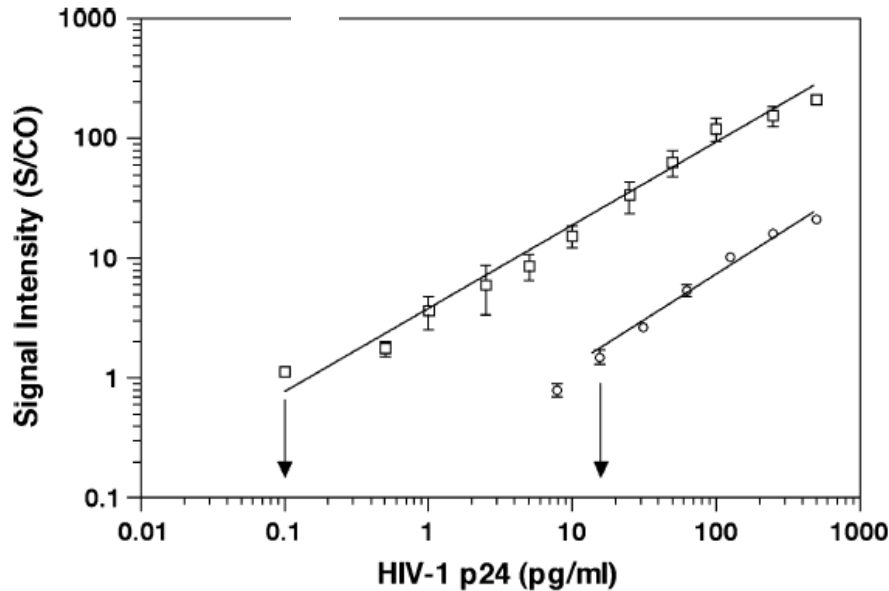
Nanoparticules / amplification de signal

S. Tang., et al.

Nanoparticle-based barcode amplification assay (BCA) for sensitive and early detection of HIV type 1 capsid (p24) antigen

J. Acquir. Immun. Defic. Syndr. 2007 : 231-237 .

Modèle : HIV 1 p24 Ag



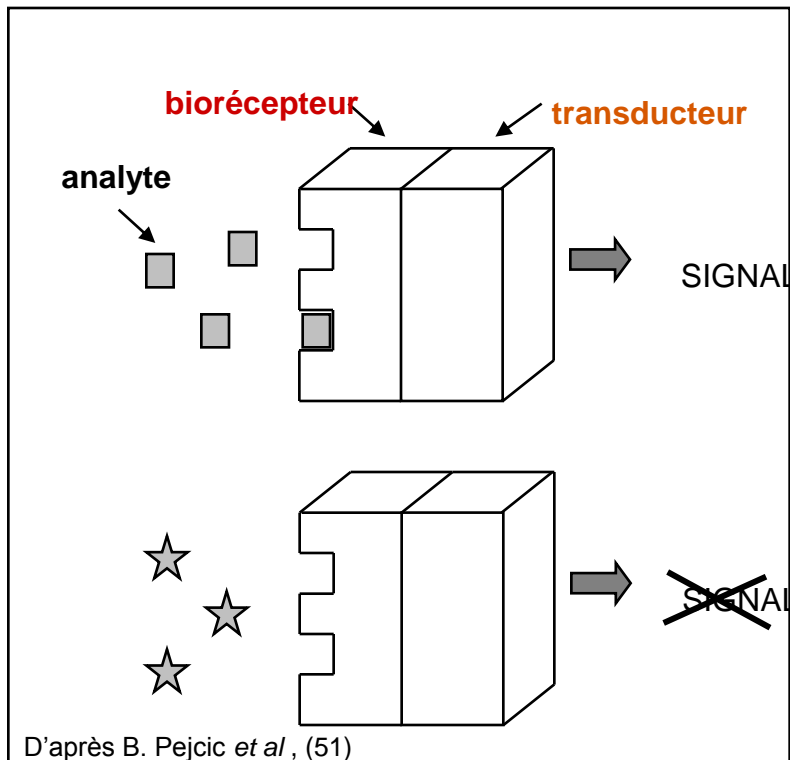
- détection : 0.1-500 pg/ml
- sensibilité : x150 / ELISA
- séroconversion : - 3 jours / ELISA

Biocapteurs et détection des agents transmissibles

Fournier-Wirth C, Coste J.

