



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

C. R. Physique 5 (2004) 565–575



Microfluidics/Microfluidique

Microfluidique et applications biologiques : enjeux et tendances

Nicolas Minc, Jean-Louis Viovy*

Institut Curie, UMR 168, 11, rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

Disponible sur Internet le 28 mai 2004

Présenté par Guy Laval

Résumé

Les systèmes d'analyse biologique fondés sur la microfluidique, encore appelés « laboratoires sur puces » ou « microsystèmes d'analyse totale », sont encore peu répandus mais constituent un domaine de recherche extrêmement actif. Ces systèmes devraient en effet permettre de développer dans un délai relativement bref à la fois des systèmes d'analyse à très haut débit peu coûteux et puissants pour accompagner la « révolution génomique », et des systèmes simples d'usage pour appliquer les progrès rapides de la génomique et de la biologie moléculaire dans les domaines de la santé et des biotechnologies. Dans cette revue, on présentera dans un premier temps le contexte biologique et médical dans lequel s'inscrit cette nouvelle thématique de recherche, puis on donnera quelques exemples de problématiques et de systèmes illustrant les tendances actuelles. **Pour citer cet article :** *N. Minc, J.-L. Viovy, C. R. Physique 5 (2004).*

© 2004 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Microfluidics and biological applications: the stakes and trends. Bioanalytical systems based on microfluidics, also called “lab-on-chips” or “micro Total Analysis Systems (microTAS), are still not very common, but they represent a very challenging and fast-developing area of research. They bear the promise of developing in the near future low cost, powerful and high throughput systems for biological and medical research, in strong synergy with the genomic revolution. They should also provide the basis for simple, low cost and user friendly ‘point of care’ devices, to help the application of the rapid progress of molecular biology and genomics in the fields of diagnosis and biotechnology. In the present review, we recall the biological and medical context in which this research takes place, and we provide a few examples of present challenges and trends, and of devices and technologies presently under development. **To cite this article :** *N. Minc, J.-L. Viovy, C. R. Physique 5 (2004).*

© 2004 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : Microfluidique ; Laboratoires sur puces

Keywords: Microfluidics; Lab-on-chips

1. Introduction

Les sciences de la vie subissent depuis quelques années une révolution profonde, liée au développement d'approches globales telles que la génomique et la protéomique. En effet, la connaissance complète et simultanée de l'ensemble des gènes de nombreuses espèces soulève l'espoir d'étudier la réponse de l'ensemble ou d'un sous ensemble important de ceux-ci à un stimulus, ou encore d'effectuer des corrélations approfondies entre l'expression des gènes et tel ou tel état pathologique. Les études développées en ce sens ces dernières années, en particulier grâce aux « puces à acides nucléiques », commencent

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : jean-louis.viovy@curie.fr (J.-L. Viovy).

en particulier à révéler une complexité des réseaux de signalisation et d'interrelation des processus métaboliques beaucoup plus importante que ce que suggéraient les études antérieures. On assiste ainsi à l'émergence d'une nouvelle façon de faire de la biologie, qui constituera sans doute une mutation aussi profonde que le fut la biologie moléculaire, sans bien sûr la remplacer. Après la biologie moléculaire, qui nous amenait toujours plus près des mécanismes élémentaires du vivant, c'est donc un mouvement inverse et complémentaire vers une biologie cellulaire extrêmement globale et systémique que proposent la génomique et la protéomique. Cette nouvelle approche est directement dépendante du progrès technologique en biochimie analytique, dans la mesure où elle implique une augmentation dans le nombre de critères impliqués dans une expérience qui se mesure en puissances de 10. Pour fixer les idées, le génome humain est évalué actuellement à environ 30 000 gènes, et compte tenu des modifications post-translacionnelles, le nombre de protéines potentiellement exprimables dans une cellule est de plusieurs centaines de milliers. Pour aborder des projets de génomique ou de protéomique, il faut donc être capable de travailler simultanément sur des milliers ou des dizaines de milliers de critères, dans un temps, à un coût et avec une quantité d'échantillon comparables et si possible inférieurs à ceux correspondant dans la génération précédente à une dizaine de critères. Ainsi, génomique et protéomique ont dès leurs débuts constitué un stimulant majeur pour les bioanalyses, et le sort de ces domaines de recherche est intimement lié. Par exemple, c'est grâce au développement des séquenceurs multicapillaires que le génome humain a été séquencé en temps très inférieur aux prévisions initiales, et c'est celui des « puces à ADN » qui a ouvert la voie à de nombreux projets actuels de biologie ou de pharmacogénomique. Malgré ces progrès, il subsiste un large fossé entre ce qui est aujourd'hui possible et les outils dont biologistes, médecins et pharmaciens souhaiteraient disposer. Un des problèmes actuels est que certaines étapes du processus d'analyse ont été considérablement parallélisées par des outils comme les « puces à ADN », mais d'autres, concernant en particulier la préparation d'échantillons en « amont », restent dépendantes de techniques lourdes et macroscopiques comme la centrifugation, et de robots macroscopiques encombrants, délicats et coûteux. Les « laboratoires sur puces » (« *lab on chips* ») à base de microfluidique constituent actuellement la direction de recherche la plus prometteuse pour résoudre ce problème. Ces systèmes, appelés également « microsystèmes d'analyse totale » (*micro total analysis system, microTAS*) cherchent, tout comme l'ont fait les circuits intégrés pour l'électronique, à intégrer sur un support de dimensions réduites (typiquement d'une taille comprise entre celle d'une lame de microscope et d'un CD) une multitude de processus tout en permettant un haut débit d'analyse ainsi qu'un haut niveau d'automatisation. En traitant des échantillons à l'échelle du nanolitre dans des canaux de dimension micrométrique voire nanométrique, la technologie microfluidique permet une nette amélioration en termes de vitesse et de sensibilité de l'analyse, et dans le même temps une large réduction de l'encombrement et du coût. Ces quelques arguments expliquent l'essor qu'a connu au cours des dernières années ce nouveau domaine des sciences technologiques, dont les applications touchent autant la physique que la chimie et la biologie.

Sur le plan scientifique et technique, les laboratoires sur puces posent encore un grand nombre de questions, et constituent un terrain d'exercice particulièrement fertile pour l'imagination. Depuis les premières puces de Manz [1] et de Harrison [2] au début des années 1990, un grand nombre de nouvelles petites sociétés se sont développées en particulier aux États-Unis, et des partenariats se développent à la fois avec les « majors », de l'instrumentation analytique et certains grands noms de la microélectronique tels que Motorola ou Hitachi. Quelques journaux (*Lab on a chip*, *Analytical chemistry*, *Sensors & actuators*, *Electrophoresis*, ...) et conférences (*μTAS*, *Transducers*, *HPCE*, ...) se sont positionnés en spécialistes dans la matière, et quelques ouvrages commencent à apparaître [3–5]. Reyes et al. présentent dans une revue récente [6] un large historique de la microfluidique et de ses applications.

