

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR7199 / UMRS1147

THÈSE

présentée par :

Jean-François BARTOLO

soutenue le : **22 Septembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie / Sciences Chimiques

**Développement de sondes et de
systèmes microfluidiques pour la
détection de nouveaux biomarqueurs
spécifiques**

THÈSE dirigée par :

**Mme TALY Valérie
(M. SPECHT Alexandre)**

Docteur, CNRS, Université de Strasbourg
Docteur, CNRS, Université de Strasbourg (**Membre invité**)

RAPPORTEURS :

**Mme POTIER Marie-Claude
M. VIOVY Jean-Louis**

Docteur, Institut du Cerveau et de la Moelle (ICM), Paris
Professeur, Institut Curie, Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. MISLIN Gaëtan

Docteur, Université de Strasbourg

À mon père,

Remerciements

Voici plus de quatre ans que cette thèse a débuté, m'entraînant, bien au-delà de la science, dans une aventure humaine des plus enrichissantes. Si ces quelques années n'ont pas toujours été de tout repos, elles m'auront néanmoins permis d'avoir un regard plus objectif sur ce qu'est le métier de chercheur. Pour cela, je tenais à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont permis de réaliser cette thèse, en m'apportant leur expérience et leur soutien.

En premier lieu, je pense qu'il est tout naturel, surtout après cette longue période de rédaction, de remercier, avec une profonde sincérité, ma directrice de thèse, Valérie Taly, pour m'avoir accueilli dans son équipe et aidé à obtenir un financement pour ce projet de thèse. Je tenais tout particulièrement à te remercier pour avoir eu la patience nécessaire pour m'encadrer durant ces quatre dernières années. Je tiens également à remercier mon co-directeur de thèse, Alexandre Specht, pour m'avoir offert la possibilité de continuer, du moins partiellement, cette thèse dans notre si belle région qu'est l'Alsace, et d'avoir toujours été disponible quand j'en avais besoin. Je voudrais également remercier mon encadrant non-officiel, Sylvain Ladame, pour m'avoir, d'une certaine manière, permis d'entreprendre cette thèse, ainsi que pour m'avoir permis de venir passer ces quelques mois à Londres. Je tenais à te remercier particulièrement pour ton aide et ton soutien durant ces dernières années.

Je tiens ensuite à remercier Andrew Griffith, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que toute l'équipe du Laboratoire de Biologie Chimique. Je souhaitais remercier plus particulièrement Deniz, Youss, Btisse et Estelle pour leur contribution dans ces travaux de thèse. Merci à Antoine, Raphael, Bachir et Michael pour leur soutien, pas toujours scientifique, mais d'une grande aide tout de même. Merci à Chaouki pour ton aide, même si elle ne fut pas toujours précieuse, et d'être comme tu es. Merci à Thomas pour ces parties de Volleyball endiablées et pour ton aide précieuse dans la réalisation de ce manuscrit (même involontaire). Enfin, merci à Majdi pour ces quelques moments d'anthologies, pas toujours très sérieux, passé durant ces quelques années de travail commun, ainsi que pour tes précieux conseils.

Je tiens également à remercier les personnes rencontrées durant mon séjour en Angleterre, et plus particulièrement Claudia, pour avoir été si prévenante à mon égard.

Je tiens aussi à remercier l'équipe de Chimie et Neurobiologie Moléculaire pour m'avoir accueillie et aidée durant mes furtives apparitions. Merci particulièrement à Chloé, Adeline, Damien, Mahboubi (célèbre inventeur de la Mahboubine) et Sebastien.

Je souhaite remercier également Pierre Laurent-Puig pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que toute l'équipe du laboratoire de Bases Moléculaires de la Réponse aux Xénobiotiques. Je souhaitais encore une fois remercier plus particulièrement Karla, Eleonora, Fanny, Corinne, Abdel, Ouriel et Heng pour leurs aides diverses durant ces dernières années. Merci à Philippe pour ton aide scientifique et administrative précieuse. Merci à Hinesh, pour ta grande participation dans ces travaux de thèse et ta bonne humeur. Enfin merci particulièrement à Sonia et Zakaria pour votre soutien et votre aide plus que précieux durant ces dernière années.