Nanotechnologies for pathogen detection : future technologies ?

Biologicals 2010, 38 (1) : 9-13



- Biorécepteur :

ADN

Ag

Ac

Enzyme

Récepteur ...

- Transducteur:

Optique

Électrochimique

Massique

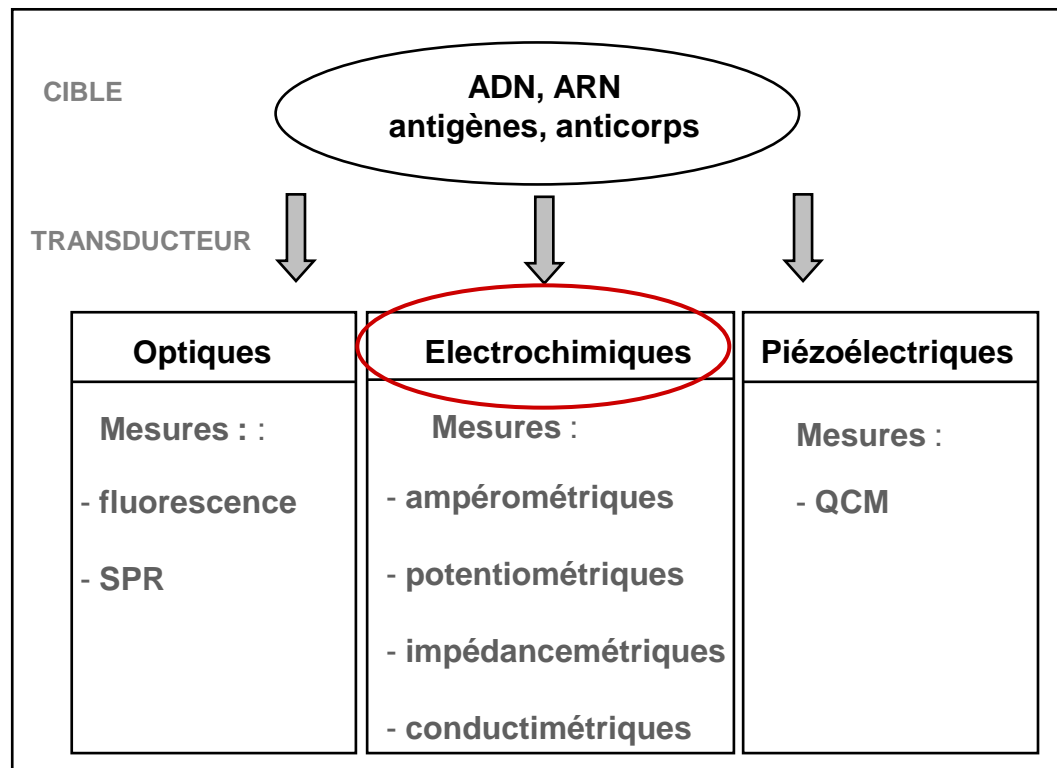
Magnétique

Biocapteurs et détection des agents transmissibles

Fournier-Wirth C, Coste J.

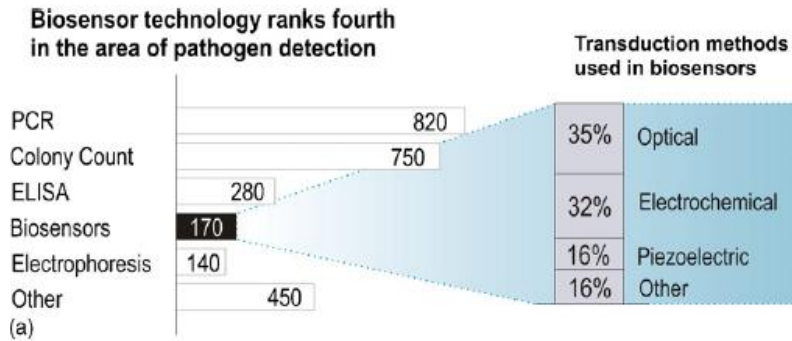
Nanotechnologies for pathogen detection : future technologies ?