Néanmoins, l'avancée dans les différents domaines de la microfluidique reste encore assez hétérogène. Les premiers dispositifs proposés commercialement ou dans les laboratoires n'accomplissent en général qu'une opération standard à la fois, qu'elle soit d'intérêt biologique, chimique ou même physique. Il existe ainsi plusieurs prototypes de dispositifs microfluidique de PCR (polymerase chain reaction), d'analyse immunologique ou d'électrophorèse. De nombreuses « briques technologiques » concernant différents enjeux de l'analyse et de la manipulation microfluidique, tels que la microfabrication et le prototypage rapide [7–9], les mélangeurs (diffusif, chaotique, ...), les pompes, les valves et bien d'autres encore sont développées dans les laboratoires de recherche. Des recherches portent également sur des dispositifs comportant un nombre de fonctionnalités limitées, mais s'intéressant à diversifier les problématiques et les objets d'études, en particulier en direction de l'analyse protéomique, et de la culture ou de l'analyse cellulaire. Quelques revues peuvent être trouvées par exemple dans [10–18]. L'ambition des laboratoires sur puces, cependant, ne s'arrête pas à ces dispositifs relativement simples, et d'autres études ont pour vocation d'intégrer en un système unique soit un nombre de fonctions plus élevé, soit un débit important d'analyses en parallèle, soit une combinaison de ces deux progrès. L'effort technologique à fournir pour ce dernier type d'applications est bien sûr important. Partant ainsi d'un simple dispositif de « *preuve de concept* » un travail technologique pour améliorer reproductibilité, compatibilité des surfaces, miniaturisation, sensibilité, ou encore rapidité est nécessaire pour obtenir un dispositif mature. Différents « composants microfluidiques » devront en particulier être intégrés et adaptés afin de fonctionner de façon compatible et coordonnée, pour constituer *in fine* un véritable microsystème d'analyse totale. La Section 2 de la présente revue est consacrée à la description de quelques dispositifs originaux développés dans le domaine des applications biologiques en microfluidique. La Section 3 présentera deux exemples de systèmes de biopuces intégrées.

2. Quelques dispositifs microfluidiques pour les analyses biologiques

2.1. Analyses immunologiques, Tests microELISA

Les analyses immunologiques (*immunoassays*), sont une des méthodes analytiques les plus employées pour le diagnostic clinique (détection d'un virus, d'une infection), les sciences médicales et la biochimie en général. Leur haute sensibilité et leur degré élevé de sélectivité en font une technique de choix pour la détection de protéines rares. La miniaturisation de ce genre de systèmes a permis une réduction en temps remarquable (de plusieurs jours à quelques dizaines de minutes), et la possibilité d'introduire des échantillons de très faibles volumes.

Le test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) est un test type utilisé pour le dépistage de l'infection par de nombreux virus (hépatite, VIH, SRAS, etc.), de certains cancers, et plus généralement de réactions immunitaires. Pour doser un échantillon d'antigène (protéine, enzyme, cellule, ...), on commence par greffer sur une surface des anticorps correspondants en excès. Après avoir bloqué les sites d'adhésion non spécifique (souvent avec de la BSA, albumine sérique bovine, protéine volumineuse présentant un fort pouvoir d'adsorption), on introduit l'échantillon en attendant assez longtemps pour que l'immunocomplexe antigène-anticorps se forme. On injecte par la suite d'autres anticorps qui viennent se fixer sur un deuxième site de l'antigène. C'est cette deuxième « couche » d'anticorps qui est en général marquée, et servira à la détection. Cette méthode de « sandwich » est intéressante, car d'une part elle permet de faire de nombreux tests différents avec le même anticorps marqué (ils suffit que les différents antigènes à tester présentent un site de reconnaissance antigénique commun, ce qui est en général le cas car les anticorps présentent un domaine commun spécifique de l'organisme qui les a produit, souris, chèvre, lapin, etc.), et d'autre part le marqueur peut être une enzyme qui transforme un substrat en un produit coloré, fluorescent ou électroactif. On dispose ainsi d'un effet d'amplification.

De manière générale en microfluidique, la réduction des dimensions, augmentant le rapport surface sur volume, induit des problèmes de contrôle d'état de surface. Ainsi, la miniaturisation des *immunoassays* a surtout requis des progrès dans le contrôle des effets de surface. Par exemple des anticorps ont été immobilisés, directement sur les parois dans des puces en verre [19], ou via une bicouche lipidique mais cette fois dans des puces en élastomère (PDMS, Polydiméthylsiloxane) [20]. On pourra trouver un certain nombre d'autres exemples dans les revues [10,15,21]. Pour donner plus de flexibilité au processus de greffage, et augmenter le rapport surface/volume, Sato et al. ont développé un système original de puces ELISA dans lequel les anticorps sont préalablement greffés sur des billes en polystyrène mesurant 20 μm de diamètre [22]. La puce est en verre et mesure 7 cm sur 3 cm, on y injecte avec un pousse seringue l'émulsion de billes qui se retrouvent immobilisées et compactées contre un obstacle au milieu du canal (voir Fig. 1). Ce système a été appliqué à des essais sur le BNP (peptide natriurétique de type B), un peptide-signal de défaillances cardiaques. La méthode est la même que celle qui a été décrite plus haut, et l'on a attaché ici aux anticorps anti-BNP de détection de la peroxydase, une enzyme qui va catalyser l'oxydation par l'eau oxygénée d'un agent (ABTS) dont la forme oxydée (ABTS^+) absorbe fortement à une certaine longueur d'onde. La détection se fait alors plus loin dans le canal avec un TLM (*thermal lens microscope*). Ce système optique développé il y a une dizaine d'années [23] permet de mesurer de très faibles concentrations de molécules fortement absorbantes. Lorsque l'on excite ces molécules avec un Laser, la chaleur transmise au milieu et dispersée par diffusion thermique crée un gradient de température dans le solvant et par voie de fait un gradient d'indice optique. On a alors créé une lentille fictive appelée lentille thermique (*thermal lens*) dont la focale va dépendre de l'absorbance du milieu, c'est à dire de la concentration en molécule absorbante. Dans le cas présent c'est le réactif oxydé ABTS^+ qui nous permet de remonter à la concentration en antigène BNP. Par rapport à un système conventionnel, des concentrations 100 fois plus faibles ont pu être détectées dans des temps 60 fois plus courts. Enfin, un système semi-automatisé avec 32 canaux en parallèle permet de multiplier le débit d'analyse du système.

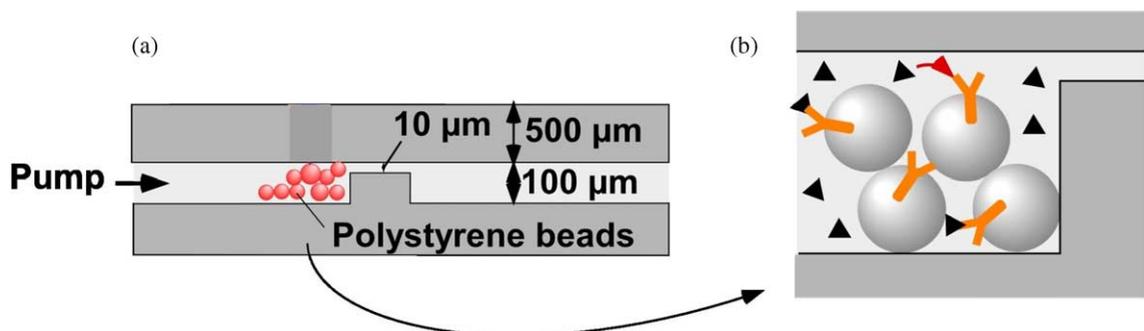


Fig. 1. (a) Billes de polystyrène immobilisées par gène stérique au milieu du canal microfluidique ; (b) formation de l'immunocomplexe antigène-anticorps sur les billes. (Tirées de [22] avec permission.)

