

Projet ANR-06-TecSan-011-01

MEDICALIP

Programme TecSan 2006

A	IDENTIFICATION.....	2
B	RESUME CONSOLIDE PUBLIC	2
B.1	Résumé consolidé public en français	2
B.2	Résumé consolidé public en anglais.....	4
C	MEMOIRE SCIENTIFIQUE.....	7
C.1	Résumé du mémoire	7
C.2	Enjeux et problématique, état de l'art	7
C.3	Approche scientifique et technique.....	8
C.4	Résultats obtenus	10
C.5	Exploitation des résultats.....	15
C.6	Discussion	16
C.7	Conclusions.....	17
C.8	Références.....	18
D	LISTE DES LIVRABLES.....	20
E	IMPACT DU PROJET	22
E.1	Indicateurs d'impact	22
E.2	Liste des publications et communications.....	23
E.3	Liste des éléments de valorisation.....	26
E.4	Bilan et suivi des personnels recrutés en CDD (hors stagiaires)	28

A IDENTIFICATION

Acronyme du projet	MEDICALIP
Titre du projet	Microsystème Embarqué pour le Diagnostic des Infections à Cytomegalovirus Au Lit du Patient
Coordinateur du projet (société/organisme)	Bruno Wacogne (Institut FEMTO-ST, UMR CNRS 6174)
Période du projet (date de début – date de fin)	01/01/2007 – 31/12/2010
Site web du projet, le cas échéant	

Rédacteur de ce rapport	
Civilité, prénom, nom	Mr Bruno Wacogne
Téléphone	03 81 66 63 88
Adresse électronique	Bruno.wacogne@univ-fcomte.fr
Date de rédaction	06/01/2011

Si différent du rédacteur, indiquer un contact pour le projet	
Civilité, prénom, nom	
Téléphone	
Adresse électronique	

Liste des partenaires présents à la fin du projet (société/organisme et responsable scientifique)	• Institut FEMTO-ST : Bruno Wacogne • CHU Besançon, Laboratoire de Virologie : Alain Coaquette • UMR Inserm-Université-CNRS 1053 Toulouse : Christian Davrinche • Société Statice Santé : Serge Piranda • Société ALCIS : Jean-François Delforge
---	--

B RESUME CONSOLIDE PUBLIC

B.1 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN FRANÇAIS

(Avec le concours d'Aurélié Guimbert, Chargée de Mission au Pôle de Compétitivité Microtechnique de Franche-Comté).

MEDICALIP: le cytomégalovirus bientôt dépistable

Le cytomégalovirus devenu première cause d'infections congénitales

Depuis la mise en place de la vaccination de la rubéole, l'infection par le cytomégalovirus (CMV) est devenue l'une des causes les plus fréquentes d'infection congénitale. Elle peut induire des expressions cliniques tardives et peut être responsable des complications neurosensorielles qui surviennent lorsque l'enfant grandit, notamment la surdité ou les troubles de la vision.

Entre 0,5 et 2% des bébés sont porteurs du CMV à la naissance et 9 sur 10 d'entre eux sont des porteurs sains.

Un dépistage rapide et aisé au lit du nouveau-né représenterait une avancée majeure, permettant de repérer et d'effectuer un suivi des enfants porteurs et de prévenir la contamination.

Porté par FEMTO-ST en partenariat avec le CHU de Besançon, l'unité mixte INSERM-Université- CNRS 1053 de Toulouse, les entreprises STATICE SANTE et ALCIS, le programme MEDICALIP a pour objectif de donner très vite et très simplement l'information aux praticiens. Ce projet a réuni nombre d'acteurs régionaux et nationaux. Biologistes, médecins, pédiatres, chercheurs et industriels ont travaillé ensemble pour que ce qui était une idée correspondant à un besoin devienne au final un produit disponible sur le marché.

Un microsystème utilisable au lit des nouveau-nés

Le programme MEDICALIP a permis de mettre au point un prototype opérationnel de détection du CMV qui pourrait être facilement installé juste à côté des salles d'accouchement.

Le développement du microsystème embarqué s'est appuyé sur :

- L'utilisation du liquide gastrique comme échantillon de test (100 à 500 microlitres seulement sont nécessaires),
- La mise au point d'un biocapteur capable de produire une réaction d'immunofluorescence pour détecter le virus.

Ce microsystème embarqué intègre un dispositif médical qui comprend :

- Une cassette jetable avec tous les réactifs nécessaires (biocapteur spécifique, réservoir de liquide gastrique,...)
- Un lecteur / actuateur mobile qui réalise le test lorsqu'on introduit la cassette.

Au final: une lumière verte s'allume; pas de problème, la rouge s'allume, le nouveau-né est pris en charge.

Le prototype de ce dispositif médical innovant est achevé et la démarche d'obtention du marquage CE a été entamée dès la phase de recherche. Les prochaines étapes recouvrent la fabrication d'un appareil ergonomique de recueil de liquide gastrique, la validation technique en situation clinique, l'application auprès d'une cohorte de prématurés et la mise sur le marché. Cette dernière phase dépendra des décisions des instances nationales de santé.

Résultats majeurs et retombées du projet

MEDICALIP illustre la méthode de travail initiée par la Commission biomédicale du Pôle des microtechniques.

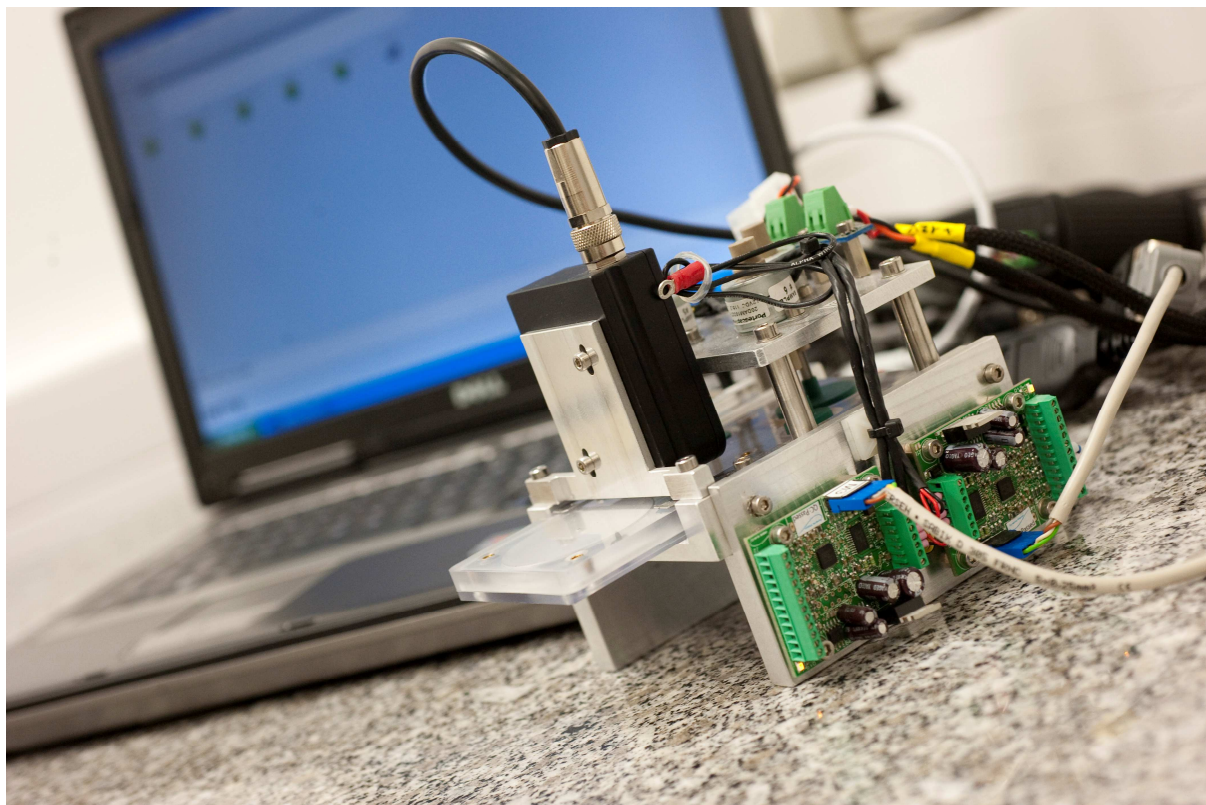
Résultat pour MEDICALIP : « un formidable resserrement des liens » se réjouit Alain Coaquette, Docteur en médecine, « l'acquisition de la technologies d'intégration de bio-puces dans les dispositifs médicaux » relève Pascal Schoeb, Directeur de STATICE SANTE, « un vrai projet multipartenarial », dit encore Lionel Pazart, Docteur en médecine, responsable du CIC-IT de Besançon.

A travers MEDICALIP, c'est une organisation d'innovation au service de la santé qui s'est mise en place en Franche-Comté.

Production scientifique

Durant ses 4 ans d'existence, le projet a produit 4 articles scientifiques dans des revues internationales, 15 conférences nationales et internationales. Il a permis le dépôt d'un brevet et d'une enveloppe Soleau. Un second brevet est actuellement à l'étude. Enfin, ce projet dont l'impact médico-social est avéré a donné lieu à 10 interventions dans la presse (écrite, internet et radiophonique).

Illustration



Le prototype MEDICALIP de dépistage du cytomegalovirus

Informations factuelles

Il s'agit d'un projet de recherche industrielle porté par FEMTO-ST en partenariat avec le CHU de Besançon, l'unité mixte INSERM-Université- CNRS 1053 de Toulouse, les entreprises STATICE SANTE et ALCIS. Il est labellisé par le Pôle de Compétitivité Microtechnique de Franche-Comté et a perçu une aide de l'ANR de plus de 500 k€ pour un coût global d'environ 1100 k€. Il a débuté le 1^{er} Janvier 2007 et a duré 4 ans.