Biologicals 2010, 38 (1) : 9-13



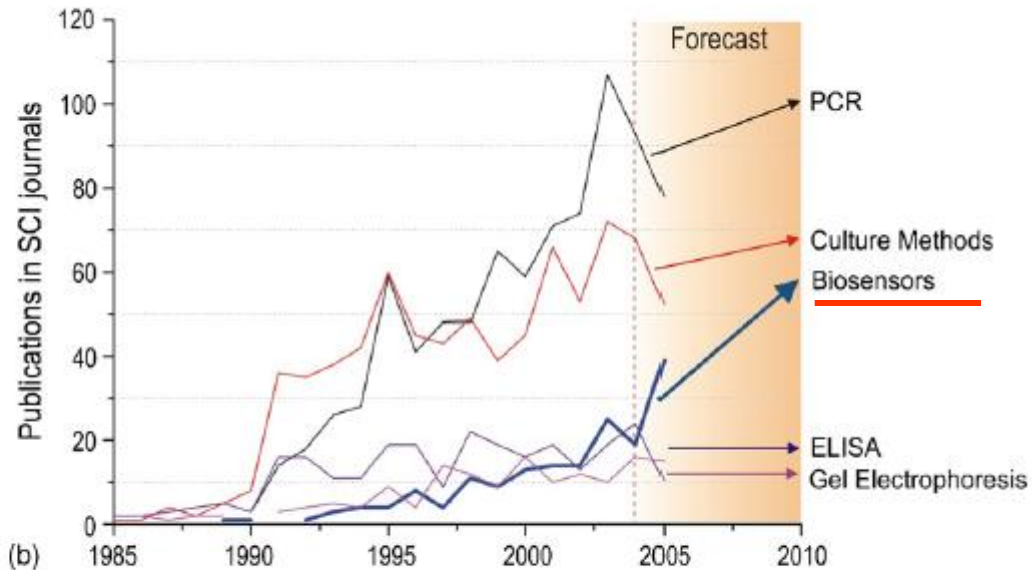
Biocapteurs

Lazcka O. Pathogen detection :A perspective of traditional methods and biosensors.
Biosensors and Bioelectronics 2007 : 1205-1217.



Source: ISI Web of Science, ca. 2500 articles found on pathogen detection over the last 20 years.

Biosensors is the fastest growing technology for pathogen detection



Source: ISI Web of Science, ca. 2500 articles found on pathogen detection over the last 20 years.

Fig. 2. (a) Approximate number of articles using different techniques to detect and/or identify pathogenic bacteria.

Biocapteurs électrochimiques

Collaboration : UMR CNRS 5180 (N. Jaffrezic-Renault)

Univ. C. Bernard, Laboratoire des Sciences Analytiques, Lyon

- **Avantages :**

- non affectées par la turbidité des échantillons
- appareils simples et miniaturisables
- détection sans marquage et en temps réel

Immunocapteurs électrochimiques

EFS R&D-ATT

Maalouf R., Fournier-Wirth C., Coste J., Chebib A., Saikali J., Errachid A., Cloarec J-P., Martelet C. and Jaffrezic-Renault N,
Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy : comparison to surface plasmon resonance.

Analytical Chemistry, 2007, 79 : 4879-4886.

Maalouf R., Hassen W.M., Fournier-Wirth C., Coste J., and Jaffrezic-Renault.

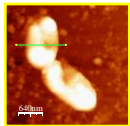
Comparison of functionalized beads based on biosensor for bacteria detection to the self-assembled multilayer system.

Microchimica Acta 2008, 157-163.

