

Titre : Biopuce à deux étages à base de capteurs à magnétorésistance géante pour du diagnostic précoce d'objets biologiques microniques

Mots clés : Magnétisme, biopuce, microfluidique, diagnostic, immunoanalyse

Résumé : Le développement de techniques de diagnostic précoce, rapides, sensibles, peu coûteuses et transportables au chevet du patient est un défi dans le domaine de la santé mais aussi dans celui de la défense ou de l'environnement. Actuellement, parmi les dispositifs de diagnostic faciles à utiliser, il existe des tests bandelettes dans lesquels les cibles migrent dans la cellulose mais ils ne sont souvent pas adaptés aux gros objets tels que les cellules ou certaines bactéries, et ils manquent de sensibilité. D'autres méthodes utilisées en routine dans les laboratoires de biologie, comme les tests ELISA ou PCR, ont de meilleures sensibilités mais nécessitent un personnel qualifié. Dans les hôpitaux, la détection d'objets biologiques un par un est souvent effectuée par cytométrie en flux, mais là encore, l'équipement est assez volumineux, coûteux et il est nécessaire de former le personnel à son utilisation complexe. La détection optique n'est toujours pas adaptée à certaines matrices opaques et la détection électrochimique ou magnétique statique présente trop d'interactions non spécifiques. Dans ce contexte, nous proposons une biopuce brevetée, à base de capteurs à magnétorésistance géante (GMR), pour détecter des objets biologiques en très petites quantités, dans des matrices complexes sans étape de lavage préalable. Cette approche est basée sur l'utilisation de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées par des anticorps monoclonaux, dirigés contre les objets biologiques cibles. Leur détection dynamique, après interaction avec les nanoparticules magnétiques, est réalisée par les capteurs GMR qui permettent de compter un par un les objets biologiques magnétiquement marqués de façon spécifique et ciblée.

Des résultats très prometteurs ont été obtenus avec le premier prototype de biopuce qui consiste en un canal microfluidique placé au-dessus d'un capteur GMR et développé sur un modèle cellulaire eucaryote (de taille 10 μm), permettant d'atteindre des sensibilités et spécificités légèrement inférieures à celles obtenues sur le même modèle biologique en test ELISA, avec une plus grande facilité d'utilisation et un léger gain de temps. Jusqu'à présent, la principale limite était les agrégats de billes qui conduisaient à des faux positifs.

La nouvelle biopuce brevetée et étudiée dans cette thèse dispose de capteurs GMR disposés face à face de part et d'autre du canal microfluidique, ce qui permet de détecter simultanément chaque objet magnétique. Pour la première fois, grâce à cette technique, et après plusieurs mises au point, il est possible de déterminer le moment magnétique des objets circulant dans le canal et ainsi de distinguer les agrégats de billes des objets biologiques ciblés. Cette technique de détection permet d'obtenir, toujours sur le même modèle cellulaire eucaryote, une sensibilité environ 100 fois supérieure à celle obtenue avec le test ELISA ou avec le premier prototype rendant cette biopuce très compétitive.

Enfin, quelques premiers tests prometteurs ont été réalisés au moyen d'une biopuce redimensionnée pour détecter des objets biologiques de plus petite taille (de l'ordre du micromètre): des bactéries avec un modèle non pathogène pour l'homme et facilement manipulable, *Xanthomonas arboricola*. Ces derniers essais prouvent la versatilité potentielle du domaine d'application de la biopuce GMR.

Title : Two-stage biochip based on giant magnetoresistance sensors for early diagnosis of micronic biological objects

Keywords : Magnetism, biochip, microfluidics, diagnosis, immunoanalysis

Abstract : The development of early diagnosis techniques, that are fast, sensitive, inexpensive and point of care, is a challenge in the field of health but also in the field of defense or the environment. Currently, among the easy-to-use diagnostic devices, there are strip tests in which the targets migrate in the cellulose but they are often not adapted to large objects such as cells or certain bacteria, and they lack sensitivity. Other methods used routinely in biology laboratories, such as ELISA or PCR tests, have better sensitivities but but require a qualified staff. In hospitals, the detection of biological objects one by one is often performed by flow cytometry, but here again, the equipment is quite bulky, expensive and it is necessary to train staff to its complex use. Optical detection is still not adapted to some opaque matrices and electrochemical or static magnetic detection presents too many non-specific interactions. In this context, we propose a patented biochip, based on giant magnetoresistance (GMR) sensors, to detect biological objects in very small quantities, in complex matrices without a prior washing step. This approach is based on the use of magnetic nanoparticles functionalized by monoclonal antibodies, directed against target biological objects. Their dynamic detection, after interaction with magnetic nanoparticles, is achieved by GMR sensors that allow to count one by one the magnetically marked biological objects in a specific and targeted way.

Very promising results have been obtained with the first biochip prototype which consists of a microfluidic channel placed above a GMR sensor and developed on a eukaryotic cell model, allowing to reach sensitivities and specificities slightly lower than those obtained on the same biological model in ELISA, with a greater ease of use and a slight time gain. Until now, the main limitation was bead aggregation which led to false positives.

The new patented biochip has GMR sensors arranged face-to-face on both sides of the microfluidic channel, allowing each magnetic object to be detected simultaneously. For the first time, thanks to this technique, and after several developments, it is possible to determine the magnetic moment of the objects circulating in the channel and thus to discriminate bead aggregates from targeted biological objects. This detection technique allows to obtain a sensitivity approximately 100 times higher than the one obtained with the ELISA test or with the first prototype making this biochip very competitive.

Finally, some promising first tests have been performed using a resized biochip to detect smaller biological objects (in the micrometer range): bacteria with a non-pathogenic and easily manipulated model, *Xanthomonas arboricola*. These latest tests prove the potential versatility of this GMR biochip application field.