B.2 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN ANGLAIS

MEDICALIP: cytomegalovirus soon to be detectable

Cytomegalovirus now the number one cause of congenital infections

Since the implementation of the rubella vaccine, infection by cytomegalovirus (CMV) has become one of the most common causes of congenital infection. It can cause late clinical expressions and may be responsible for neurosensory complications which occur as children grow, particularly deafness or visual impairment.

Between 0.5 and 2% of babies are carriers of CMV at birth and 9 out of 10 of these are healthy carriers.

Quick and easy screening at the bedside of newborns would represent major progress, allowing children who are carriers to be identified and followed, and to prevent contamination.

Conducted by FEMTO-ST in partnership with Besançon University Hospital, the INSERM-University-CNRS 1053 Toulouse mixed research unit, and the STATICE SANTE and ALCIS firms, the MEDICALIP program aims to provide practitioners with information very quickly and simply. This project involves a number of regional and national professionals. Biologists, doctors, pediatricians, researchers and professionals in industry have worked together to make what was an idea in relation to a need become a product which is available on the market.

A microsystem for use at the bedside of newborns

The MEDICALIP program has enabled us to develop an operational prototype for detecting CMV which may be easily installed close to the delivery room.

Developing an embedded microsystem has involved:

- use of gastric liquid as a test sample (only 100 to 500 microliters are necessary),
- developing a biosensor which is able to produce an immunofluorescence reaction to detect the virus.

This embedded microsystem incorporates a medical device which includes:

- a disposable cassette with all the necessary reagents (specific biosensor, gastric liquid reservoir, etc.)
- a mobile reader/actuator which carries out the test when the cassette is introduced.

At the end, when a green light comes on - no problem, and when a red light comes on, the newborn is provided with care.

The prototype of this innovative medical device is completed and the procedure for CE marking was undertaken as soon as the research phase began. The following stages cover the manufacture of an ergonomic device for collecting gastric liquid, technical validation in clinical situations, application on a cohort of premature babies and marketing. This final phase will depend on decisions made by national health authorities.

Major results and repercussions of the project

MEDICALIP illustrates the work method initiated by the biomedical Commission of the microtechnics competitive cluster.

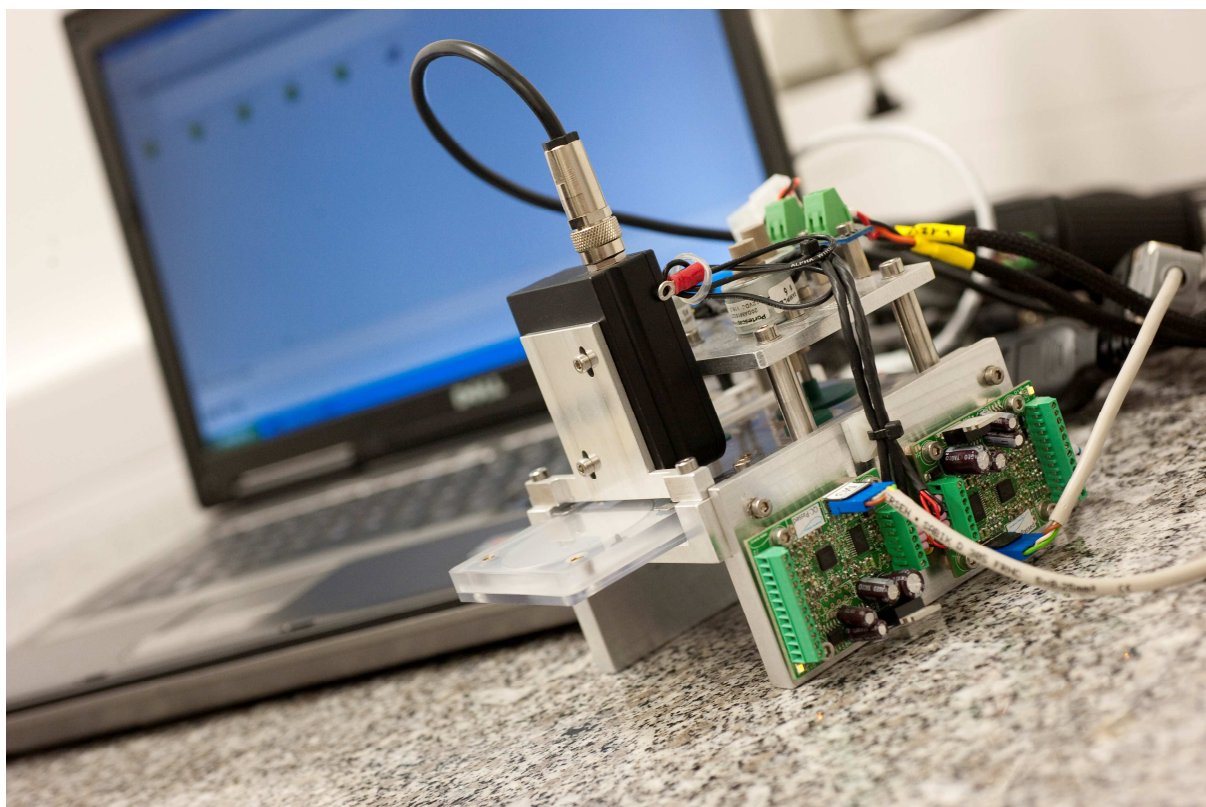
Result for MEDICALIP: "an impressive reinforcement of links" proclaims Alain Coaquette, doctor of medicine; "acquiring technology to incorporate biochips into medical devices" reveals Pascal Schoeb, Head of STATICE SANTE; "a real multi-partner project" says Lionel Pazart, doctor of medicine and manager of the CIC-IT of Besançon.

Through MEDICALIP, an organization for innovation applied to health has been implemented in Franche-Comté.

Scientific Production

The project has produced 4 scientific articles in international journals and 15 national and international conferences over the four years in which it has been running. It has led to the submission of 1 patent and 1 Soleau envelope. A second patent is currently being studied. Lastly, this project, whose medico-social impact is proven, has led to 10 appearances in the media (in writing, on the internet and on the radio).

Illustration



MEDICALIP prototype for CMV screening

Factual information

This is an industrial research project conducted by FEMTO-ST in partnership with Besançon University Hospital, the INSERM-University-CNRS 1053 Toulouse mixed research unit, and the STATICE SANTE and ALCIS firms. It has been approved by the Microtechnics

competitive cluster in Franche-Comté and has received ANR funding of over 500 k€ for an overall cost of approximately 1100 k€. It began on 1 January 2007 and has lasted 4 years.

C MEMOIRE SCIENTIFIQUE

Mémoire scientifique confidentiel : non

C.1 RESUME DU MEMOIRE

Depuis la mise en place de la vaccination contre la rubéole, l'infection à cytomegalovirus est devenue une des principales causes d'infection congénitale. La Haute Autorité de Santé préconise un diagnostic des nouveau-nés. Puisqu'aucun système de dépistage n'existe, un consortium a été établi pour concevoir un dispositif original. Le projet a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche. Le dispositif consiste en une cassette jetable contenant l'échantillon biologique et les réactifs nécessaires à une réaction d'immuno-fluorescence sur une surface fonctionnalisée. Il consiste également en un lecteur/actuateur qui gère les fluides et assure la lecture optique. L'intensité de fluorescence détectée pour des échantillons positifs est trois fois supérieure à celle obtenue avec des échantillons négatifs.

C.2 ENJEUX ET PROBLEMATIQUE, ETAT DE L'ART

Depuis la mise en place du vaccin contre la rubéole, l'infection à cytomegalovirus (CMV) est devenue l'une des causes principales d'infection congénitale, principalement chez les enfants prématurés [1-6]. Avant de décider d'un éventuel dépistage dans cette population, la Haute Autorité de Santé (HAS) préconise une étude chez les nouveau-nés, ainsi qu'un suivi à long terme des enfants infectés. Un des obstacles à cette étude est le manque de moyen diagnostique disponible.

Les infections congénitales sont le résultat d'une transmission trans-placentaire du CMV. La transmission au fœtus peut résulter d'une infection primaire ou secondaire de la mère. La fréquence de transmission suivant une primo-infection durant la grossesse est d'environ 30% à 40%, contre seulement 1% pour une infection secondaire [1,7]. Dix à quinze pourcent des enfants infectés congénitalement présenteront des symptômes à la naissance et 20% à 30% de ces derniers périront [7-9]. Mais la grande majorité des enfants infectés (85% à 90%) ne présenteront aucun symptôme à la naissance. Cependant, 5 à 15% d'entre eux développeront des séquelles comme des pertes auditives neurosensorielles, des retards du développement psychomoteur et des altérations visuelles [10-12].

Le dépistage des femmes enceintes est rarement recommandé par les autorités de santé [13-15]. Certains auteurs préconisent un dépistage des enfants à la naissance, mais des systèmes simples de détection font défaut [16-18]. Le dépistage des enfants infectés repose sur la recherche du virus dans divers fluides corporels et plus particulièrement dans les urines qui concentrent le virus. Hormis les kits de détection pour laboratoire, les recherches concernent principalement des systèmes de détection reposant sur des microsystèmes complexes qui recherchent l'ADN viral après une préparation des échantillons biologiques encore plus complexe [19-22]. En fait, un système simple directement utilisable au berceau du nouveau-né doit être mis au point.

Le dispositif présenté ici a été développé sous la coordination de l'Institut FEMTO-ST grâce à un financement de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) à travers l'appel à

projet Technologies pour la Santé en 2006. Ce projet a été labellisé par le Pôle de Compétitivité Microtechnique de Franche-Comté. Le consortium est composé de l'Institut FEMTO-ST, du CHU de Besançon, de l'Unité Mixte de Recherche INSERM-Université-CNRS 1053 de Toulouse et des entreprises Franc-Comtoises Statice Santé et ALCIS. La cohérence médico-scientifiques du projet a été assurée par le Centre d'Investigation Clinique en Innovation Technologique (CIT INSERM 808) du CHU de Besançon.