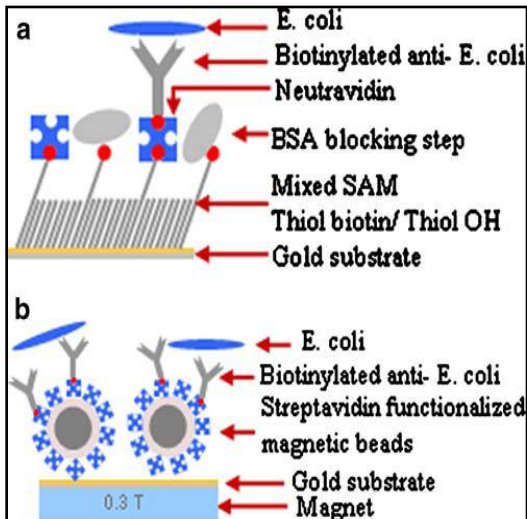
Hnaiein, M., Hassen M, Abdelghani A., Fournier-Wirth C, Coste J., Bessueille F., Leonard D., and Jaffrezic-Renault N.

A conductimetric immunosensor based on functionalized magnetite nanoparticles for *E coli* detection.

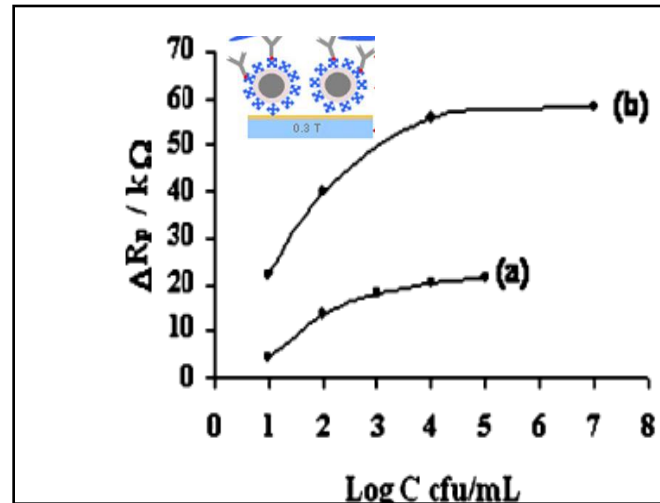
Electrochemistry Communications 2008 : 1152-1154.



AFM



Impédance : 10 CFU/ml / *E coli*



Conductimétrie : 1 CFU/ml / *E coli*

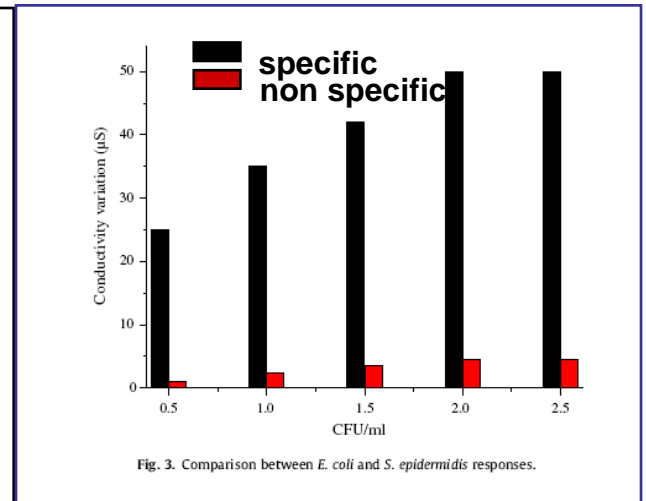


Fig. 3. Comparison between *E. coli* and *S. epidermidis* responses.

Biocapteurs électrochimiques perspectives

EFS R&D-ATT

- Preuves de concepts acquises sur modèle bactérien
- Nouveaux projets (financés)

-Projet « VirProbe » : génotypage rapide des souches VHC

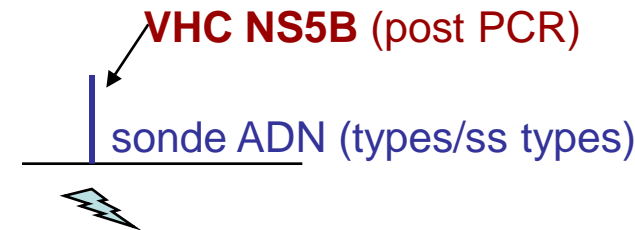
Collaboration :