J'aimerais également exprimer ma profonde gratitude aux rapporteurs, Marie-Claude Potier et Jean-Louis Viovy, ainsi qu'à Gaëtan Mislin, pour avoir généreusement accepté de prendre de leur temps afin d'évaluer ce travail de thèse.

Si ces remerciements sont également l'occasion de dire à nos proches l'importance qu'ils ont eu dans l'aboutissement de ces études, je tiens à leurs exprimer tout le bonheur que j'ai de les avoir à mes côtés au quotidien. Merci à tous mes amis, sans qui ces dernières années n'aurait surement pas été si plaisantes. Merci à ma famille pour son soutien sans faille et le bonheur qu'elle m'a apporté jusque-là. Merci infiniment à mes parents, qui, à leur manière, ont fait de moi la personne que je suis et ont grandement contribué à l'aboutissement de ces études.

Enfin, Mélanie, les mots manquent pour exprimer à quel point je te suis reconnaissant pour m'avoir supporté et soutenu durant ces longues années d'étude. Merci.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNdb : ADN double brin

ADNg : ADN génomique

ADNmt : ADN mitochondrial

ADNsb : ADN simple brin

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfert

CMC : Concentration Micellaire Critique

CV : Coefficient de Variance

dPCR : PCR digitale

FRET : Förster Resonance Energy Transfert

ePCR : PCR en émulsion

LNA : Locked Nucleic Acid

miARN : microARN

NTC : No Template Control

OTR : Oligonucleotide-Templated Reaction

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDMS Poly(DiMethylSiloxane)

PEG : PolyEthylène Glycol

PNA : Peptide Nucleic Acid

qPCR : PCR quantitative

QUAL : Quenched Auto-Ligation

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RT-PCR : Reverse Transcription PCR

RISC : RNA-Induced Silencing Complex

SAM : Self-Assembled Monolayer

SNP : Single-Nucleotide Polymorphisms

Sommaire

Introduction générale	1
1. Les biomarqueurs	1
1.1. Le biomarqueur idéal.....	2
1.2. Les différents biomarqueurs en diagnostique.....	2
1.2.1. L'ADN comme biomarqueur.....	2
1.2.1.1. Polymorphisme nucléotidique.....	3
1.2.1.2. Méthylations sur l'ADN.....	3
1.2.1.3. Mutations sur l'ADN mitochondriale.....	4
1.2.2. Les protéines comme biomarqueurs.....	4
1.2.3. Les ARN comme biomarqueurs.....	4
1.2.4. Les microARN (miARN).....	5
1.2.4.1. Intérêt des miRNA en diagnostic.....	6
1.2.4.2. Principales méthodes de détection des microRNA.....	7
2. La réaction en chaine par polymérase (PCR)	18
2.1. Principe de la PCR.....	18
2.2. La PCR en "temps réel".....	18
2.2.1. Les sondes TaqMan®.....	19
2.2.2. Les sondes FRET avec accepteur de fluorescence.....	20
2.2.3. Les "baliese moléculaires".....	21
2.2.4. Les sondes Scorpions.....	21
2.3. La PCR digitale (dPCR).....	22
2.3.1. Principe de la dPCR et distribution de Poisson.....	23
2.3.2. Applications de la dPCR.....	24
3. Réactions induites par hybridation nucléotidique (OTR)	27
3.1. Principes et perspectives offerts par les OTR.....	28
3.2. Application à la détection de séquences oligonucléotidiques spécifiques.....	29
3.2.1. Détection par transfert d'énergie fluorescent (FRET) impliquant la formation d'une liaison covalente.....	30
3.2.2. Détection par restauration d'un signal de fluorescence.....	31
3.2.3. Détection par réaction fluorogénique.....	32
4. Microfluidique digitale	34
4.1. Principes et généralités.....	34
4.1.1. Le régime laminaire.....	34
4.1.2. Production de goutte : la microfluidique digitale.....	36
4.1.3. La jonction en T.....	37
4.1.4. La focalisation hydrodynamique.....	39