Le dispositif est un système embarqué de détection reposant sur un microsystème opto-fluidique comprenant une zone fonctionnalisée en anticorps spécifiques du CMV. Une demande dépôt de brevet a été enregistrée en Septembre 2009. La détection du matériel viral repose sur une réaction d'immunofluorescence. Les matériaux et les techniques de fabrication sont compatibles avec les techniques industrielles actuelles de production de masse.

Parmi les actes médicaux effectués sur les prématurés à la naissance, l'aspiration gastrique permet d'obtenir aisément un fluide combinant du liquide amniotique et de l'urine du nouveau-né. Nous avons donc choisi d'utiliser ce fluide comme échantillon biologique à tester.

C.3 APPROCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

La détection repose sur l'utilisation d'un biocapteur à immunofluorescence dont une description est donnée sur la figure 1. La surface du biocapteur est recouverte d'or puis fonctionnalisée avec des anticorps spécifiques du CMV. La fonctionnalisation de la surface est rendue possible par l'application d'une biochimie des surfaces spécifique, développée au sein de la Plateforme Protéomique CLIPP bi-régionale Bourgogne Franche-Comté, dont une partie est une composante de l'Institut FEMTO-ST. La plateforme CLIPP a également validé le piégeage de matériel viral à la surface du biocapteur par utilisation de son appareillage Biacore 2000. Les anticorps de capture ont été développés au sein du Laboratoire de Virologie du CHU de Besançon, en partenariat avec l'Unité Mixte de Recherche INSERM-Université-CNRS 1053 de Toulouse.

Lorsque le fluide biologique à tester est appliqué sur la surface de ce biocapteur, le matériel viral éventuellement présent est piégé par les anticorps de capture. Après un rinçage du biocapteur par un tampon spécifique, une sonde de fluorescence est appliquée sur la surface active. Cette sonde est constituée d'une combinaison d'anticorps complémentaires marqués par une terminaison fluorescente, la cyanine 5. Ainsi, si du matériel viral a été piégé lors de la phase précédente, un signal de fluorescence est détecté et le résultat du test est alors connu.

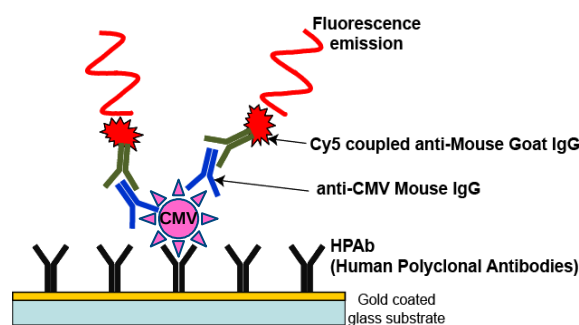


Figure 1: Détection du CMV par immunofluorescence.

Ce biocapteur est intégré à une cassette jetable (figure 2). Elle contient tous les fluides nécessaires à la réaction d'immunofluorescence décrite ci-dessus. Sur ce cliché, on reconnaît la zone traitée à l'or et fonctionnalisée en anticorps. On distingue également des réservoirs. Ces derniers sont reliés au biocapteur grâce à des micro-canaux thermo-moulés, ce qui permet de conduire les différents réactifs des réservoirs vers le biocapteur.

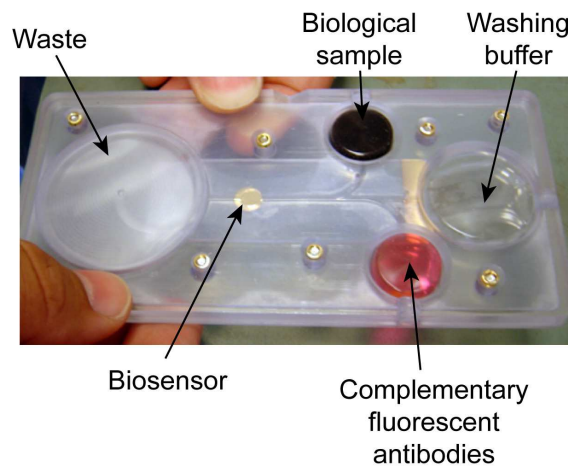


Figure 2: Vue de la cassette jetable.

Quatre réservoirs sont utilisés. Un premier contient le liquide d'aspiration gastrique, un deuxième contient la sonde de fluorescence et un troisième la solution tampon. Le quatrième réservoir recueille les différents fluides après que ces derniers ont transité par le biocapteur. Pour réaliser la mesure, la cassette jetable est insérée dans le lecteur/actuateur présenté en figure 3. Le concept de la cassette et du lecteur/actuateur ont été développés par la Société Statice.

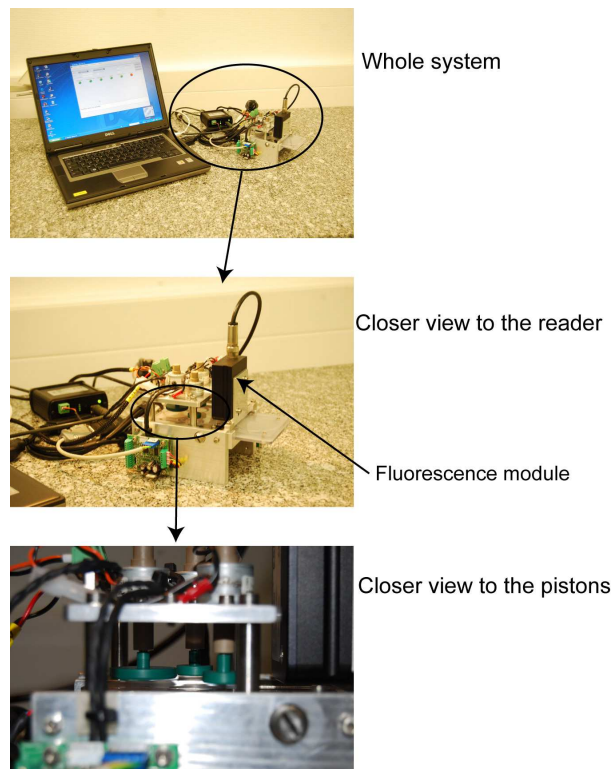


Figure 3: Vues du lecteur/actuateur.

Les réservoirs de la cassette sont en silicone souple, ce qui permet le pilotage des fluides par l'action de pistons contenus dans le lecteur/actuateur. Le pilotage s'effectue en termes de débit et de durée d'incubation au niveau du biocapteur. Dans ce prototype de mise au point "recherche", les mouvements des pistons, et donc les débits des fluides, sont contrôlés par ordinateur suivant le séquençage suivant.

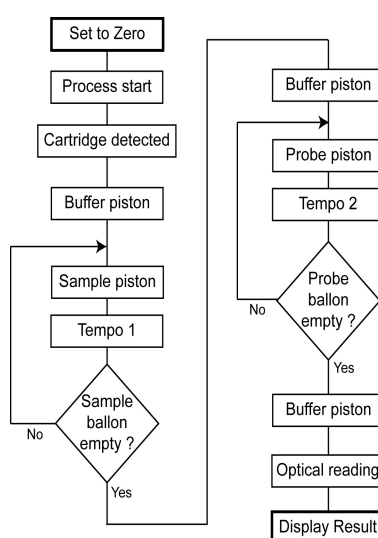


Figure 4: Séquençage du système.

En premier lieu, la surface du biocapteur est rincée avec le liquide tampon. Le piston correspondant au fluide biologique à tester est alors activé de sorte à remplir la zone de réaction au niveau du biocapteur. On laisse alors au matériel viral le temps de réagir avec le biocapteur (temps d'incubation). Après quelques minutes, une nouvelle dose de fluide à tester est dirigée vers le biocapteur et un temps d'incubation est respecté. Ce processus est itéré jusqu'à utilisation complète du fluide à tester. Ceci permet de renouveler plusieurs fois le fluide biologique à tester et ainsi d'augmenter l'efficacité de capture. En revanche, la surface est rincée en une seule fois avant d'appliquer la sonde de fluorescence de manière séquentielle.

La détection optique repose sur l'utilisation d'un module de mesure de fluorescence intégré (module ESE distribué par Optoprim). La mise au point du dispositif, hors biocapteur, a été assurée par le groupe Statice. La conformité de toutes les actions vis-à-vis d'un futur marquage CE du système a été assurée par la Société ALCIS.

C.4 RESULTATS OBTENUS

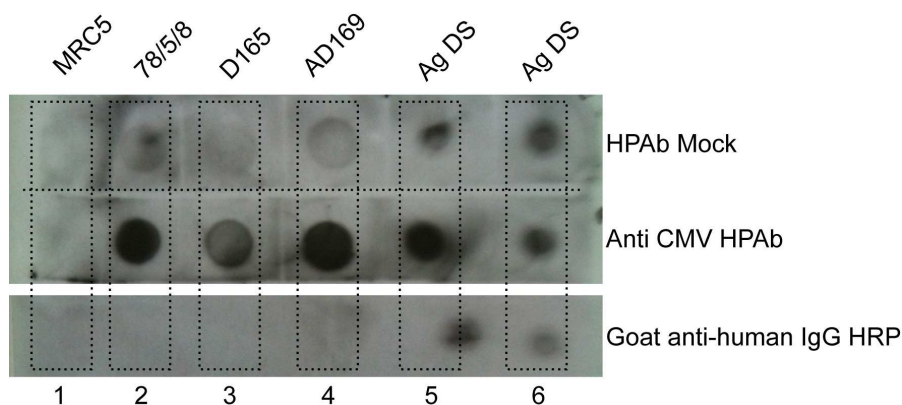
Fabrication et validation des anticorps de piégeage.