2.2. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permet par des cycles thermiques d'amplifier une séquence quelconque d'ADN double brin génomique. Son invention a révolutionné le monde de la génétique, et elle est devenue un des outils clés de la biologie moléculaire. Le succès de la technique dépend de l'utilisation d'une ADN polymérase particulière, isolée des bactéries thermophiles découvertes dans la proximité immédiate des sources hydrothermales et capables de survivre et de se développer à des températures voisines de 100 °C. Cette protéine est stable à ces températures, contrairement à celles des organismes du monde « ordinaire ». Dans une première étape du cycle de PCR, la double hélice d'ADN est dénaturée en deux ADN simple brin en chauffant à 94 °C. Un deuxième pas consiste à hybrider des *primers* (petite séquence de nucléotides) délimitant la séquence que l'on veut amplifier, la température doit alors être de l'ordre de 55 °C. Enfin l'ADN polymérase thermostable, enzyme qui reconnaît le point de départ indiqué par les *primers* et vient déposer les nucléotides complémentaires de la séquence du simple brin est activée autour de 70 °C. En réitérant cet enchaînement d'opérations on peut isoler puis dupliquer une séquence précise au sein d'une longue molécule d'ADN. Le facteur d'amplification final sera alors deux puissance le nombre de cycles effectués.

La réduction des temps de transfert d'énergie par diffusion thermique via la miniaturisation des systèmes de PCR confère aux systèmes microfluidiques un atout remarquable pour ces applications de PCR. Néanmoins, encore une fois, certains effets de surfaces (adsorption des molécules d'ADN ou de l'enzyme) inhibent en partie la réaction et réduisent souvent dramatiquement le rendement de la méthode. Les systèmes de PCR miniatures sont ainsi parfois plus mésoscopiques que microscopiques et munis de surfaces biocompatibles comme le silicone passivé, la silice fondue, ou encore des verres ou des plastiques chimiquement modifiés. Les principales étapes qui ont marqué l'évolution de la technique de PCR sur puces sont présentées par exemple dans [10,14].

Plus récemment, la société Caliper a rapporté la mise au point d'un dispositif de PCR à haut débit, ayant la capacité d'amplifier des molécules uniques [24]. Comme le montre la Fig. 2, la puce en quartz est constituée de huit canaux, longés de trace de métal conducteur que l'on chauffe via un courant électrique. Un volume de 1 nl de solution d'ADN est aspiré et réparti entre les huit canaux par un système de *sip and slit* (aspirer et diviser). Les autres solutions (tampons, *primers*, enzyme, ...) sont introduites dans d'autres puits, si bien que différentes combinaisons biologiques peuvent être testées en parallèle. Les flux hydrodynamiques dans les canaux sont adaptés au nombre de cycles désirés ; le cycle typique étant de 5 secondes pour la dénaturation, 7 pour fixer les *primers*, et 5 autres pour la polymérisation. Les oligonucléotides en solution sont marqués et l'on quantifie l'amplification au bout des canaux en relevant le signal émis par microscopie de fluorescence. Une extrême reproductibilité sur 3000 PCR réalisées à la suite (soit 20 heures en continu) a été obtenue récemment. Les auteurs ont démontré sur ce système la détection de 7 molécules d'ADN mutées sur une seule base (*single nucleotide polymorphism*) sur une population de 700 molécules d'ADN.

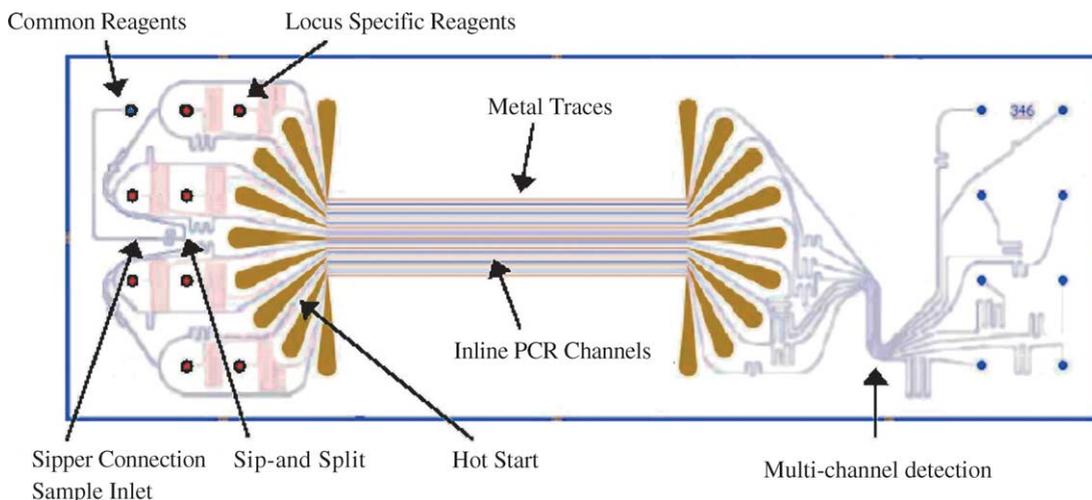


Fig. 2. Schéma de la puce en quartz à PCR développée par Caliper. (Tirée de [24] avec permissions de TRF et de Caliper Technologies corp ; Caliper se réserve tout droit d'exploitation de la figure.)

2.3. L'électrophorèse d'ADN

L'électrophorèse d'ADN est elle aussi une des techniques de base de la biologie moléculaire. Les séquenceurs automatiques, qui ont permis le séquençage du génome humain et de nombreux autres organismes d'intérêt biologique ou biotechnologique, sont fondés sur la séparation d'ADN en fonction de la taille. L'ADN est un polyélectrolyte, en solution il peut donc être mis en mouvement par l'application d'une différence de potentiel. Néanmoins, sa charge est uniformément répartie sur toute sa longueur et en milieu liquide simple les fragments d'ADN se meuvent donc à la même vitesse quelque soit leur taille. Pour trier les ADN suivant leur taille, on utilise alors une matrice d'obstacle pour « ralentir » les plus grandes molécules par rapport aux plus petites. Les phénomènes sont en fait bien plus complexes et les détails des mécanismes d'interaction entre ADN et obstacles ont donné lieu au cours des deux dernières décennies à de nombreux travaux (voir par exemple [25] pour une revue). En électrophorèse capillaire (la technique actuellement la plus répandue pour le séquençage d'ADN), la séparation s'effectue dans de longs capillaires (typiquement 50 cm) en silice fondue de faible section (50 μm de diamètre), permettant l'application de champs électriques très intenses pour des séparations rapides. Les obstacles permettant la séparation sont fournis par des solutions de polymères enchevêtrés tels que l'acrylamide. La miniaturisation directe de ces systèmes d'électrophorèse capillaire a rapidement trouvé ses applications dans la séparation de courts ADN (<1000 paires de bases), on pourra par exemple se référer à la récente revue de Landers [26]. La séparation de longs ADN (>10 000 paires de bases), au contraire, n'a pas donné de résultats concluants en électrophorèse capillaire à cause d'instabilités électrohydrodynamiques [27,28], et les méthodes classiques d'électrophorèse sur gel sont lentes et fastidieuses, à cause de la fragilité des molécules et de leur grande taille par rapport aux pores du gel. La microfabrication a permis de concevoir des « gels artificiels » présentant une gamme d'échelles spatiales bien adaptée à l'analyse de longs ADN (jusqu'au million de paires de bases). Des structures variées, utilisant des effets stériques et/ou entropiques ont été proposées au cours des dernières années, et ont permis des gains en temps atteignant parfois un facteur de l'ordre de 100 par rapport aux techniques classiques d'électrophorèse pulsée sur gel [29–33].