4.1.5. Comparaison entre la jonction en T et la focalisation hydrodynamique.....	41
4.1.6. Autres méthodes de production de microgouttelettes.....	42
4.1.7. Double émulsion.....	43
4.1.8. Phénomène de mouillage.....	44
4.2. Tensioactifs et stabilité des microgouttelettes.....	46
4.2.1. Stabilité des émulsions.....	47
4.2.2. Compatibilité des tensioactifs.....	49
4.3. Techniques et applications.....	50
4.3.1. Les puces microfluidiques.....	50
4.3.2. Mélange et diffusion dans les microgoutteltes.....	51
4.3.3. Division des microgouttelettes.....	52
4.3.4. Incubation des microgouttelettes.....	53
4.3.5. Fusion des microgouttelettes et pcoinjection.....	55
4.3.6. Analyse et tri des microgouttelettes.....	58
4.4. Applications biologiques de la microfluidique digitale.....	60
4.4.1. Amplification de l'ADN en microgouttelettes.....	61
4.4.2. Détection de mutations rares sur l'ADN.....	62
Objectif du travail de thèse.....	65
Chapitre 1. Développement et études d'une nouvelle gamme de tensioactifs fluorés.....	69
1. Introduction.....	69
2. Matériels et méthodes.....	71
2.1. Réactifs.....	71
2.2. Synthèse générale des tensioactifs Kry-jeffa.....	71
2.3. Méthode de caractérisation des tensioactifs.....	73
2.4. Production et réinjection de microémulsions.....	74
2.5. Système de détection de fluorescence sur puce.....	74
2.6. Culture cellulaire.....	76
3. Résultats et discussion.....	76
3.1. Etude de stabilité des émulsions.....	76
3.1.1. Etude en chambre de coalescence.....	77
3.1.2. Etude en production-collecte-réinjection.....	80
3.1.3. Etude de la stabilisation des émulsions avec une incubation en ligne de délai.....	82
3.1.4. Etude de la stabilisé des émulsions lors de leur thermocyclage.....	84
3.2. Etude de biocompatibilité.....	86
3.2.1. Etude de l'effet des tensioactifs synthétisés sur la survie cellulaire.....	86
3.2.2. Etude sur la compatibilité des réactions enzymatiques.....	88
3.3. Etude de la fuite de composés au sein des émulsions.....	89
4. Conclusion.....	91
Chapitre 2. Développement et étude de nouvelles sondes fluorogéniques.....	95

1. Introduction	95
2. Matériels et méthodes	96
2.1. Réactifs	96
2.2. Synthèse de l'acide 2-(3,3-diméthyl-2-méthylèneindolin-1-yl) acétique	96
2.3. Synthèse de l'acide 2-((E)-2-(formylméthylène)-3,3-diméthylindolin-1-yl) acétique	97
2.4. Synthèse de la Coumarine 334	98
2.5. Synthèse de la Coumarine 334 "désactivée"	98
2.6. Synthèse des sondes PNA	99
2.6.1. Synthèse peptidique sur support solide : méthode générale	99
2.6.2. Synthèse des sondes PNA-Cy3	100
2.6.3. Synthèse des sondes PNA-Coumarine-Thiol	101
2.7. Procédure expérimentale pour l'étude des sondes PNA-Cy3	101
2.8. Procédure expérimentale pour l'étude des sondes PNA-Coum-Thiol	102
2.9. Production et réinjection de microémulsions	102
3. Résultats et discussion	103
3.1. Etude des sondes PNA-Cy3	104
3.1.1. Sensibilité des sondes PNA-Cy3	104
3.1.2. Spécificité des sondes PNA-Cy3	106
3.2. Etude des sondes PNA-Coum-Thiol	107
3.2.1. Sensibilité des sondes PNA-Coum-Thiol pour la détection de miR-132	108
3.2.2. Spécificité des sondes PNA-Coum-Thiol pour la détection de miR-132	109
3.2.3. Spécificité des sondes PNA-Coum-Thiol pour la détection de mutations ponctuelles	111
3.2.4. Sensibilité et spécificité des sondes PNA-Coum-Thiol pour la détection de l'allèle muté de gènes de l'EGFR (p.T790M)	112
3.3. Intégration des sondes à l'outil microfluidique	114
3.3.1. Sensibilité des sondes PNA-Coum-Thiol en microfluidique digitale	115
3.3.2. Spécificité des sondes PNA-Coum-Thiol en microfluidique digitale	116
4. Conclusion	117