Malgré d'importants efforts, nous n'avons pas trouvé d'anticorps de capture satisfaisant dans le commerce. Une sous-traitance avec la société Biotem, si elle a permis de mieux cerner les spécificités du système immunologique, n'a pas non plus permis de produire des anticorps convenables. Nous avons donc développé nos propres anticorps polyclonaux anti CMV d'origine humaine (PAbH).

Des fibroblastes issus de poumon fœtaux humains MRC5 (RD Biotech, Besançon, France) sont cultivés dans du DMEM (Dulbecos) additionné de 10% de sérum de veau fœtal à 37°C en atmosphère saturée à 5% en CO₂. A confluence, 3 jours avant d'être infectées par le surnageant de culture virale, les cellules sont décollées à l'aide de trypsine et ensemencées à 2×10⁶ cellules par boîte de 175 cm². Les cellules sont remises à incuber à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 5 à 10 jours en fonction de la prolifération virale. Lorsque le niveau optimum d'infection est atteint, défini par des modifications morphologiques des cellules, celles-ci sont fixées par un mélange acétone/éthanol froid. Le surnageant est éliminé et les cellules sont lavées avec du PBS 1X (Dulbecos). 12 ml d'acétone 90% dilué dans de l'eau bi-distillée sont ajoutés sur les cellules pendant 20 min à 4°C. Le mélange acétone/eau est remplacé par 12 ml d'une solution constituée de 30% acétone/eau, 70% éthanol. Les cellules sont incubées pendant 10 minutes à 4°C puis 10 minutes de plus à température ambiante. La solution de fixation est ensuite éliminée. Le même protocole est réalisé avec des cellules MRC5 non infectées.

12ml de Privigen® (CSL Behring), dilué dans du PBS 1X (v/v) sont ajoutés sur les cellules non-infectées dans le but de dépléter la solution des anticorps qui sont dirigés contre les protéines des cellules MRC5. Après une heure d'incubation à 37°C, le surnageant est collecté et incubé pendant 1h à 37°C sur des cellules MRC5 infectées par le CMV. Le surnageant est éliminé et les cellules sont rincées deux fois avec du PBS 1X. Les anticorps anti-CMV sont élués par le Gamma Elu Kit™ II (Immucor) suivant les instructions du fournisseur. Les solutions d'élution contenant les anticorps polyclonaux humains anti-CMV (PAbH) sont ensuite stockées à -20°C. L'efficacité des PAbH est testée par immunomarquage, dot blot et la concentration en IgG est évaluée par spectroscopie.

La figure 5 montre l'affinité et la spécificité des PAbH. 10µg de protéines sont extraites des cellules MRC5 non-infectées (ligne 1) ou de cellules MRC5 infectées par la souche CMV 78/5/8 (ligne 2), la souche D165 (ligne 3), la souche AD169 (ligne 4). La membrane de nitrocellulose est incubée pendant 30 minutes avec les PAbH dilués dans du tampon TBS-Tween 0.05%/lait et un anticorps de chèvre anti-humain HRP est utilisé pour une détection par chemiluminescence. Un mélange d'antigènes CMV DIASORIN (Ag DS) (lignes 5 et 6) est utilisé comme contrôle positif. PAbH Mock sont des anticorps humains qui ne reconnaissent pas les antigènes des cellules MRC5 ni les antigènes CMV (surnageant de Privigen® collecté après incubation sur cellules MRC5 infectées par le CMV). L'anticorps de chèvre anti-humain HRP est utilisé seul pour tester les interactions non-spécifiques.



Validation de l'architecture du capteur avec des expériences de SPR

Une étude complète a été réalisée sur l'appareil Biacore pour valider l'utilisation des différentes molécules (anticorps, antigènes). Une description de la fonctionnalisation est donnée par la figure 6. Avant le processus de fonctionnalisation, les surfaces d'or préparées par nos soins sont rincées avec de l'éthanol et de l'eau ultrapure. Le procédé pour la fonctionnalisation a été précédemment publié [23] et peut être résumé de la manière suivante. La puce est incubée dans une solution de 11-mercaptop-1-undecanol (MUOH) (97%) / 16-mercaptohexadecanoic acid (MHA) (3%) (Sigma–Aldrich) sur la nuit à température ambiante. Les surfaces sont rincées avec de l'éthanol et de l'eau ultrapure. Ceci conduit à la formation d'une monocouche compacte de MUOH/MHA à la surface de la puce. Puis, 40 µl de EDC/NHS (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride/ N-hydroxysuccinimide) sont déposés sur chaque surface et une incubation de 30 minutes à température ambiante est réalisée. Cette étape est nécessaire pour activer les groupements COOH du MHA de la monocouche MUOH/MHA. Ceci produit les groupements présents aux extrémités comme indiqué dans la figure 6(a). Ces terminaisons sont utilisées pour greffer les anticorps à la surface de la puce (Fig 6(b)) alors que les molécules de MUOH rendent la surface d'or passive pour tout greffage

En plus pour contrôler le greffage des PAbH, les anticorps sont dilués dans un tampon acide, une condition classique utilisée pour greffer des immunoglobulines sur de telles surfaces *i.e.* dans un tampon acétate à 0,1 mg/ml, pH 5 [24]. Les cinétiques de greffage sont fonction de la concentration en PAbH comme illustré dans la figure 6(c). A cette étape, toutes les terminaisons peuvent ne pas avoir été utilisées pour greffer des anticorps PAbH. Ainsi les terminaisons restantes peuvent greffer des composés protéiques provenant de l'échantillon biologique ou des anticorps fluorescents utilisés comme sonde. Ceci conduirait à l'obtention de faux positifs. Pour palier à ce problème, les surfaces sont rincées avec du PBS 1X et la couche de MUOH/MHA est désactivée en utilisant de l'Ethanolamine-HCl (1 M pH 8.5). Comme illustré figure 6(d), la SPR a été utilisée pour valider la fonctionnalité d'un tel immunosenseur en injectant une solution diluée d'un échantillon d'antigènes CMV commerciaux (Diasorin – DS in figure 6(d)). Nous avons aussi testé la possibilité de réaliser une analyse complète en utilisant un anticorps secondaire (Ab II) dans l'optique d'un dosage sandwich (figure 6(e)).

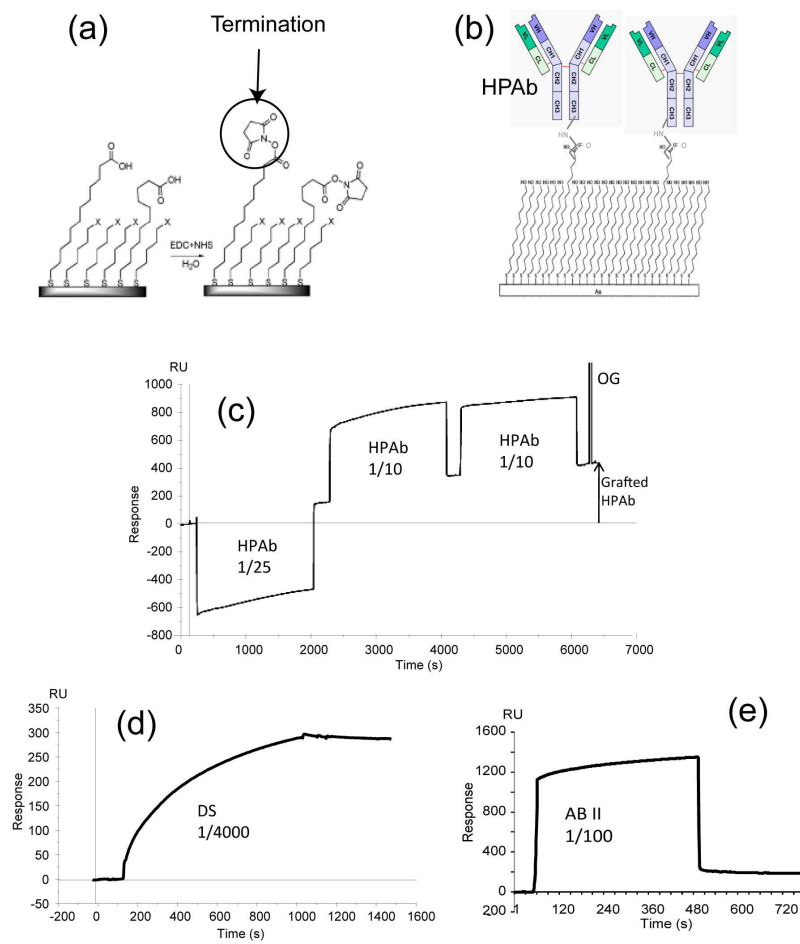


Figure 6: Validation de l'architecture du biocapteur par analyse plasmon de surface.

Détection du CMV par immunofluorescence.

La détection du CMV par immunofluorescence a été validée en trois étapes.

Dans un premier temps, des lames de microscopes fonctionnalisées ont été utilisées pour tester les performances du biocapteur seul. Pour cela, un antigène CMV commercialisé par Diasorin a servi de liquide biologique de test. Un groupe de six biocapteurs est réalisé sur chacune des lames de microscope, et diverses combinaisons biochimiques ont été testées. Le résultat est présenté sur la figure 7. On peut remarquer que quand la combinaison complète anticorps-antigènes est utilisée, le signal de fluorescence obtenu est clairement plus élevé que dans les autres cas.

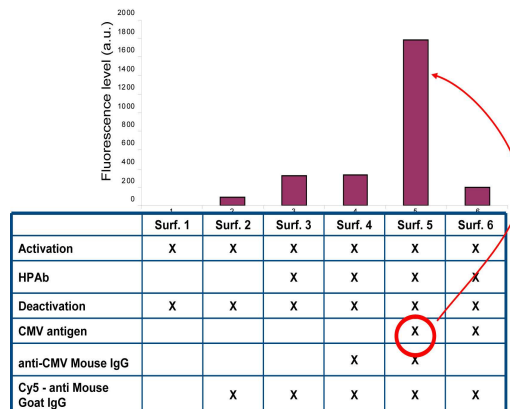


Figure 7: Validation du biocapteur avec un antigène commercial.