Notre équipe a travaillé au cours des dernières années sur des « gels artificiels » à base de colonnes magnétiques auto-assemblées. On part pour cela d'une suspension de particules colloïdales magnétiques nanométriques. En l'absence de champ magnétique, ces suspensions sont fluides. Si on les soumet à un champ magnétique uniforme au sein d'un canal, il se forme des colonnes dont le diamètre peut selon les conditions (concentration de l'émulsion, hauteur du canal) varier entre la taille d'une particule et plusieurs microns [34,35] (Fig. 3). Ce principe a été utilisé [36] pour la séparation de grandes molécules d'ADN (jusqu'à environ 150 000 paires de bases) : des temps de séparation de l'ordre de 10 mn ont été obtenus, contre 12 heures par les techniques traditionnelles. En combinant cette approche avec un contrôle précis des écoulements [37], des séparations très reproductibles d'ADN d'une centaine de kpb peuvent être effectuées en des temps de l'ordre d'une minute [38–40]. Les colonnes magnétiques offrent une alternative très peu coûteuse aux systèmes fabriqués par microlithographie, de plus une fois le champ magnétique coupé, une simple surpression suffit à rincer l'émulsion redevenue fluide et les canaux sont à nouveau utilisables.

2.4. Culture et tri cellulaire

On voit actuellement apparaître de nombreux systèmes visant à cultiver ou à analyser des cellules dans des systèmes microfluidiques. Ces recherches répondent à un fort besoin de la part de la biologie, lié à une convergence naturelle entre

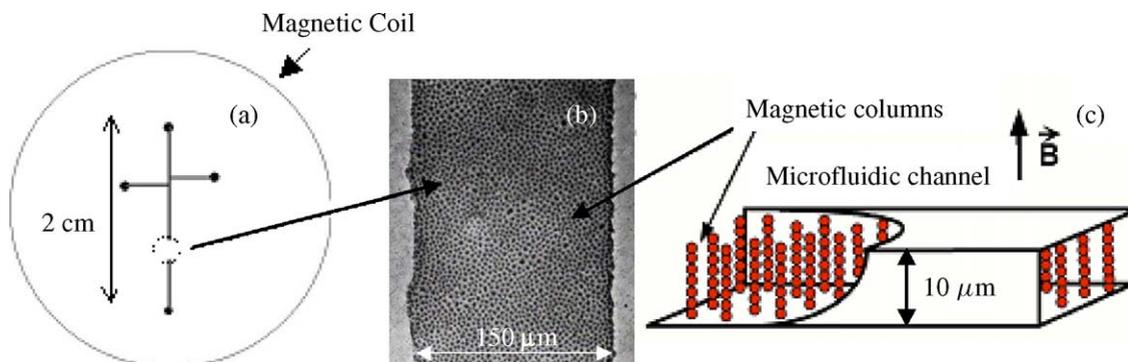


Fig. 3. Principe pour la séparation d'ADN dans des réseaux de nanoparticules magnétiques auto-assemblées (technologie « Ephesia »). (a) Schéma des canaux en « double T » permettant l'injection d'une quantité bien définie d'ADN dans le canal de séparation (branche la plus longue de la croix). (b) Microphotographie du réseau de colonnes auto-organisé au sein du canal de séparation, par l'application d'un champ magnétique (perpendiculaire au plan de l'image). (c) Représentation schématisée tridimensionnelle du réseau présenté en 3(b).

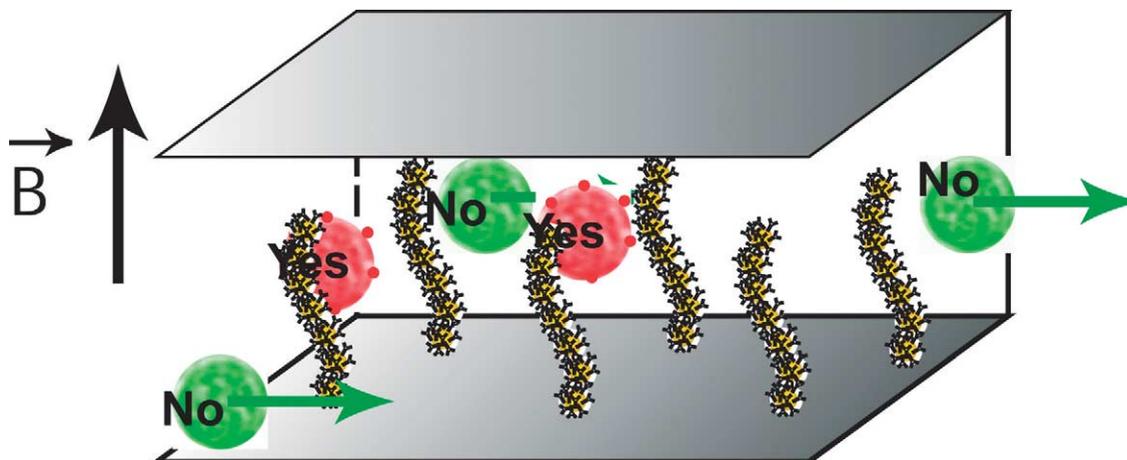


Fig. 4. (d'après [46]) : Représentation schématique d'un flux de cellules traversant une « forêt » de filaments magnétiques auto-organisés décorés d'anticorps. Les cellules marquées Yes sont piégées sur un filament, celles marquées No sont évacuées.

le développement important de la biologie cellulaire au cours de la dernière décennie, et la génomique. Un des objectifs de ces projets est de pouvoir traiter de façon individuelle mais parallèle de nombreuses cellules au sein d'un microsystème. En effet, un des problèmes de la biologie cellulaire est la grande variabilité des comportements entre différentes cellules, même au sein d'une même population. Cette variabilité repose bien sûr sur la présence d'un cycle cellulaire, mais également sur d'autres facteurs encore très mal compris, liés aux interactions entre cellules et à l'amplification de certaines fluctuations statistiques. L'approche individuelle et parallèle permise par la microfluidique devrait donner aux biologistes de nouveaux outils pour aborder ces questions. Un autre but, lié à la recherche pharmacologique et biomédicale, est de développer des méthodes de criblage sur cellules pour la recherche de cibles pour de nouveaux médicaments, et surtout pour évaluer ces derniers mieux qu'on ne sait le faire actuellement. Aujourd'hui, en effet, on sait que le coût de développement d'un médicament croît de façon très importante quand on passe à l'expérimentation animale, puis aux études cliniques, ces dernières étant rendues de plus en plus coûteuses par le renforcement de la réglementation. Des économies considérables et une meilleure performance des médicaments pourraient être obtenues, en développant des tests plus étendus de l'efficacité et des effets secondaires de médicaments avant d'aborder ces phases *in vivo* et cliniques. C'est ce que devraient permettre des études détaillées sur la réponse de cellules à des médicaments, par exemple via les études de transcriptôme ou de protéome (quantification relative des ARN messagers ou des protéines exprimées en fonction de l'environnement). Plusieurs groupes développent pour cela des systèmes pour manipuler et organiser des cellules soit par des méthodes hydrodynamiques [41] soit par des méthodes électriques [42], ou encore pour effectuer des transfections (injection de gènes nouveaux dans une cellule par altération transitoire des membranes cellulaires) cellule par cellule [43,42].