Chapitre 3. Développement d'une méthode de détection de microARN en PCR digitale en gouttelettes

1. Introduction	121
2. Matériels et méthodes	124
2.1. Réactifs	124
2.2. Extraction des miARN	124
2.3. Amplification des séquences ciblées de miARN par RT-qPCR	124
2.4. Les sondes PCR	126
2.5. Utilisation des stations Raindrop [®]	126
3. Résultats et discussion	127
3.1. Analyse des échantillons d'ARN HCT 116 en RT-PCR "deux étapes"	128
3.1.1. Analyse des échantillons en qPCR	128
3.1.2. Analyse des échantillons en duplex dPCR en gouttelettes	129

3.1.3. Analyse des échantillons en triplex dPCR en gouttelettes.....	134
3.1.4. Analyse des échantillons en quadruplex ePCR.....	136
3.2. Analyse des échantillons d'ARN HCT 116 en RT-PCR "une étape".....	138
3.2.1. Analyse des échantillons en RT-qPCR.....	139
3.2.2. Analyse des échantillons en RT-dPCR en gouttelettes (kit AgPath-ID® One-Step RT-PCR).....	140
3.2.3. Analyse des échantillons en RT-PCR en microgouttelettes (kit TaqMan® One-Step RT-PCR).....	144
4. Conclusion	147
Conclusions et perspectives	151
Annexes	157
Bibliographie	175

Introduction

1. Les biomarqueurs

Historiquement, si le terme de biomarqueur commence à apparaître dans la littérature au cours des années 60, la protéine de Bence-Jones, observée dans les urines pour certaines maladies du sang par Henry Bence-Jones au milieu du XIXe siècle, peut être considérée comme le premier marqueur biologique ayant fait l'objet d'études. Bien plus tard, différents travaux ont permis de mettre au point des méthodes de quantification de protéines associées à certaines pathologies, notamment dans des cas de maladies cardiovasculaires (Ladue *et al.* 1954, Rosalki 1967) ou de cancers (Moore *et al.* 1971). De nos jours, la découverte et l'étude de nouveaux biomarqueurs est devenue un enjeu majeur pour l'industrie pharmaceutique et la recherche médicale (Matheis *et al.* 2011).

Les biomarqueurs peuvent être définis, de manière générale, comme des paramètres biologiques mesurables tels qu'un indicateur physiologique, un processus pathologique ou encore une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique (Jain, 2010). Ils peuvent décrire, pour exemple, une altération de la pression artérielle, ou encore une variation de la concentration sanguine en glucose. Les altérations au niveau cellulaire, sur l'ADN, les ARN, les métabolites ou encore sur le niveau d'expression des protéines, peuvent être regroupées sous le terme de "biomarqueurs moléculaires", et constituent une des principales sources d'intérêt en recherche biologique (Jain, 2010).

Les biomarqueurs peuvent être étudiés pour trois principales applications : (i) le suivi du développement et de la progression d'une maladie à travers le temps et la corrélation avec des signes cliniques observables (diagnostic) ; (ii) l'observation des effets d'un traitement médicamenteux sur l'organisme (pharmacodynamique) ; (iii) le contrôle et le suivi de patients à l'effet d'une intervention thérapeutique (pronostic).

L'application clinique de différentes techniques moléculaires pour la détection et le suivi de pathologies humaines peut être définie par le terme de "diagnostic moléculaire". Il s'agit d'un terme général regroupant différentes méthodes d'analyse de biomolécules, basées sur l'étude de l'ADN, des ARN ou encore des protéines. Il existe à ce jour un nombre important de méthodes de détection de ces biomarqueurs moléculaires. Ces méthodes font l'objet d'une constante évolution afin d'augmenter leurs rendements (analyse d'un grand nombre de marqueurs en un minimum de temps), leurs efficacités et leurs sensibilités (détection d'une variation infime de l'état physiologique). Si les techniques de diagnostics moléculaires sont à l'origine de la découverte de

nouveaux biomarqueurs, ces derniers sont également à l'origine de l'évolution de ces différentes techniques. Nous reviendrons au cours de ce chapitre sur quelques exemples de techniques usuelles de détection et d'analyse de biomarqueurs moléculaires.