Dans un deuxième temps, la spécificité du biocapteur a été évaluée avec différentes protéines virales issues de cellule MRC5 infectées. Cette étape a également été effectuée sur lames de microscope multi-capteurs. La figure 8 montre le résultat obtenu avec des protéines virales d'adénovirus (ADV), de CMV ainsi qu'une comparaison avec l'antigène commercial Diasorin (DS).

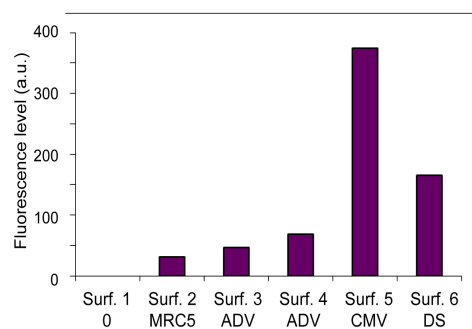


Figure 8: Spécificité de la bio-reconnaissance.

Enfin, le dispositif complet (cassette jetable et lecteur/actuateur) a été validé les mêmes protéines virales. On constate sur la figure 9 que l'intensité de fluorescence est trois fois supérieure dans le cas d'échantillons positif que dans le cas d'échantillons négatifs. Le rapport signal sur bruit de la mesure est d'environ 6.

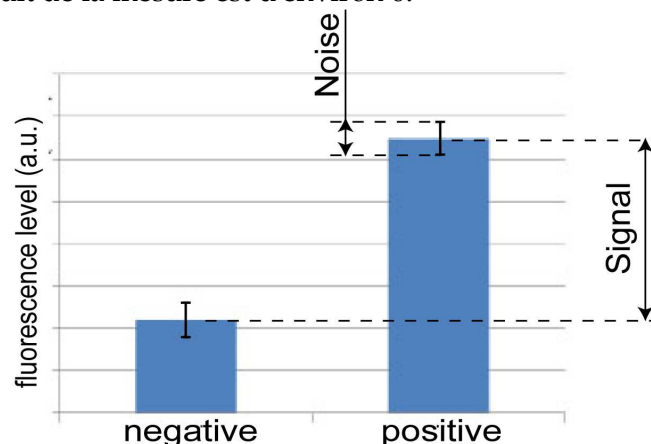


Figure 9: Validation du système complet.

Autres résultats.

Notons également qu'une nouvelle architecture de biocapteur faisant appel à des théories de plasmonique pour amplifier le signal de fluorescence a été étudiée. Nous nous attendions en effet à un signal de fluorescence relativement faible. Les résultats obtenus avec le biocapteur sans plasmonique étant suffisants pour répondre à une problématique de dépistage, le biocapteur plasmonique n'a pas été utilisé pour le présent projet et ne sera pas présenté en détail ici malgré le fait qu'il a conduit à plusieurs publications et conférences.

Positionnement par rapport à l'état de l'art actuel.

Dernièrement les laboratoires de recherche ont développés des biocapteurs mais basés principalement sur la détection de l'ADN, détection qui ne veut pas toujours signifier présence de la protéine et donc d'effets biologiques. Deux biocapteurs ont été développés : un biocapteur basé sur la détection d'un signal électrochimique et un biocapteur piézoélectrique libre de marquage.

Le premier biocapteur se base sur la production de produits de PCR biotinylés à partir de la séquence cible ADN du cytomégalo virus humain et de primers biotinylés. Ces produits biotinylés sont liés directement sur des électrodes coatées par de neutravidine (version deglycosylée de l'avidine). L'immobilisation des cibles ADN et leur hybridation avec une sonde de détection marquée à la digoxigénine sont réalisées en une même étape suivie par un marquage phosphatase alcaline. Ce marquage permettra de déterminer le nombre d'hybrides formés. Une deuxième enzyme d'amplification a également été testée et permet de faire reculer la limite de détection d'un facteur 100 [25].

Le second biocapteur a été développé pour mettre en évidence des pratiques de dopage faisant intervenir des transferts de gènes. Le but est de développer des capteurs piézoélectriques basés sur la détection d'ADN mais sans marquage, pour détecter les séquences cibles, parmi lesquelles le promoteur du cytomégalo virus, utilisées comme marqueur de transgénèse (modification héréditaire d'un génome à la suite de l'intégration et de l'expression d'un gène étranger) dans les cellules animales et humaines. Ce système permet de détecter de l'ADN transgénique présent dans des cellules humaines transformées avec différents plasmides contenant par exemple les séquences promotrices du cytomégalo virus, d'une manière sélective et reproductible [26].

Ces deux systèmes sont basés sur la détection de séquences nucléiques uniquement, nécessitant de posséder un appareillage, des connaissances techniques particulières et une préparation de l'échantillon incompatible avec un dépistage en masse du CMV.

Nous avons pu mettre au point un dispositif embarqué simple à utiliser et permettant de mettre en évidence la présence du cytomégalo virus en détectant la présence de protéines virales.

C.5 EXPLOITATION DES RESULTATS

Le projet a produit 4 articles scientifiques dans des revues internationales, 15 conférences nationales et internationales. Il a permis le dépôt d'un brevet et d'une enveloppe Soleau. Un second brevet est actuellement à l'étude. Enfin, ce projet dont l'impact médico-

social est avéré a donné lieu à 10 interventions dans la presse (écrite, internet et radiophonique).

C.6 DISCUSSION

Pour faire le point sur l'état d'avancement des travaux, il peut être intéressant de comparer le système tel qu'on l'avait pensé au début du projet et dont on rappelle un schéma sur la figure ci-dessous.

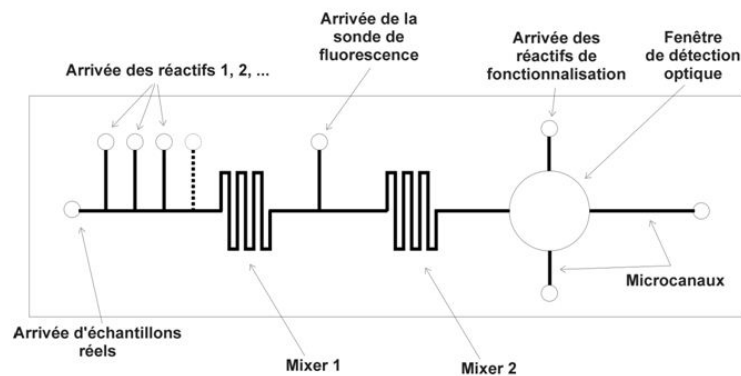


Figure 10 : Schéma du dispositif tel qu'imaginé au début du projet.

Si l'on compare ce schéma avec le prototype réalisé et présenté en figure 3, on peut juger du développement apporté, notamment en termes de compacité et de gestion des fluides et de la lecture optique.

Nous avons largement atteint les objectifs et ce, malgré les énormes difficultés que nous avons rencontrées concernant les anticorps de capture. En effet, nous nous sommes aperçus que des anticorps antiCMV présentant des propriétés de capture satisfaisantes ne sont pas disponibles dans le commerce. Pour en arriver à ce constat de longs mois de dur labeur ont été nécessaires. Nous nous sommes ensuite tournés vers la Société Biotem pour sous-traiter la fabrication de ce nouveau type d'anticorps. Nouvelle déconvenue. Ce sont finalement les partenaires virologistes qui ont trouvé la solution en fabriquant nos propres anticorps.

D'une manière plus générale, le schéma ci-dessous présente les étapes nécessaires au développement d'un dispositif médical, depuis l'émergence d'une idée associée à un besoin jusqu'à sa mise sur le marché [27]. (Ce schéma a été élaboré par certains partenaires du projet MEDICALIP lors de la mise en place de la plateforme MicroTechSanté).

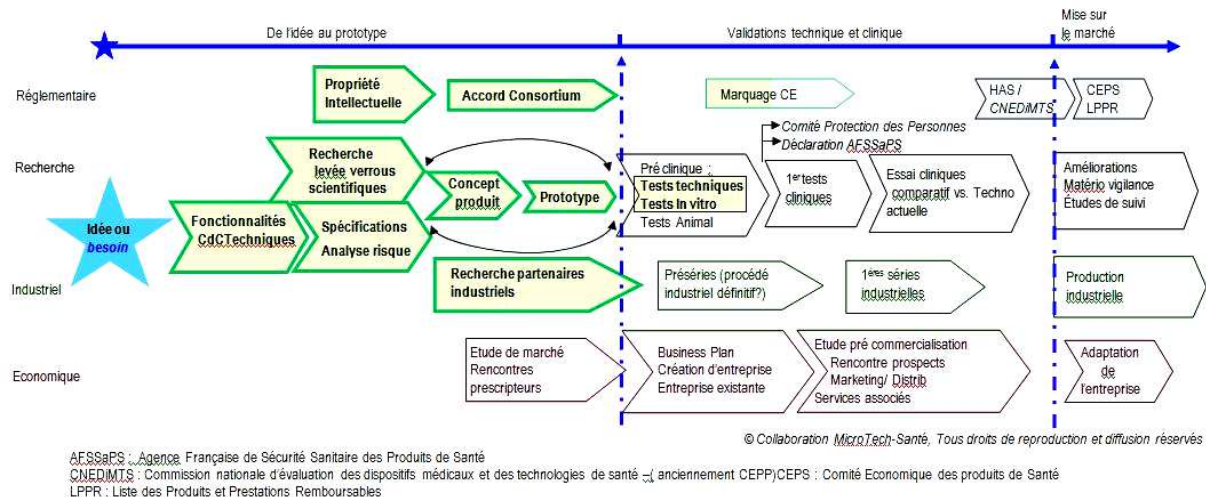


Figure 11 : Etapes de développement d'un dispositif médical [25].