C. Chaix (CNRS 5180 Université Claude Bernard Lyon)

F. Morvan & J.J. Vasseur (CNRS 5247 Université Montpellier I-II)

C. Fournier Wirth & J. Coste (EFS PM), JF Cantaloube (EFS AM)

Appel d'offres : ANR 2009 (labellisé Eurobiomed et Lyonbiopôle)



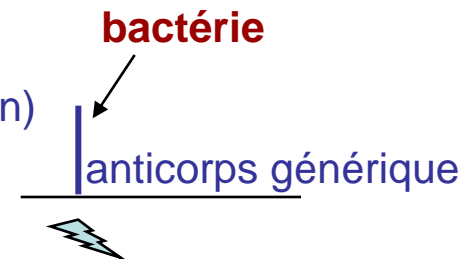
-Projet « RapidBACT » : contrôle bactérien rapide de produits cellulaires à visée thérapeutique par un microsystème de détection générique

Collaboration :

C. Fournier Wirth & J. Coste (EFS PM),

N. Jaffrezic-Renault (CNRS 5180, Université Claude Bernard Lyon)

Appel d'offres : EFS 2010



Biocapteurs électrochimiques perspectives

EFS R&D-ATT

Projet ANR

Projet interdisciplinaire appel d'offre PiriBio 2009 / 575 354 €

« VirProbe »

Projet labellisé par les pôles de compétitivité Eurobiomed et Lyonbiopole

Conception d'un **microsystème** basé sur des **sondes électrochimiques ultra-sensibles** pour une **multidétection sans marquage** d'acides nucléiques : application au **génotypage du VHC**




Originalité du projet : mode de détection directe très sensible

Applications : génotypage rapide avant traitement, veille épidémiologique

EFS Agents Transmissibles
Design et tests des sondes (ELOSA, biocapteur)
Cibles synth./ Amplicons VHC

Design



Part. 3 : C. Fournier Wirth & J. Coste (EFS PM),
 JF Cantaloube (EFS AM/

« VirProbe » :

CNRS chimie

Synthèse des sondes électrochimiques

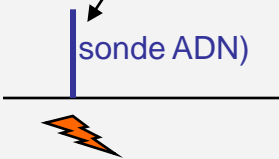


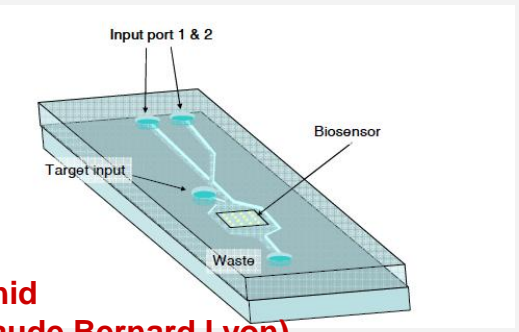
Part. 2 : F. Morvan & J.J. Vasseur
 (CNRS 5247 Université Montpellier I-II)

CNRS physique

Mesures électrochimiques, conception microsysteme

VHC NS5B (post PCR)