La microfluidique offre également de nouveaux moyens pour trier des cellules à des fins biotechnologiques ou de diagnostic. Parmi les approches utilisées pour cela, on peut citer la cytométrie en flux, pour laquelle le caractère laminaire des écoulements permet d'effectuer des « sheath flow » (veine liquide focalisée) très performants [44], ou la diélectrophorèse [45].

Une des applications potentielles intéressantes du tri cellulaire en microfluidique est la recherche de cellules rares, pour la détection de certains cancers par exemple. Notre équipe travaille actuellement, en collaboration avec le laboratoire Colloïdes et Nanostructures de l'École Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris, sur un système destiné au tri de cellules rares, en utilisant des colonnes magnétiques similaires à celles décrites ci-dessus pour la séparation de l'ADN, mais fonctionnalisées avec des anticorps spécifiques des antigènes de surface exprimés par les cellules à capturer [46] (Fig. 4). On peut ainsi effectuer une sélection très peu « agressive » pour les cellules.

3. Exemples de systèmes intégrés

Comme on l'a indiqué plus haut, un des intérêts majeurs à long terme de la microfluidique dans les bioanalyses, est de permettre un haut niveau d'intégration. Pour illustrer les premiers pas dans cette maturation de la microfluidique vers de véritables systèmes intégrés, on présente ici deux types de dispositifs, dont les « philosophies » sous-jacentes sont bien distinctes : Le premier, qu'on pourrait appeler intégration « horizontale » intégrera un très grand nombre d'opérations identiques en parallèle, offrant un très haut débit de traitement d'échantillon, alors que le second, d'intégration « verticale », intégrera toutes les fonctions nécessaires à l'analyse complète d'un échantillon brut.

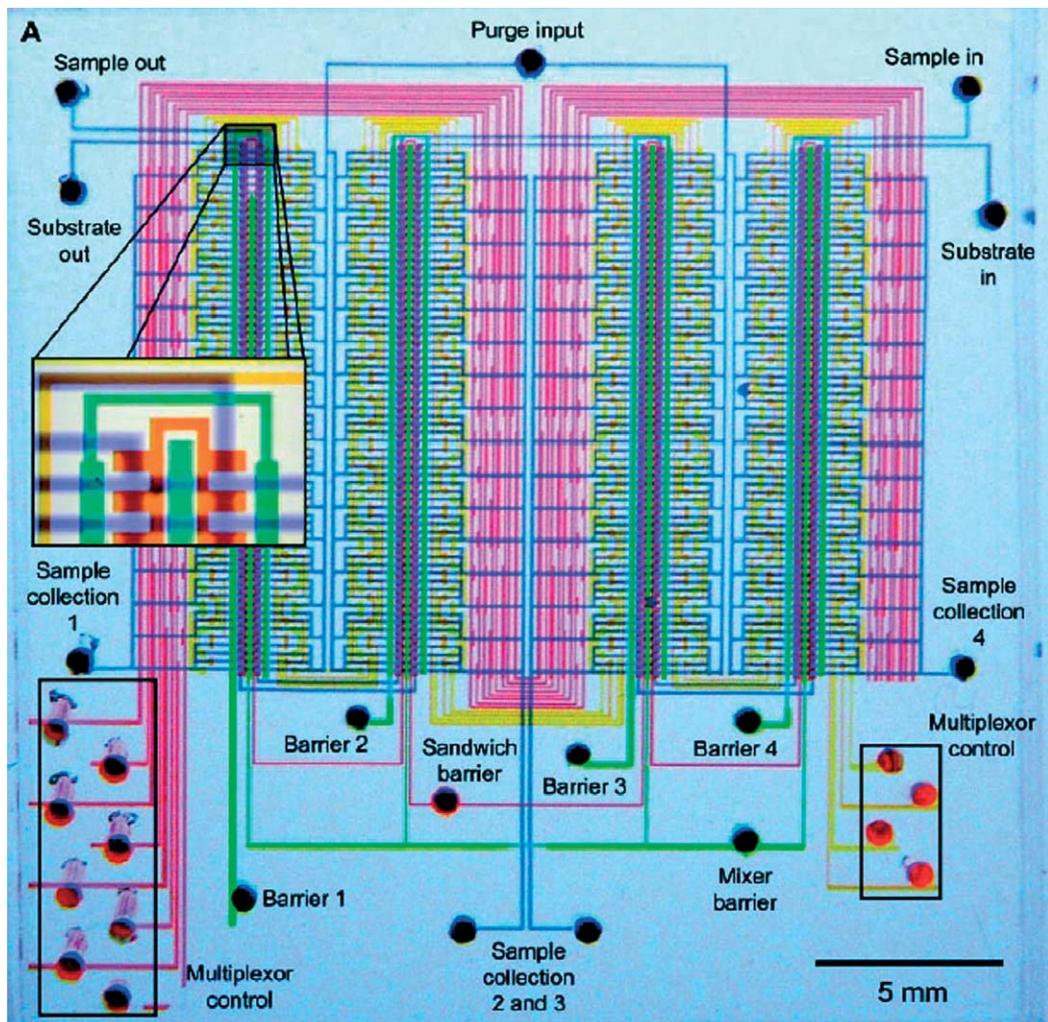


Fig. 5. Schéma du comparateur microfluidique MHTSC (*Multi High Throughput Screening Chip*). Cette puce intègre 2056 valves pilotées par seulement 18 canaux de contrôle. (Tirée de [48] avec permission.)

3.1. Intégration à grande échelle

Le groupe de Stephen Quake à l'institut technologique de Californie (Caltech) a récemment présenté un dispositif dans lequel 2056 valves orientent et combinent différents liquides d'intérêt, alimentant ainsi 256 chambres de réactions indépendantes d'un volume de 750 pL [47,48]. Le dispositif représenté dans la Fig. 5, présente une forte similitude avec les circuits intégrés de l'électronique.