L'émergence de l'idée et du besoin, étoile bleue à gauche du diagramme, fait suite aux réflexions que nous menions déjà avant le début du présent projet dans le domaine des dépistages à la naissance au sens large. La problématique du dépistage du CMV avait été abordée à cette époque. L'obtention du financement ANR MEDICALIP a permis d'entreprendre la phase de recherche nécessaire à la mise au point finale d'un dispositif de dépistage. Les étapes franchies grâce à l'ANR sont représentées en vert dans le schéma ci-dessus.

A l'heure actuelle, nous avons obtenu un financement complémentaire par l'INSERM et la DGOS dans le cadre d'un appel à projet de recherche translationnelle, appels à projets réservés aux Centres d'Investigation Clinique. Ce financement nous permet de continuer les efforts entrepris grâce à l'ANR et concerne plus particulièrement les essais pré-cliniques (ou plus particulièrement les validations techniques en situation clinique), la continuation des tests *in vitro* en termes de rhéologie du liquide d'aspiration gastrique et la continuation des démarches de marquage CE, et la soumission des protocoles de validation auprès du Comité de Protection des Personnes. Dans ce domaine, un dispositif ergonomique de recueil du liquide d'aspiration gastrique est à l'étude et devrait faire l'objet d'une demande de dépôt de brevet.

C.7 CONCLUSIONS

Pour conclure, nous pouvons dire que les travaux décrits ici constituent la phase de recherche (aujourd'hui achevée) du programme complet. La phase de validation technique en situation clinique vient de débuter et les étapes de validation clinique suivront. A terme, nous pourrions mettre à disposition un dispositif de dépistage du CMV chez les nouveau-nés.

Un aspect important concerne le caractère générique des solutions développées pour le dépistage du CMV. Tous les fluides nécessaires à la détection du virus par immuno-fluorescence sont présents dans la cassette. Dès lors, le système complet peut être adapté à n'importe quel type de virus ou de pathogène pour peu que le dépistage des pathologies associées soit préconisé. En effet, on peut très bien imaginer différentes cassettes jetables correspondant chacune à un pathogène à détecter. Le type de pathogène visé par la fonctionnalisation spécifique du biocapteur peut être repéré sur la cassette au moyen d'un

code barre par exemple. Ainsi, un lecteur de code barre intégré au lecteur/actuateur reconnaît le pathogène ciblé et règle automatiquement le système avec les débits, les temps d'incubation et la sensibilité de lecture adéquats. Cette fonctionnalité est d'ores et déjà prise en compte dans le logiciel de pilotage du dispositif.

Dans cette optique, un lecteur de plaque ELISA à fluorescence a été développé et sera utilisé pour tester, en immunofluorescence ELISA, l'architecture biochimique des biocapteurs qui seront développés pour la détection de ces pathogènes.

Enfin, tout le travail effectué dans le cadre de ce projet ne peut être résumé dans ce compte rendu, ni même être communiqué en annexe. Cependant, les quelques 700 pages de rapports d'activités transmis à l'ANR au cours du projet peuvent être demandées au porteur du projet. Les rapports de stages des étudiants ayant apporté leur concours sont également disponibles (1 Stage de Master 1, 2 stages de fin d'étude et 2 projets tutorés pour l'Ecole d'Ingénieurs Biomédicaux ISIFC).

C.8 REFERENCES

- [1] S. Stagno, R.F. Pass, G. Cloud, W.J. Britt, R.E. Henderson, P.D. Walton, D.A. Veren, F. Page, C.A. Alford, Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome, JAMA 256 (1986) 1904–1908.
- [2] K. Ahlfors, S.A. Ivarsson, S. Harris, Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature, Scand J Infect Dis. 31 (1999) 443–457.
- [3] M.A. Gaytant, E.A. Steegers, B.A. Semmekrot, H.M. Merkus, J.M. Galama, Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome, Obstet. Gynecol. Surv. 57 (2002) 245–256.
- [4] M.M. Mussi-Pinhata, A.Y. Yamamoto, R.M. Moura Brito, M. de Lima Isaac, P.F. de Carvalho e Oliveira, S. Boppana, W.J. Britt, Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population, Clin Infect Dis. 49 (2009) 522–528.
- [5] A.Y. Yamamoto, M.M. Mussi-Pinhata, P. Cristina, G. Pinto, L.T. Moraes Figueiredo, S.M. Jorge, Congenital cytomegalovirus infection in preterm and full-term newborn infants from a population with a high seroprevalence rate, Pediatr. Infect. Dis. J. 20 (2001) 188–192.
- [6] S. Panhani, K.M. Heinonen, Screening for congenital cytomegalovirus infection among preterm infants born before the 34th gestational week in Finland, Scand. J. Infect. Dis. 26 (1994) 375–378.
- [7] B.D. Raynor, Cytomegalovirus infection in pregnancy, Semin. Perinatol. 17 (1993) 394–402.
- [8] G. Nigro, M. Mazzocco, M.M. Anceschi, R. La Torre, G. Antonelli, E.V. Cosmi, Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection after primary or recurrent maternal infection, Obstet. Gynecol. 94 (1999) 909–914.
- [9] R.F. Pass, Cytomegalovirus infection, Pediatr. Rev. 23 (2002) 163–170.
- [10] S.B. Boppana, R.F. Pass, W.J. Britt, S. Stagno, C.A. Alford, Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality, Pediatr. Infect. Dis. J. 11 (1992) 93–99.

- [11] A. Pultoo, H. Jankee, G. Meetoo, M.N. Pyndiah, G. Khittoo, Detection of cytomegalovirus in urine of hearing-impaired and mentally retarded children by PCR and cell culture, *J. Commun. Dis.* 32 (2000) 101–108.
- [12] T. Lazzarotto, S. Varani, B. Guerra, A. Nicolosi, M. Lanari, M.P. Landini, Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection, *J. Pediatr.* 137 (2000) 90–95.
- [13] M.G. Revello, G. Gerna, Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant, *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2002) 680–715.
- [14] http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/CMV_synth.pdf
- [15] Y. Yinon, D. Farine, M.H. Yudin, R. Gagnon, L. Hudon, M. Basso, H. Bos, M.F. Delisle, S. Menticoglou, W. Mundle, A. Ouellet, T. Pressey, A. Roggensack, M. Boucher, E. Castillo, A. Gruslin, D.M. Money, K. Murphy, G. Ogilvie, C. Paquet, N. Van Eyk, J. Van Schalkwyk, Cytomegalovirus infection in pregnancy, *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 32 (2010) 348–354.
- [16] K.B. Fowler, A.J. Dahle, S.B. Boppana, R.F. Pass, Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? *J. Pediatr.* 135 (1999) 60–64.
- [17] G.L. Demmler-Harrison, Congenital cytomegalovirus: public health action towards awareness, prevention, and treatment, *J. of Clin. Virol.*, 46 suppl. 4 (2009) S1–5.
- [18] S.B. Boppana, S.A. Ross, Z. Novak, M. Shimamura, R.W. Tolan Jr, A.L. Palmer, A. Ahmed, M.G. Michaels, P.J. Sánchez, D.I. Bernstein, W.J. Britt, K.B. Fowler, Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection, *JAMA.* 14 (2010) 1375–1382.
- [19] K. Huikko, R. Kostiainen, T. Kotiaho, Introduction to micro-analytical systems : bioanalytical and pharmaceutical applications, *Eur. J. of Pharmaceutical Sciences*, 20 (2003) 149–171.
- [20] H. Anderson, A. van den Berg, Microfluidic devices for cellonics : a review, *Sens. & Act. B*, 92 (2003) 315–325.
- [21] C.S. Liao, G.B. Lee, H.S. Liu, T.M. Hsieh, C.H. Luo, Miniature RT-PCR system for diagnosis of RNA-based viruses, *Nucleic Acids Res.*, 33 (2005) e156.
- [22] J.C. Park, Y.S. Park, E.H. Kim, Oligonucleotide chip composition for analyzing hepatitis c virus (hcv) genotype and detecting method thereof, Patent US2004170957, 2004.
- [23] W. Boireau, A. Rouleau, G. Lucchi, P. Ducoroy, Revisited BIA-MS combination: Entire "on-a-chip" processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomol levels, *Biosens. and Bioelec.*, 24 (2009) 1121–1127.
- [24] F. Kardous, B. Simon, R. Yahiaoui, J.F. Manceau, W. Boireau, Improving immunosensor performances using an acoustic mixer on droplet microarray, *Biosens. and Bioelec.*, *In Press*, (2010) doi:10.1016/j.bios.2010.09.007.
- [25] Rochelet-Dequaire M, Djellouli N, Limoges B, Brossier P. Bienzymatic-based electrochemical DNA biosensors: a way to lower the detection limit of hybridization assays. *Analyst.* 2009 Feb;134(2):349–53.
- [26] Scarano S, Spiriti MM, Tigli G, Bogani P, Buiatti M, Mascini M, Minunni M. Affinity sensing for transgenes detection in antidoping control. *Anal Chem.* 2009 Dec 1;81(23):9571–7.

- [27] A. Moreau-Gaudry, L. Pazart, Développement d'une innovation technologique en santé : le cycle CREPS Concept – Recherche – Essais – Produit – Soins, IRBM, Vol. 31, N° 1, pp 12-21, 2010.

D LISTE DES LIVRABLES

Livrables initialement prévus.

TABLEAU DE SYNTHÈSE DES LIVRABLES ET DES JALONS			
Tâches	Intitulé et nature des livrables et des jalons	Date de fourniture <i>nombre de mois à compter de T0</i>	Partenaire responsable du livrable/jalon
1. Etude macroscopique			
	1.1 Fourniture d'un cahier des charges complet	T0+2	5
	1.2 Surface fonctionnalisées (macroscopique)	T0+6	1
	1.3 Détection optique du matériel viral	T0+10	1
2. Première étude microscopique			
	2.1 Détermination du matériau et de la section des canaux	T0+2	1
	2.2 Micro-système pour échantillons calibrés	T0+14	1
3. Deuxième étude microscopique			
	3.1 Micro-système pour échantillons réels	T0+24	1
	3.2 Définition d'un prototype	T0+28	4
4. Première étude microscopique			
	4.1 Marquage CE	T0+28	5
	4.2 Validation technique au lit du nouveau-né	T0+36	1

Livrables en fin de projet.