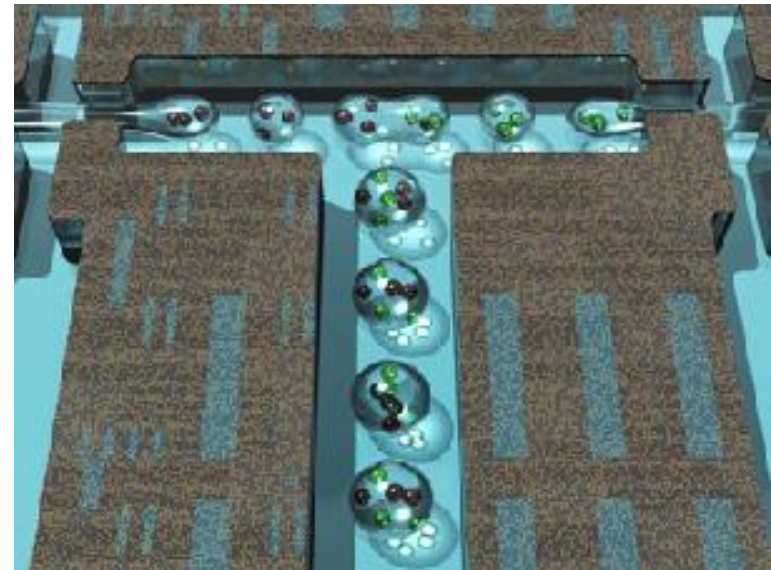
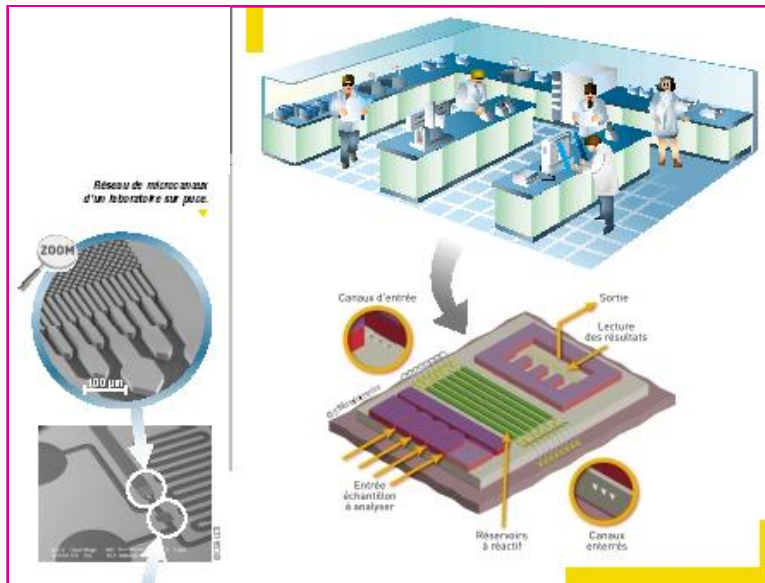


Part. 1 : C. Chaix, A. Errachid
 (CNRS 5180 Université Claude Bernard Lyon)

Systèmes microfluidiques / « Lab on chip »