1.1. Le biomarqueur idéal

D'un point de vue pratique, les biomarqueurs doivent représenter, de façon spécifique et avec une grande sensibilité, l'état d'avancement d'une maladie, aussi bien pour une application diagnostique que pour le suivi de patients, pendant et après une intervention thérapeutique. On peut donc définir trois points primordiaux pour caractériser un biomarqueur idéal (Jain 2010):

- (i) ce dernier doit être associé spécifiquement à une pathologie ou un organe atteint et doit permettre de définir l'état d'avancement de la maladie avant l'apparition de manifestations cliniques observables ;
- (ii) une analyse de ce biomarqueur doit pouvoir être réalisée à partir d'échantillons biologiques prélevés de manière simple et non-invasive, tels que le sang, l'urine ou les selles ;
- (iii) une méthode de détection rapide, simple, précise et peu coûteuse doit permettre l'analyse de ces échantillons biologiques et la comparaison avec des points de mesure standardisés servant de référence.

1.2. Les différents biomarqueurs en diagnostic

On répertorie aujourd'hui un grand nombre de biomarqueurs, allant de métabolites simples tels que les carbohydrates (e.g., glucose), les acides aminés, les lipides ou encore les vitamines, à des molécules plus complexes telles que les protéines ou les acides nucléiques. Grâce aux récentes évolutions technologiques, ces derniers font l'objet d'études considérables pour leurs potentielles applications diagnostiques. Le champ des biomarqueurs étant vaste, nous n'aborderons ici qu'un nombre restreint d'exemples avec une étude particulière sur le cas des microARN (miARN).

1.2.1. L'ADN comme biomarqueur

L'information génétique est contenue dans les cellules sous la forme d'acides désoxyribonucléiques (ADN). L'ADN est une macromolécule constituée de deux brins, associés sous forme d'une double

hélice par des liaisons hydrogènes (de type Watson-Crick). Chaque brin est composé d'un assemblage linéaire de différents nucléotides formant le code génétique. L'expression des gènes contenus dans les molécules d'ADN est à l'origine de toute la machinerie cellulaire. Une modification dans sa structure nucléotidique peut entraîner une réaction en cascade conduisant à la survenue d'une pathologie. Pour exemple, la dégénérescence d'une cellule saine en cellule tumorale provient de l'altération dans la séquence de certains gènes spécifiques, en particulier ceux impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire. Les modifications (mutations, méthylations, etc...) sur la structure de l'ADN étant la cause de nombreuses maladies, elles sont aujourd'hui l'objet d'un intérêt conséquent pour la recherche de nouveaux biomarqueurs en diagnostic.

1.2.1.1. Polymorphisme nucléotidique

Le polymorphisme nucléotidique (SNP, acronyme de l'anglais "Single-Nucleotide Polymorphisms") correspond à la variation ponctuelle d'une base unique sur un gène. Ce polymorphisme représente la forme la plus abondante de variation génétique dans le génome humain ($\approx 80\%$) et permet, notamment, de distinguer l'ADN de différents individus. Les SNP s'observent, en moyenne, à une fréquence de 1 pour 500 paires de bases, ce qui correspond à plus de 6 millions de variations ponctuelles à travers l'ADN (Jain 2010). L'identification des SNP est importante dans la compréhension de l'origine génétique de nombreuses pathologies humaines.

1.2.1.2. Méthylations sur l'ADN

Ce processus correspond à la méthylation d'une base cytosine de l'ADN (formant une 5-méthylcytosine) par une enzyme ADN méthyltransférase (DNMT). Il s'agit d'un mécanisme cellulaire réversible de contrôle de l'expression des gènes (les gènes les plus méthylés étant les moins exprimés dans la cellule). Si le rôle exact de ces méthylations n'est pas encore totalement identifié, il semblerait qu'elles jouent un rôle important dans les mécanismes de différenciation cellulaire ainsi que dans le développement embryonnaire (Sarraf *et al.* 2004). Un important nombre d'études a permis de mettre en évidence une corrélation entre des "erreurs" de méthylation et certaines maladies telles que le cancer, le lupus, la dystrophie musculaire ou encore certaines pathologies innées (Robertson 2005). Dans le cas particulier du cancer, il a été mis en évidence une hypométhylation générale de l'ADN des cellules tumorales en comparaison des cellules saines, et une hyperméthylation des gènes responsables de la régulation du cycle cellulaire et des mécanismes de réparation de l'ADN. En pratique, la détection d'hyperméthylations sur l'ADN, dans certains cas de cancer, tel que le cancer colorectal (CRC), peuvent servir de biomarqueurs pour cette maladie.