TABLEAU DE SYNTHESE DES LIVRABLES ET DES JALONS					
Tâches	Intitulé et nature des livrables et des jalons	Date de fourniture <i>nombre de mois à compter de T0</i>			Partenaire responsable du livrable/jalon
		prévue initialement	reprévue	réalisée	
1. Etude macroscopique					
	L1.1 Fourniture d'un cahier des charges complet	M2		M2	5
	L1.2 Surface fonctionnalisées (macroscopique)	M6		M18	1
	L1.3 Détection optique du matériel viral : 2 systèmes optique (sous-traitance DISO et Système ESE)	M10		M12	1
2. Première étude microscopique					
	L2.1 Détermination du matériau et de la section des canaux	M2		M18	1

	L2.2 Micro-système pour échantillons calibrés	M14		Idem L3.1	1
3. Deuxième étude microscopique					
	L3.1 Micro-système pour échantillons réels	M24		M24	1
	L3.2 Définition d'un prototype (1 ^{er} prototype programmable)	M28		M30	4
4. Seconde étude macroscopique					
	L4.1 Marquage CE	M28	M42 M48	Toujours en cours la fin du projet. Un travail important réalisé pendant le projet sur l'analyse des risques et la mise en cohérence de toutes nos actions vis-à-vis du marquage CE.	5
	L4.2 Validation technique au lit du nouveau-né	M36	M48	Reportée sur un financement INSERM/DGOS (nombre trop important d'enfants à tester dans le cadre de cette ANR)	4
5. Piégeage et révélation optique du CMV					
	L5.1 Avec antigène commercial	M34		M34	1
	L5.2 Avec cellules infectées par surnageants de culture virale sérum de patient et échantillons gastriques	M36	M40		1
	L5.3 Etude <i>in situ</i> des contraintes d'ergonomie pour validation technique			M40	2
6. Prototype figé - nouvelle architecture de cassettes					
	L6.1 Définition de la nouvelle architecture des cassettes adaptables sur l'appareil standard d'aspiration gastrique			M43	4
	L6.2 Validation cassette avec liquide gastrique frais (aspect fluide)	M34		M41	1

				Initiée lors du programme ANR et poursuivie sur un financement INSERM/DGOS (entre 1000 et 2000 PCR sont nécessaires d'après les données biostatistiques. Ne peut donc pas rentrer dans le cadre de cette ANR).	
	L6.3 Validation cassette avec liquide gastrique (Détection banque d'échantillons test)	M36	M41 M46		1

E IMPACT DU PROJET

Afin d'apprécier l'impact de ce projet, voici un texte tiré de la MicroNews de Décembre 2010 du Pôle de Compétitivité Microtechnique de Franche-Comté.

[...] Porté par FEMTO-ST en partenariat avec le CHU de Besançon, l'unité mixte INSERM-Université-CNRS 1053 de Toulouse, les entreprises STATICE SANTE et ALCIS, le programme MEDICALIP a réuni nombre d'acteurs régionaux et nationaux. Biologistes, médecins, pédiatres, chercheurs et industriels ont travaillé ensemble pour que ce qui était une idée correspondant à un besoin devienne au final un produit disponible sur le marché.

MEDICALIP illustre la méthode de travail initiée par la Commission médicale du Pôle des microtechniques qui a toujours souhaité réunir tous les acteurs et toutes les compétences au service du projet. Résultat pour MEDICALIP : « un formidable resserrement des liens » se réjouit Alain Coaquette, Docteur en médecine, « l'acquisition de la technologies d'intégration de bio-puces dans les dispositifs médicaux » relève Pascal Schoeb, Directeur de STATICE SANTE, « un vrai projet multipartenarial », dit encore Lionel Pazart, Docteur en médecine, responsable du CIC-IT.

A travers MEDICALIP, c'est un modèle de structuration de filière qui prend forme. C'est une organisation d'innovation au service de la santé qui s'est mise en place. Elle s'articule autour de 3 structures :

- un groupement d'intérêt scientifique,
- une plate-forme collaborative (MicroTechSanté) qui permet aux médecins, chirurgiens, professionnels de santé... d'exprimer leur besoin et de faire progresser leurs travaux,
- un réseau d'industriels (Commission médicale du Pôle) qui participent à l'étude et travaillent sur la fabrication et la commercialisation du dispositif médical innovant. [...]

E.1 INDICATEURS D'IMPACT

Nombre de publications et de communications (à détailler en E.2)

		Publications multipartenaires	Publications monopartenaires
International	Revue à comité de lecture	2	2
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage		
	Communications (conférence)	7	6
France	Revue à comité de lecture		
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage		
	Communications (conférence)	2	2
Actions de diffusion	Articles vulgarisation		
	Conférences vulgarisation		
	Autres: Articles de presse écrite et internet, interview radio	10	

Autres valorisations scientifiques (à détailler en E.3)

	Nombre, années et commentaires (valorisations avérées ou probables)
Brevets internationaux obtenus	
Brevet internationaux en cours d'obtention	1
Brevets nationaux obtenus	
Brevet nationaux en cours d'obtention	
Licences d'exploitation (obtention / cession)	
Créations d'entreprises ou essaimage	
Nouveaux projets collaboratifs	4 nouveaux projets accompagnés de 3 brevets en cours d'obtention (SmartTransfuser, RCT MEDICALIP, RCT Smart, IPSORTE)
Colloques scientifiques	
Autres (préciser)	1 enveloppe Soleau et un second brevet à l'étude

E.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

1. Revues à comité de lecture.

- 1 "Gold/Silica biochips: applications to surface plasmon resonance and fluorescence quenching", Thomas Mangeat, A. Berthier, Céline Elie-Caille, Maude Perrin, Wilfrid Boireau, Christian Pieralli and Bruno Wacogne, Laser Physics, Vol. 19, n° 2, pp. 252-258, 2009.
- 2 "Gold/Silica thin film for biosensors application : Metal Enhanced Fluorescence", A. Renier, T. Mangeat, H. Benalia, C. Elie-Caille, C. Pieralli and B. Wacogne, Laser Physics, Vol. 20, N° 3, pp. 591-595, 2010.

- 3 **"Newborn screening: a mobile device for screening the cytomegalovirus at the newborn's bed"**, B. Wacogne, T. Mangeat, J.S. Guerrini, H. Benalia, C. Pieralli, A. Rouleau, W. Boireau, A. Coaquette, G. Herbein, C. Davrinche, and L. Pazart, à paraître dans Journal of Medical Devices, 2011.
- 4 **"The MEDICALIP Project: toward the screening of the cytomegalovirus"**, B. Wacogne, T. Mangeat, J.S. Guerrini, H. Benalia, C. Pieralli, A. Rouleau, W. Boireau, A. Coaquette, G. Herbein, C. Davrinche, and L. Pazart, à paraître dans Ingénierie et Recherche Biomédicale, 2011.

2. Conférences invitées dans des congrès.

- 1 **"Microsystèmes et biocapteurs optiques"**, B. Wacogne, C. Pieralli, T. Mangeat, C. Elie-Caille, M. Perrin, W. Boireau, R. Zeggari, F. Vidberg and C. Roux, Conférence Invitée, Salon International MEDTEC France, 22-23 Avril 2009, Besançon, France.
- 2 **"Un exemple de biocapteur optique : le projet MEDICALIP"**, B. Wacogne, Conférence invitée, Salon International MEDTEC France, 21-22 Avril 2010, Besançon France.

3. Actes de colloques à comité de lecture.

- 1 **"A mobile device for screening the cytomegalovirus at the newborn's bed"**, T. Mangeat, J.S. Guerrini, H. Benalia, C. Pieralli, A. Rouleau, W. Boireau, A. Coaquette, G. Herbein, C. Davrinche, L. Pazart and B. Wacogne, Poster, Eurosensors 2010, 5-8 September 2010, Linz, Austria, Proceedings Procedia Engineering, Vol. 5, pp. 1320-1323, 2010.
- 2 **"Detection of the cytomegalovirus: a mobile device and a disposable cartridge for detection at the patient's bed"**, T. Mangeat, J.S. Guerrini, H. Benalia, C. Pieralli, A. Rouleau, W. Boireau, A. Coaquette, G. Herbein, C. Davrinche, L. Pazart and B. Wacogne, Conférence, Biodevices 2011, Rome, Italy, proceedings à paraître.

4. Communications à des congrès, symposium.

- 1 **"Au/SiO_x biochip for application in surface plasmon resonance and metal enhanced fluorescence"**, T. Mangeat, C. Elie-Caille, M. Perrin, W. Boireau, C. Pieralli and B. Wacogne, Poster, 10th World Congress on Biosensors, May 14-16 2008, Shanghai, Chine, 2008.
- 2 **"Gold/Silica biochips: applications to surface plasmon resonance and fluorescence quenching"**, Thomas Mangeat, Céline Alie-Caille, Maud Perrin, Wilfrid Boireau, Christian Pieralli and Bruno Wacogne, Conférence, LPHYS'08, 30 June-4 July 2008, Trondheim, Norway.

- 3 **"Quelques capteurs optiques pour applications en biomedical"**, B. Wacogne, C. Pieralli, T. Mangeat, C. Elie-Caille, M. Perrin, W. Boireau, R. Zegarri, F. Vidberg and C. Roux, Conférence, Salon EPMT, 12-15 Mai 2009, Lausanne, Suisse.