Préparation/ extraction
 Amplification (cible ou signal)
 Détection

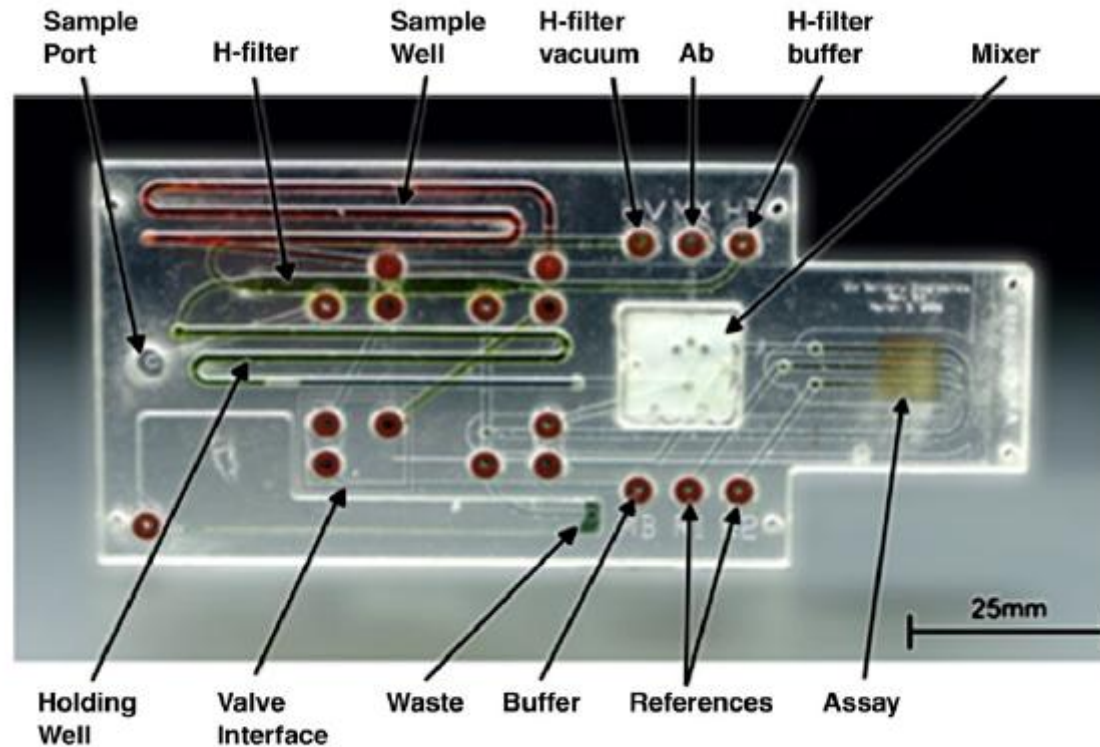
en réseaux



www.raindancetechnologies.com

Systemes microfluidiques / « Lab on chip »

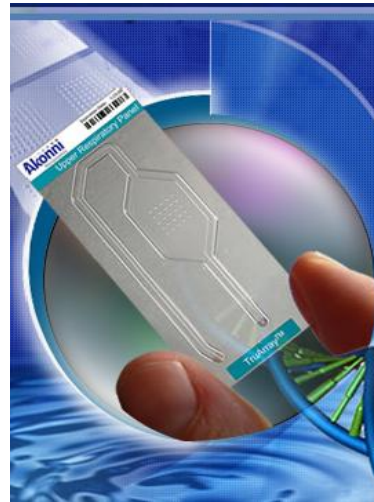
Yager P. *Microfluidic diagnostic technologies for global public health.*
Nature 2006 : 412-418



Systemes microfluidiques



www.vereduslabs.com



www.akonni.com

PCR + microarray



→ L'intégration de l'étape de préparation de l'échantillon est très difficile

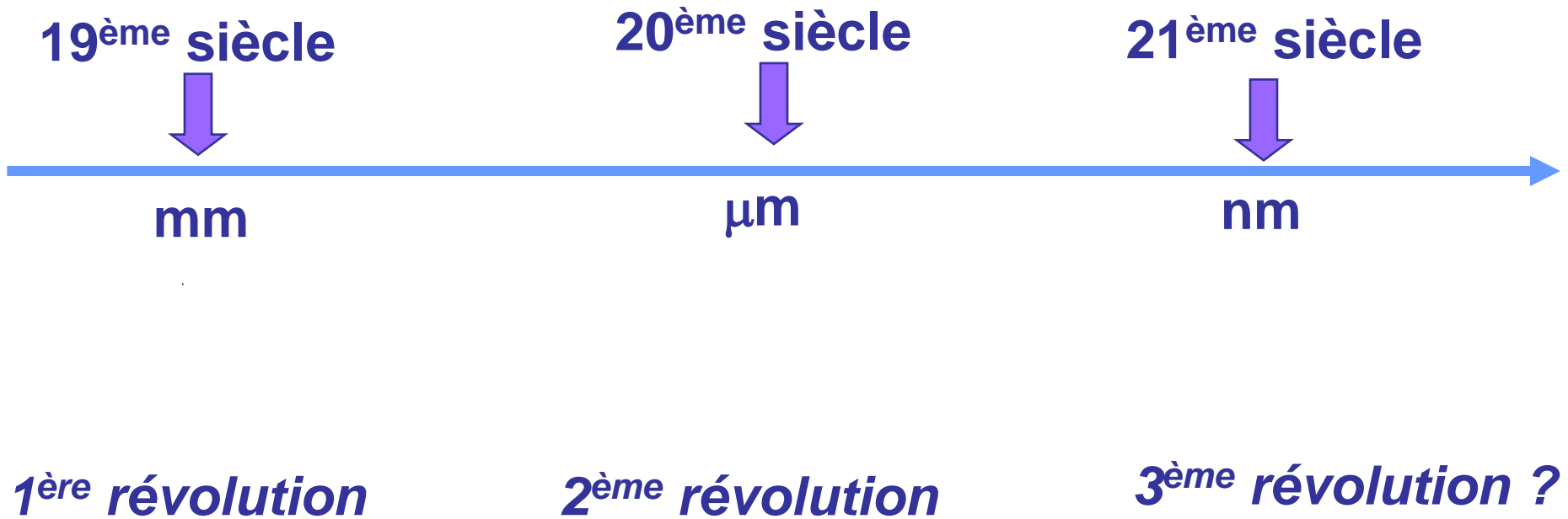
Yager et al. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature* 2006 : 412-418.