1.2.1.3. Mutations sur l'ADN mitochondrial

Contrairement à l'ADN génomique, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est localisé dans des microorganites, les mitochondries, présents en grand nombre dans les cellules. L'ADNmt comporte certains gènes responsables de la production de protéines nécessaires aux processus de production de l'énergie cellulaire. Différents travaux ont mis en évidence une corrélation entre des dommages causés à l'ADNmt et certaines maladies (Jain 2010, Copeland *et al.* 2014). Les principaux dommages observés sont dûs à des mutations ponctuelles ou des réarrangements du génome mitochondrial. Le nombre de copies important de l'ADNmt présent dans les cellules en fait un biomarqueur d'intérêt en diagnostic.

1.2.2. Les protéines comme biomarqueurs

Les protéines sont des macromolécules issues de l'assemblage de différents acides aminés lors du processus de traduction. Ces composés sont impliqués dans toute la machinerie cellulaire avec des rôles divers, notamment dans l'organisation de la structure de la cellule (protéines de structures), la signalisation inter- et intracellulaire (protéines membranaires), ou dans les réactions de métabolisme cellulaires (enzymes). Les protéines peuvent être utilisées comme marqueur de l'expression de certains gènes. Pour exemple, on observe une augmentation de la quantité cellulaire de certaines protéines intervenant dans les facteurs de proliférations (e.g. Hsp27, protéine anti-apoptotique) dans les cellules tumorales colorectales (Ciocca *et al.* 2005, Zimmermann *et al.* 2014).

1.2.3. Les ARN comme biomarqueurs

Les acides ribonucléiques sont l'autre grande famille d'acides nucléiques présents dans l'organisme. Au contraire des molécules d'ADN, ils sont constitués d'une structure simple brin, dans laquelle les bases pyrimidiques thymine sont remplacées par des uraciles. Les ARN peuvent être regroupés en deux grandes catégories, (i) les ARN codants, contenant l'information nécessaire au processus de traduction (formation de protéines), qui sont regroupés sous le terme d'ARN messenger (ARNm) ; (ii) les ARN ne codant pas pour des protéines, regroupés sous le terme d'ARN non-codant (ARNnc) et comportant, entre autres, les ARN ribosomiques (ARNr), les ARN de transfert (ARNt), impliqués tous deux dans le processus de traduction, ou encore les miARN, impliqués dans différents mécanismes de contrôle cellulaire.

Les ARNm, tout comme les protéines, peuvent être utilisés comme marqueurs de l'expression de certains gènes. Pour exemples, l'étude de l'expression des ARNm issues d'échantillons sanguins peut

être utilisée pour le suivi de l'évolution de cancers colorectaux (Zhang *et al.* 2014). Les ARNm sont également observables dans la salive et peuvent être utilisés comme biomarqueurs de cancer de la région buccale (Park *et al.* 2006). Dans ce cas, l'association des ARNm salivaires avec des macromolécules spécifiques permet d'empêcher leurs dégradations. Cependant, la limite de l'utilisation de ces cibles comme biomarqueurs provient de leur instabilité, provoquant leur dégradation rapide une fois extraite d'échantillons biologiques. Ainsi, le résultat des mesures du niveau d'expression des ARNm doit être interprété avec une grande précaution. Pour résoudre ce problème d'instabilité, différentes stratégies ont été élaborées, notamment le système PAXgene®, développé par Qiagen, pour l'analyse d'échantillons sanguins (Debey-Pascher *et al.* 2009).