Chaque valve a été fabriquée suivant un procédé développé par la même équipe [49], dit de multicouche monolithe. Le principe de ces systèmes consiste à superposer perpendiculairement deux canaux en élastomère (PDMS légèrement modifié ici), les deux canaux, chacun large de 100 μm et profond de 10 μm , étant séparés à leur intersection par une membrane de polymère assez fine (30 μm , typiquement). Le canal inférieur, appelé canal de flux, contient les liquides et le canal supérieur, appelé canal de contrôle, contient de l'air qui, mis sous une pression d'une centaine de kilo Pascal environ, défléchit suffisamment la membrane pour empêcher le liquide de passer. En combinant ainsi des croisements entre de nombreux canaux, on peut constituer différents types de composants microfluidiques. Par exemple, en alignant parallèlement 4 canaux de contrôle sur un seul canal de flux on peut en actionnant alternativement les valves fabriquer une micropompe péristaltique. Le MHTSC (*Multiwell High Throughput Screening Chip*) contient ainsi 2056 valves de 0,1 mm^2 actionnées par seulement 18 canaux de contrôles pilotés par un multiplexeur. Les faibles volumes des compartiments ainsi isolés par les valves assurent des temps de mélange par diffusion relativement courts. Le dispositif a été utilisé pour tester l'expression de l'enzyme CCP (cytochrome c peroxydase)

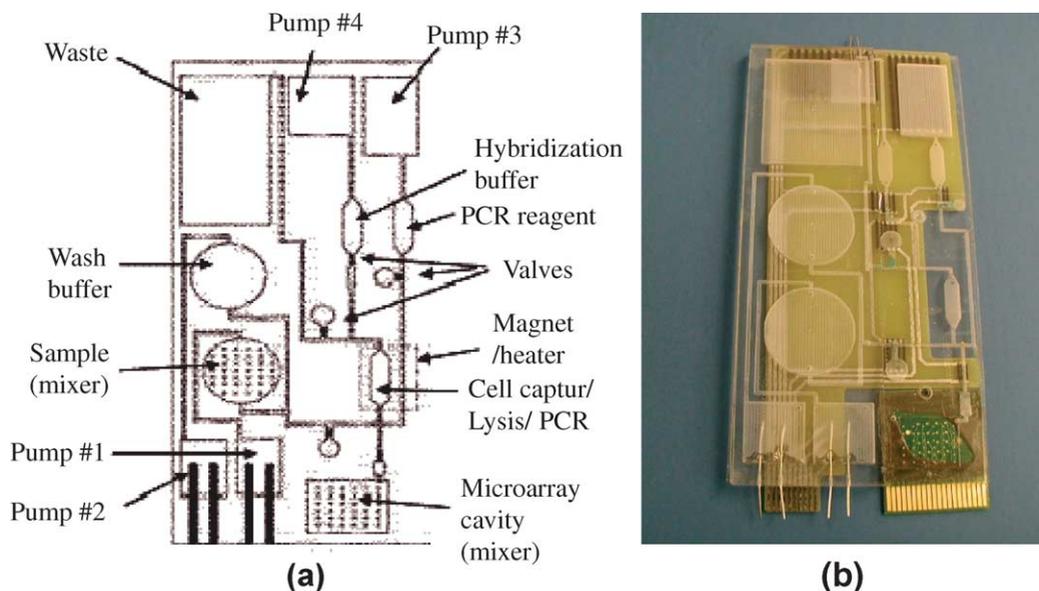


Fig. 6. (a) Schéma de la puce en plastique et de tous ces composants ; (b) Photographie de la puce. (Tirées de [50] avec permission.)

chez la bactérie *Escherichia Coli*. Une solution de marqueur *Amples red*, qui par oxydation en présence de l'enzyme fluoresce, et une dilution de bactérie (au sein d'une culture hétérogène) sont introduites séparément, puis mélangées dans les différents compartiments. Après une heure d'incubation à température ambiante, le réseau de chambres est alors balayé optiquement, et les compartiments contenant des cellules exprimant la CCP peuvent être identifiés. On détecte alors une distribution moyenne de 0,2 cellules par compartiments, et l'on peut ainsi quantifier la présence de ces bactéries dans une population cellulaire donnée. Ce « comparateur microfluidique » a par ailleurs trouvé bon nombre d'applications en terme de tests en parallèles, pour étudier la biochimie de cellule unique, la cristallisation de protéines, ou effectuer des analyses génétiques [18].

3.2. Un microlaboratoire multiprocessus à intégration « verticale »

Un second aspect très original et prometteur de la microfluidique pour les bioanalyses consiste à intégrer sur un support unique une multiplicité de composants effectuant l'ensemble des opérations nécessaires à l'analyse d'un échantillon. Le système dernièrement présenté par Liu et al., représente une avancée très convaincante dans cette direction [50]. Le dispositif représenté sur la Fig. 6 possède sur un support de la taille d'une carte téléphonique une dizaine d'éléments destinés à fournir une analyse génétique multicritères à partir d'un ml de sang. Cette puce en plastique intègre pour l'analyse de cet échantillon brut les fonctions suivantes : Capture de cellules rare, lyse (ouverture) de ces cellules, préconcentration de l'ADN, amplification de l'ADN récupéré par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), puis hybridation de cet ADN sur des sondes pour une détection électrochimique. Les liquides sont guidés dans les différents réservoirs par plusieurs valves et pompes, et des systèmes de mélange, de chauffage et d'immobilisation magnétique assurent le bon déroulement des réactions biochimiques.

Les microvalves sont constituées de bouchons de paraffine, et peuvent être ouvertes en chauffant la zone d'intérêt [51]. Il s'agit de vannes « à un coup » qu'on ne peut refermer après ouverture, mais cette approche est bien adaptée à un dispositif à usage unique. Le principe du mélangeur est également assez original, et repose sur la mise en résonance de petites bulles d'air par excitation ultrasonique : Un piézo-électrique fait vibrer à haute fréquence l'interface air/liquide des bulles et ce mouvement, induisant des flux convectifs au sein du réservoir, accélère le mélange. Typiquement pour un réservoir de 50 μ l la diffusion naturelle nécessite quelques heures pour effectuer un tri par affinité, alors que l'agitation ultra-sonore réduit le temps à 20 minutes [52]. La détection finale est effectuée sur un réseau d'hybridation (analogue des « puces à ADN » intégré dans une chambre au sein du système microfluidique). Les puces à ADN connaissent un très large développement depuis quelques années pour la recherche en génomique, et leur utilisation dans le diagnostic est également en plein essor [53,54]. Le principe des puces consiste à placer sur une surface un grand nombre de plots contenant chacun un type de séquence simple brin d'ADN appelé sonde, et caractéristique par exemple d'un gène. On incube cette surface avec un échantillon suspecté de contenir de l'ADN complémentaire de ces sondes (ADN-cibles). Lorsque l'ADN cible à analyser (dénaturé en simple brin) reconnaît sa séquence complémentaire il vient s'y hybrider. La détection peut alors se faire soit par observation en fluorescence avec un marquage préalable de l'ADN cible, soit par mesure électrochimique.

Dans l'exemple proposé par Liu et al., un échantillon sanguin initial d'un volume de 1 ml, qui contient entre 10^3 et 10^6 bactéries (*E.coli* K12) est utilisé. Une incubation de 20 mn sous agitation «acoustique», en présence d'un anticorps spécifique biotynilé (anti-*E.coli*), et de billes magnétiques recouvertes de streptavidine (le système clé-serrure biotine-streptavidine est fréquemment utilisé en biologie), permet de capturer les cellules. Un aimant permet alors de piéger les complexes billes-cellules, de les transporter dans un autre compartiment et d'isoler par rinçage les cellules d'intérêts du reste de l'échantillon : une efficacité de 40 % sur la capture est obtenue. La lyse des cellules est effectuée thermiquement, et suivie par une étape de PCR (30 cycles) qui va amplifier une ou plusieurs séquence(s) «signature». L'hybridation des séquences ainsi amplifiées sur les ADN sondes de la puce à ADN est à nouveau cinétiquement facilitée par mélange «acoustique». L'expression du gène spécifique *E.coli*-K12 est enfin effectivement détectée par mesure électrochimique. Une analyse de ce type prend en moyenne une à deux heures alors qu'elle durait plusieurs jours avec les méthodes traditionnelles.