- ✓ Situation actuelle
 - Maladies infectieuses
 - Verrous technologiques

- ✓ Impact des micro/nanotechnologies
 - Alternatives ?

- ✓ **Conclusions**

Prochaine révolution industrielle ?



Futures technologies ?

- Objectifs :

- ✓ flexibilité / émergence de nouveaux risques infectieux
- ✓ sensibilité / spécificité
- ✓ tests rapides et économiques

Finalemment

- Première génération de puces (Microarrays) :

- ✓ diagnostic : impact plus limité que prévu

- Seconde génération de systèmes miniaturisés (Micro/Nanoarrays)

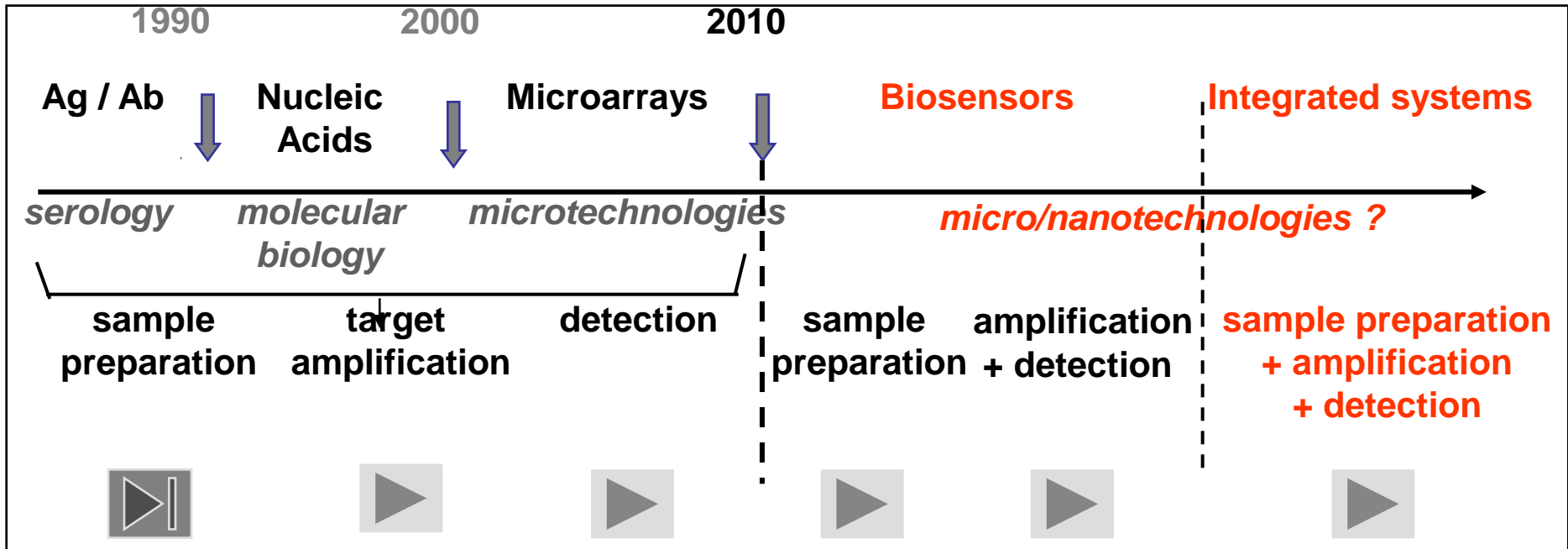
- ✓ démonstration de l'utilité en diagnostic +++ (> ELISA / PCR)

Dépistage des agents transmissibles

Fournier-Wirth C, Coste J.

Nanotechnologies for pathogen detection : future technologies ?

Biologicals 2010, 38 (1) : 9-13



Seconde génération de systèmes miniaturisés

Fournier-Wirth C, Jaffrezic-Renault N and Coste J.

Detection of blood transmissible agents : can screening be miniaturized ?.

Transfusion sept 2010 : 50, 2032-2045