1.2.4. Les microARN

Les miARN sont des petits ARN non codants d'environ 19 à 24 nucléotides. Ils ont été étudiés pour la première fois au début des années 90 dans le cadre de l'étude du gène *lin-4* dans la régulation de l'expression du gène *lin-14* chez *C. elegans* (Lee *et al.* 1993). C'est seulement au début des années 2000, après la découverte d'un second ARN non-codant, *Let-7*, également impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes (Lagos-Quintana *et al.* 2001), que le terme de microARN est né. On connaît à ce jour plus de 1400 miARNs recensés chez l'homme (répertoriés dans une base de données appelée miRBase) et on estime qu'ils régulent l'expression de plus de 60% des gènes codants pour des protéines (Esteller 2011).

Les miARNs sont transcrits sous la forme de précurseurs appelés miARN primaires (pri-miARN) puis clivés partiellement au niveau du noyau cellulaire pour former un pré-miARN long d'environ 70 nucléotides. Ce pré-miARN va ensuite être transporté en direction du cytosol avant d'être partiellement clivé une seconde fois pour former enfin le complexe RISC (RNA-induced silencing complexe) par assemblage avec différentes protéines (Krol *et al.* 2010) (**Figure 1**).

Ce complexe agit comme régulateur de certains gènes cibles, fonction du miARN qu'il comporte. On distingue deux voies de contrôle de l'expression des gènes dépendant de RISC : i) le complexe reconnaît un site spécifique au sein de l'ARN messager (ARNm) cible, s'y fixe par complémentarité de base entre ARN (messager et micro) et induit son clivage qui entraînera sa dégradation (Huntvagner *et al.* 2002 ; Kasschau *et al.* 2003) ; ii) le complexe se fixe au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm cible et réprime son expression en empêchant sa transcription (Doench *et al.* 2003).

Puisqu'ils sont impliqués dans le contrôle de l'expression de certains gènes, les miARNs apparaissent comme de potentiels biomarqueurs du dérèglement cellulaire. Ainsi, le rôle des miARN, notamment dans le développement de tumeurs, fait, à ce jour, l'objet de nombreuses études (Mogilyansky *et al.* 2013, Hayes *et al.* 2014, Boele *et al.* 2014).