4. Conclusion

Bon nombre de dispositifs microfluidiques ont été développés au cours des dix dernières années pour les bioanalyses, et il s'agit aujourd'hui d'un domaine de recherche extrêmement fécond. Beaucoup de systèmes n'existent encore qu'au niveau de la «preuve de concept» et de l'appareil de laboratoire, mais l'évolution des dernières années révèle une maturation rapide. On devrait ainsi voir apparaître sur le marché dans les quelques années à venir un nombre rapidement croissant de systèmes de bioanalyse fondés sur la microfluidique, en particulier sous la forme de systèmes d'analyse portables hautement miniaturisés. De nombreux champs restent cependant encore ouverts à l'exploration, comme ceux des traitements de surface, des contrôles de flux, de l'interface avec le monde extérieur en amont (introduction et gestion d'échantillons) et en aval (détection). Les dispositifs actuels possèdent pour la plupart un environnement macroscopique contenant les éléments optiques, alimentations électriques ou autres interfaces de contrôle de pression et d'injection des échantillons, qui reste souvent aussi encombrant que les appareils traditionnels ! D'autres défis, concernant les technologues de la microfabrication, visent par exemple l'intégration au sein d'un même dispositif de composants requérant des matériaux et des technologies de fabrication différents (par exemple des systèmes de canaux thermoplastiques, des vannes élastomères et un système de détection en technologie «silicium»), ainsi que la double intégration horizontale et verticale (dispositif effectuant des opérations variées en parallèle sur un grand nombre d'échantillons).

Malgré ces problèmes encore imparfaitement résolus, on peut d'ores et déjà imaginer à relativement court terme des systèmes portatifs permettant de réaliser des tests immunologiques ou génétique complexes, à l'hôpital ou chez un praticien de ville. Cette approche appelée dans les pays anglo-saxons «point of care» pourra avoir un impact fondamental sur la rapidité et la qualité du diagnostic, sur le confort des patients en étendant le champ des «hospitalisations à domicile», en particulier en tenant compte des possibilités offertes en parallèle par les télécommunications pour un suivi en temps réel à distance. Par ailleurs, cette évolution devrait également s'avérer essentielle pour le développement de traitements beaucoup plus personnalisés sur une base moléculaire. Des systèmes simples de bioanalyse fondés sur la microfluidique devraient aussi aider les citoyens et les organismes chargés d'assurer leur protection, à conserver un contrôle suffisant de leur environnement, dans un monde évoluant de plus en plus vite et faisant appel à des outils de production de plus en plus complexes et parfois controversés, tels que les OGM. Au niveau de la recherche, enfin les systèmes microfluidiques de criblage à haut débit permettent d'augmenter la quantité et la qualité d'informations fournies aux biologistes, tout en réduisant le coût de celles-ci.

Remerciements

Une partie des exemples cités dans cette revue et publiés par ailleurs est issue des travaux de l'équipe MMBM, et nous souhaitons remercier en particulier Kevin Dorfman, Aurélien Bancaud, Claus Fütterer, Cécile Goubault, Stéphanie Guyon et Jérémie Weber. Nous avons également bénéficié de discussions fructueuses avec Patrick Doyle, Juong Chen et Jérôme Bibette. Nous remercions K. Sato, Caliper Technologies Corp, S. Quake et R. Liu, pour avoir accepté l'insertion dans cette revue des Figs. 1, 2, 5 et 6 issues de leurs travaux. Ce travail a été accompli en partie grâce à l'aide des programmes «Nanosciences-Nanotechnologies» (CNRS-Ministère de la Recherche, «post génome» (Ministère de la Recherche), «Microfluidique» (CNRS) et «Nouvelles Méthodologies Analytiques et Capteurs» (CNRS/MRNT).

Références

- [1] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, Miniaturised total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing, *Sensors and Actuators B* 1 (1990) 244.