- 4 **"Bio-capteurs optiques à fluorescence : une nouvelle architecture pour amplifier les signaux de fluorescence"**, A. Renier, T. Mangeat, H. Benalia, C. Elie-Caille, C. Pieralli and B. Wacogne, 1^o Journée Scientifique de la plateforme interrégional de protéomique CLIP, Poster, 26 Mai 2009, Besançon, France.

- 5 **"Gold/Silica thin film for biosensors application : Surface Plasmon Resonance and Metal Enhanced Fluorescence"**, A. Renier, T. Mangeat, H. Benalia, C. Elie-Caille, C. Pieralli and B. Wacogne, Conférence, LPHYS'09, 13-17 July 2009, Barcelona, Spain.

- 6 **"Bio-capteurs optiques à fluorescence : une nouvelle architecture pour amplifier les signaux de fluorescence"**, A. Renier, T. Mangeat, H. Benalia, C. Elie-Caille, C. Pieralli and B. Wacogne, 14^o Journées d'Ingénierie Biomédicale, Poster, 9-11 Septembre 2009, Strasbourg, France.

- 7 **"Biosensor with amplified fluorescence by means of a new structure design"**, A. Renier, T. Mangeat, H. Benalia, C. Elie-Caille, C. Pieralli and B. Wacogne, Conférence, CEMD'09, 19-21 November 2009, Beijing, China.

- 8 **"Virus detection at the patient's bed"**, T. Mangeat, J.S. Gerrini, H. Benalia, C. Pieralli, A. Rouleau, W. Boireau, A. Coaquette, G. Herbein, C. Davrinche, L. Pazart and B. Wacogne, Conférence, LPHYS'10, 5-9 July 2010, Foz do Iguaçu, Brazil.

- 9 **« Le projet MEDICALIP »**, T. Mangeat, J.S. Guerrini, H. Benalia, C. Pieralli, A. Rouleau, W. Boireau, A. Coaquette, G. Herbein, C. Davrinche, L. Pazart and B. Wacogne, Conférence, 1ere Journée du GIS IMIS, 3 Juin 2010, CCI du Doubs, Besançon, France.

- 10 **"Un dispositif médical innovant pour les nouveau-nés"**, T. Mangeat, J.S. Guerrini, H. Benalia, C. Pieralli, A. Rouleau, W. Boireau, A. Coaquette, G. Herbein, C. Davrinche, L. Pazart and B. Wacogne, Conférence, Salon International MICRONORA, 1 Octobre 2010, Besançon, France.

- 11 **"Au/SiO_x biochip for application in surface plasmon resonance and metal enhanced fluorescence"**, T. Mangeat, C. Elie-Caille, M. Perrin, W. Boireau, C. Pieralli, O. Gaiffe and B. Wacogne, Poster, Ateliers du LEA "Les microtechniques dans le quotidien", 16-17 Septembre 2010, Arc-et-Senans, France.

- 12 **"Screening of the cytomegalovirus : an automated tool for rapid detection at the newborn's bed"**, B. Wacogne, T. Mangeat, J.S. Guerrini, H. Benalia, C. Pieralli, A. Rouleau, W. Boireau, A. Coaquette, G. Herbein, C. Davrinche, and L. Pazart, conference, World Congress on Biotechnology, 21-23 March 2011, Hyderabad, India.

- 13 "Optofluidic detection of viruses at the patient's bed: application to the cytomegalovirus", B. Wacogne, A. Vejux, T. Mangeat, J.S. Guerrini, H. Benalia, C. Pieralli, A. Rouleau, W. Boireau, A. Coaquette, G. Herbein, C. Davrinche, and L. Pazart, soumis à Lab-On-Chip European Congress, 30 June-1 July 2011, Hamburg, Germany, 2011.

E.3 LISTE DES ELEMENTS DE VALORISATION

Brevet

- 1 B. Wacogne, C. Pieralli, W. Boireau, T. Mangeat, A. Coaquette, L. Pazart, C. Davrinche, S. Piranda et J.F. Delforge, "**Dispositif à usage unique pour la détection de particules d'intérêt, telles que des entités biologiques, système de détection comprenant ledit dispositif et procédé de mise en œuvre**", demande dépôt de brevet français enregistrée le 29 Septembre 2009, N° 0904633. Extension PCT à l'étranger en cours.
2. Un second brevet est actuellement à l'étude sur un système ergonomique d'aspiration gastrique.

Enveloppes Soleau

- 1 "**Microsystème embarqué pour le diagnostic des infections à cytomegalovirus au lit du patient**", (par ordre alphabétique) Boireau Wilfrid, Coaquette Alain, Davrinche Christian, Delforge Jean-François, Pazart Lionel, Pieralli Christian, Piranda Serge, Wacogne Bruno, enregistrée à l'INPI le 27 Mars 2007, N° 286444.

- *logiciels et tout autre prototype*

NA

- *actions de normalisation*

La société ALCIS, spécialisée en affaires réglementaires dans le domaine biomédical, est partenaire de ce projet. Dès le début du projet, elle a assuré une tâche de fond (tâche 0) qui avait pour but d'encadrer tous les travaux de manière à ce que les solutions étudiées soient compatibles avec un futur marquage CE du dispositif.

Les démarches vis-à-vis du marquage CE, initialement prévues dans le cadre du projet, ne peuvent aboutir dans le seul périmètre de ce financement ANR. L'obtention du marquage CE nécessite la mise en place d'essais clinique sur plusieurs milliers de prématurés, ce qui dépasse de loin le cadre de l'actuel projet. En revanche, toutes les étapes accomplies jusqu'à maintenant sont en accord avec l'analyse des risques conduite sur les 4 ans qu'a duré cette étude.

- *lancement de produit ou service, nouveau projet, contrat,...*

Lancement de produit

La phase recherche de ce projet (financement ANR) est désormais achevée. Nous entreprenons les essais techniques en situation clinique en ce moment même. Lorsque les validations cliniques auront été achevées et que le marquage CE aura été obtenu, nous disposerons alors d'un dispositif médical innovant prêt à être commercialisé si le dépistage du CMV à grande échelle est préconisé par les autorités de santé.

Nouveaux projets

Le consortium mis en place dans le cadre de ce projet est également impliqué dans de nouveaux projets. Ces nouveaux projets concernent les recherches translationnelles liées à MEDICALIP, la sécurité transfusionnelle et la recherche translationnelle correspondante ainsi que le dépistage de certaines pathologies cardio-vasculaires, notamment en direction des diabétiques.

- *le développement d'un nouveau partenariat,*

Voir ci-dessus

- *la création d'une plate-forme à la disposition d'une communauté*

Le projet MEDICALIP a servi de projet "exemple" pour la mise en place de la plateforme MicroTechSanté, parallèlement à la création d'un Centre d'Investigation Clinique en Innovation Technologique. Cette plateforme apporte une aide aux porteurs de projets de recherche et développement dans le domaine de la santé. Les domaines d'intervention concerne les aspects de recherche, la santé, les aspects réglementaires et économiques.

De même, le projet MEDICALIP représente un projet phare pour la commission biomédicale du pôle de compétitivité microtechnique de Franche-Comté. La commission a mis en place un réseau de compétence des entreprises régionales ayant des activités dans le domaine biomédical (audit d'entreprise, accompagnement en termes de certification, mise en place d'un guichet unique pour les appels d'offres, journées de formations et d'informations, mise à disposition d'ingénieurs qualifiés en temps partagé sous forme de portage salarial,...).

Les membres du consortium MEDICALIP sont impliqués dans la création et l'animation de ces structures.

- *création d'entreprise, essaimage, levées de fonds*

NA

- *autres (ouverture internationale,...)*

Suite à ces travaux et aux nouveaux projets qui ont vus le jour grâce à lui, le porteur du projet a été recruté au CHU de Besançon par le biais d'un Contrat Hospitalier de Recherche Translationnelle (appel d'offre INSERM/DGOS). Il bénéficie à ce titre d'un cumul d'emploi au Centre d'Investigation Clinique et Innovations Technologiques (unité INSERM CIT 808).

E.4 BILAN ET SUIVI DES PERSONNELS RECRUTES EN CDD (HORS STAGIAIRES)

Identification				Avant le recrutement sur le projet			Recrutement sur le projet				Après le projet				
Nom et prénom	Sexe H/F	Adresse email (1)	Date des dernières nouvelles	Dernier diplôme obtenu au moment du recrutement	Lieu d'études (France, UE, hors UE)	Expérience prof. Antérieure, y compris post-docs (ans)	Partenaire ayant embauché la personne	Poste dans le projet (2)	Durée missions (mois) (3)	Date de fin de mission sur le projet	Devenir professionnel (4)	Type d'employeur (5)	Type d'emploi (6)	Lien au projet ANR (7)	Valorisation expérience (8)
Perrin Maud	F	maud.perrin@hotmail.fr	Décembre 2010	DEUST	France	Technicienne de laboratoire	FEMTO-ST	Technicienne	21	31/10/2008	Recherche d'emploi			Non	Non
Séraphine Vizoso	F	seraphine.vizoso@tele2.fr	Aout 2008	Doctorat	France	ARC Boulogne	CHU Besançon	IR	12	31/08/2008	Recherche d'emploi			Non	Non
Jean-Sébastien Guerrini-Chapuis	H	guerrini_jean_sebastien@hotmail.com	Décembre 2010	Doctorat	France	Thèse	CHU Besançon	IR	23	30/09/2010	Chef d'entreprise			Non	Non
Thomas Mangeat	H	mangeat@unistra.fr	Décembre 2010	Doctorat	France	Thèse	FEMTO-ST	IR	23.5	31/12/2008	IR (CDI) Université de Strasbourg	Enseignement et recherche publique	IR	Non	Oui
Hichem Benalia	H	hichem.benalia@femto-st.fr	Aujourd'hui	Doctorat	Algérie et France	IR Centrale de technologie MIMENTO	FEMTO-ST	IR	19.5		IR(CDD)	Enseignement et recherche publique	IR	Non	Oui