- [2] D.J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C.S. Effenhauser, A. Manz, Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip, *Science* 261 (1993) 895–897.
- [3] A. Manz, H. Becker, *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science*, Springer, Berlin, 1999.
- [4] M. Heller, A. Guttman, *Integrated Microfabricated Biodevices*, Marcel Dekker, New York, 2001.
- [5] P. Tabelling, *Introduction à la microfluidique*, Belin, Paris, 2003.
- [6] D.R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, A. Manz, Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2623–2636.
- [7] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *Anal. Chem.* 70 (1998) 4974–4984.
- [8] B.H. Jo, L.M. Van Lerberghe, K.M. Motsegood, D.J. Beebe, Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer, *J. Microelectromech. Systems* 9 (1) (2000) 76–81.
- [9] G.M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, D.E. Ingber, Soft lithography in biology and biochemistry, *Annu. Rev. Biomed. Engrg.* 3 (2001) 335–373.
- [10] G.H.W. Sanders, A. Manz, Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis, *Trends Anal. Chem.* 19 (6) (2000) 364–378.
- [11] H.A. Stone, S. Kim, Microfluidics: Basic Issues, Applications, and Challenges, *AIChE J.* 47 (6) (2001) 1250–1254.
- [12] G.M. Whitesides, A.D. Stroock, Flexible methods for microfluidics, *Phys. Today* 54 (2001) 42–48.
- [13] A. Manz, J.C.T. Eijkel, Miniaturization and chip technology. What can we expect, *Pure Appl. Chem.* 73 (10) (2001) 1555–1561.
- [14] P.-A. Auroux, D. Iossifidis, D.R. Reyes, A. Manz, Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2637–2652.
- [15] J. Khandurina, A. Guttman, Bioanalysis in microfluidic devices, *J. Chrom. A* 943 (2002) 159–183.
- [16] T. Chòvan, A. Guttman, Microfabricated devices in biotechnology and biochemical processing, *Trends Biotech.* 20 (3) (2002) 116–122.
- [17] D.J. Beebe, G.A. Mansing, G.M. Walker, Physics and applications of microfluidics in biology, *Annu. Rev. Biomed. Engrg.* 4 (2002) 261–286.
- [18] C.H. Hansen, S.R. Quake, Microfluidics in structural biology, faster... better, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13 (2003) 538–544.
- [19] A. Dodge, K. Fluri, E. Verpoorte, N.F. de Rooij, Electrokinetically driven microfluidic chips with surface-modified chambers for heterogeneous immunoassays, *Anal. Chem.* 73 (2002) 3400–3409.
- [20] T. Yang, S.-Y. Jung, H. Mao, P.S. Cremer, Fabrication of phospholipid bilayer-coated microchannels for on-chip immunoassays, *Anal. Chem.* 73 (2001) 165–169.
- [21] E. Verpoorte, Microfluidic chips for clinical and forensic analysis, *Electrophoresis* 23 (2002) 677–712.
- [22] K. Sato, M. Yamanaka, M. Tokeshi, K. Morishima, T. Kitamori, Multichannel micro elisa system, in: M.A. Northrup, K.F. Jensen, D.J. Harrison (Eds.), *Proceeding of Micro Total Analysis System*, vol. 1, San Diego, 2003, TRF, 2003, pp. 781–784.
- [23] M. Harada, K. Iwamoto, T. Kitamori, T. Sawada, Photothermal microscopy with excitation and probe beams coaxial under the microscope and its application to microparticle analysis, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2938–2940.
- [24] J. Baker, M. Strachan, K. Swartz, Y. Yurkovetsky, A. Rulison, C. Brooks, A. Kopf-Still, Single molecule amplification in a continuous flow labchip device, in: M.A. Northrup, K.F. Jensen, D.J. Harrison (Eds.), *Proceeding of Micro Total Analysis System* 2003, vol. 2, San Diego, USA, 2003, pp. 1335–1339.
- [25] J.-L. Viovy, Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: physical mechanisms, *Rev. Mod. Phys.* 72 (3) (2000) 72.
- [26] J.P. Landers, Molecular diagnostics on electrophoretic microchips, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2919–2927.
- [27] L. Mitnik, C. Heller, J. Prost, J.-L. Viovy, Segregation in DNA solutions induced by electric fields, *Science* 267 (1995) 219–222.
- [28] S. Magnusdottir, C. Heller, H. Isambert, J.-L. Viovy, Electrohydrodynamically induced aggregation during constant and pulsed field capillary electrophoresis of DNA, *Biopolymers* 49 (1999) 385–401.
- [29] W.D. Volkmuth, R.H. Austin, DNA electrophoresis in microlithographic arrays, *Nature* 358 (1992) 600–602.
- [30] T. Duke, R.H. Austin, Microchips for sorting DNA, in: H. Flyvbjerg, et al. (Eds.), *Principles of Biological Systems: From Molecules to Species*, Springer, New York, 1997, pp. 18–25.
- [31] C.F. Chou, O. Bakajin, S.W.P. Turner, T. Duke, S.S. Chan, E.C. Cox, H.G. Craighead, N. Darnton, J. Han, R.H. Austin, Sorting by diffusion: an asymmetric obstacle course for continuous molecular separation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 13762–13765.
- [32] J. Han, H.G. Craighead, Separation of long DNA molecules in a microfabricated entropic trap array, *Science* 288 (2000) 1026–1029.
- [33] M. Cabodi, S.W.P. Turner, H.G. Craighead, Entropic recoil separation of long DNA molecules, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5169–5174.
- [34] E.M. Lawrence, M.L. Ivery, G.A. Flores, J. Liu, J. Bibette, J. Richard, Field-induced structure of confined ferrofluid emulsion, *Int. J. Mod. Phys. B* 8 (1994) 2765–2777.
- [35] M. Ivey, J. Liu, Y. Zhu, S. Cutillas, Magnetic-field-induced structural transitions in a ferrofluid emulsion, *Phys. Rev. E* 63 (2000) 011403.
- [36] P. Doyle, J. Bibette, A. Bancaud, J.-L. Viovy, Self-assembled magnetic matrices for DNA separation chips, *Science* 295 (2002) 2237.
- [37] C. Fütterer, N. Minc, V. Bormuth, J.-H. Codarbox, P. Laval, J. Rossier, J.-L. Viovy, Lab on Chip, sous presse.
- [38] K.D. Dorfman, J.-L. Viovy, A semi-phenomenological model for the dispersion of DNA during electrophoresis in a microfluidic array posts, *Phys. Rev. E*, sous presse.
- [39] N. Minc, C. Fütterer, K.D. Dorfman, A. Bancaud, C. Gosse, C. Goubault, J.-L. Viovy, Rapid and quantitative microfluidic separation of DNA in self-assembled magnetic matrices, *Anal. Chem.*, 2003, sous presse.
- [40] N. Minc, C. Fütterer, K.D. Dorfman, C. Gosse, J.-L. Viovy, Fast separation of large DNA, in: M.A. Northrup, K.F. Jensen, D.J. Harrison (Eds.), *Proceeding of Micro Total Analysis System*, vol. 2, 2003, TRF, San Diego, 2003, pp. 1311–1314.
- [41] H. Andersson, A. van den Berg, Microfluidic devices for cellomics: a review, *Sensors and Actuators B* 92 (2003) 315–325.
- [42] B. Schaack, B. Fouquat, S. Porte, S. Combe, A. Hennico, O. Filhol-Cochet, J. Reboud, M. Balakirev, F. Chatelain, Cell culture in microdrops, a new format for cell on chip technology, in: M.A. Northrup, K.F. Jensen, D.J. Harrison (Eds.), *Proceeding of Micro Total Analysis System*, vol. 1, 2003, TRF, San Diego, 2003, pp. 669–672.

- [43] B. Le Pioufle, P. Surbled, H. Nagay, H.S. Chun, Y. Murakami, E. Tamiya, H. Fujita, Attachment of cells on Microsystems: Application to the Gene Transfection Transducers '99, Sendai (J) (1999) 768–771.
- [44] M.A. McClain, C.T. Culbertson, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, Flow cytometry of *Escherichia coli* on microfluidic devices, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5334–5338.
- [45] M. Stelze, M. Dürr, G. Gradl, P. Geggier, A. Haage, R. Hagedorn, M. Jäger, J. Kentsch, T. Muller, A. Normann, T. Schnelle, Separation, trapping, and analysis of biological nano-particles in biomems, in: M.A. Northrup, K.F. Jensen, D.J. Harrison (Eds.), *Proceeding of Micro Total Analysis System*, vol. 1, 2003, TRF, San Diego, 2003, pp. 239–241.
- [46] C. Goubault, J.-L. Viovy, J. Bibette, Capture of rare cells by magnetic filaments, in: M.A. Northrup, K.F. Jensen, D.J. Harrison (Eds.), *Proceeding of Micro Total Analysis System*, vol. 1, 2003, TRF, San Diego, 2003, pp. 239–241.
- [47] T. Thorsen, S.J. Maerkl, S.R. Quake, Microfluidic large-scale integration, *Science* 298 (2002) 580–584.
- [48] S.R. Quake, Biological large scale integration, in: M.A. Northrup, K.F. Jensen, D.J. Harrison (Eds.), *Proceeding of Micro Total Analysis System*, vol. 1, 2003, TRF, San Diego, 2003, pp. 1–4.
- [49] M.A. Unger, H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S.R. Quake, Monolithic microfabricated valves and pumps by multiplayer soft lithography, *Science* 288 (2000) 113–116.
- [50] R.H. Liu, J. Yang, R. Lenigk, J. Bonanno, P. Grodzinski, F. Zenhausern, Self-contained, integrated biochip system for sample to answer genetic assays, in: M.A. Northrup, K.F. Jensen, D.J. Harrison (Eds.), *Proceeding of Micro Total Analysis System*, vol. 2, 2003, TRF, San Diego, 2003, pp. 1319–1322.
- [51] R.H. Liu, J. Bonanno, R. Stevens, P. Grodzinski, Thermally actuated paraffin microvalves, in: Y. Baba, S. Shoji, A. van den Berg (Eds.), *Proceedings of Micro Total Analysis Systems 2002*, Kluwer Academic, Dordrecht, 2002, pp. 163–165.
- [52] R.H. Liu, J. Bonanno, J. Yang, R. Druyor-Sanchez, P. Grodzinski, Hybridization enhancement using cavitation microstreaming, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1911–1917.
- [53] R.F. Service, Microchip arrays put DNA on the spot, *Science* 282 (1998) 396–401.
- [54] E. Southern, K. Mir, M. Shchepinov, Molecular interactions on microarrays, *Nature Genetics, Microarray Suppl.* 21 (1999) 5–9.