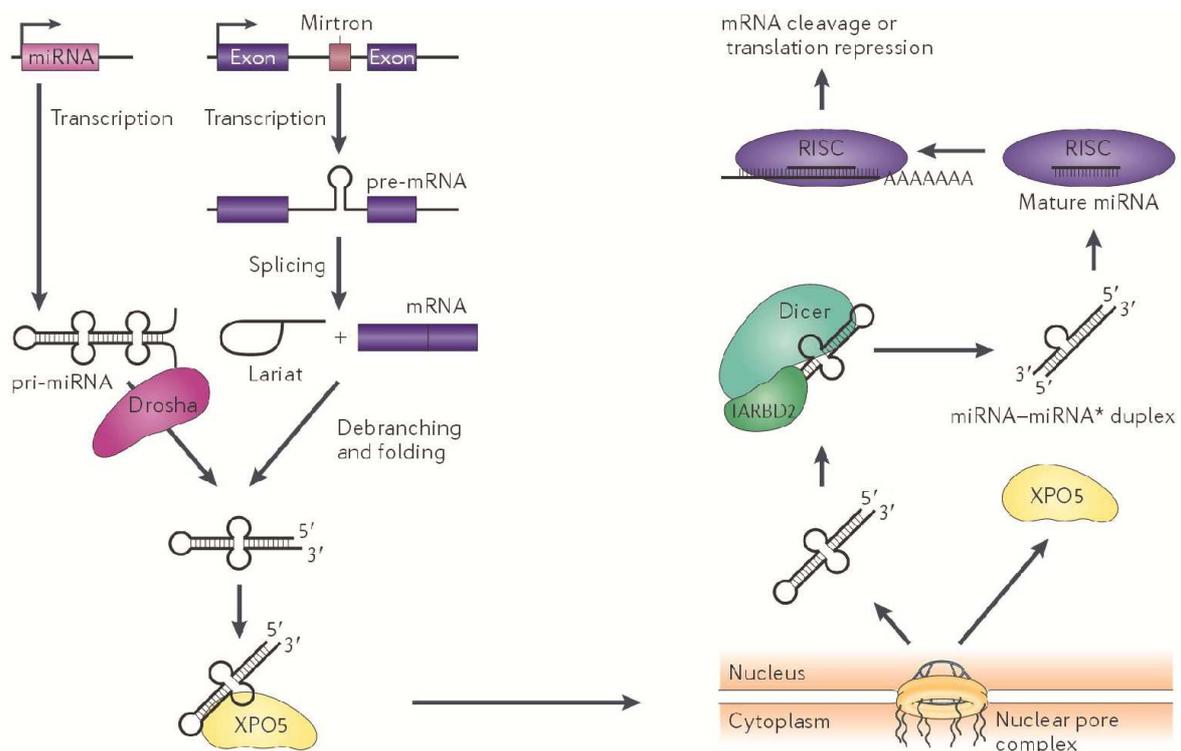


Figure 1 : Biogénèse et intégration de microARN dans la machinerie cellulaire : les microARN sont transcrits sous forme d'unités individuelles (pri-miARN) ou accompagnés de gènes hôtes (mirtrons). Après le clivage du pri-miARN par l'enzyme Drosha ou du mirtron par une enzyme de débranchement, le pré-miARN formé est transféré du noyau au cytosol par une enzyme de transport exportine 5 (XPO5). Le pré-miARN est à nouveau clivé au niveau du cytosol en microARN mature par un complexe protéique Dicer – TARBD2, avant d'intégrer le complexe RISC qui agira sur le contrôle de l'expression protéique cellulaire. (figure issue de Esteller 2011).

1.2.4.1. Intérêt des miRNA en diagnostic

Dans une étude de 2005, Lu et al. ont analysé 217 miARN issus de 334 échantillons cliniques provenant de patients atteints de cancers (Lu *et al.* 2005). Les résultats obtenus démontrent une corrélation étroite entre le profil d'expression des miARN et le stade de développement des tumeurs ainsi que leurs origines. Depuis, un nombre important d'études ont été réalisées sur la dérégulation de l'expression des miARN dans de nombreuses pathologies ainsi que sur leurs rôles dans les processus cellulaires. Différents modèles d'expression des miARN ont été rapportés comme potentiels biomarqueurs pour la détection précoce, la classification et le suivi de différentes maladies, principalement en oncologie, mais également pour les maladies cardiovasculaires (Huang *et al.* 2010, Ikeda et al. 2010, Fuller *et al.* 2014), rhumatismales (Stanczyk *et al.* 2008, Mookherjee *et al.* 2013), métaboliques (Lynn 2009, Regazzi 2010) ou pour des pathologies liées au dérèglement du système nerveux (Hebert *et al.* 2009, Hebert *et al.* 2009, Elramah *et al.* 2014).

Les miARN sont impliqués dans le contrôle de différents processus cellulaires tels que la prolifération, l'adhésion, l'apoptose ou l'angiogenèse, et la dérégulation de leur niveau d'expression a un rôle important dans le développement et la progression de cancers (Lynam-Lennon *et al.* 2009, Ruan *et al.* 2009). Ainsi, une surexpression de miR-21, miR-182 et Let7-5a, de même qu'une sous-expression de miR-145 et miR-155 ont été observées dans des lignées cellulaires issues de cancer du sein, de la prostate et du poumon (Rao *et al.* 2010). D'autres études ont démontré une modification du profil en miARN dans le cas de leucémies lymphocytaires chroniques (Kminkova *et al.* 2014, Veronese *et al.* 2014), ou de cancer du sein (Rask *et al.* 2014, Sochor *et al.* 2014), des ovaires (Li *et al.* 2014) et de la prostate (Karatas *et al.* 2014). Ces profils d'expression sont généralement obtenus à partir de tissus ou de lignées cellulaires, mais certaines études ont démontré la possibilité d'utiliser des échantillons de plasma ou de sérum (Leidinger *et al.* 2010, Ayaz *et al.* 2014), ainsi que des échantillons de selles pour ces analyses (Link *et al.* 2010).

Le taux de survie de patients atteint de cancer dépend généralement de l'état d'avancement de la maladie au moment de son dépistage, un diagnostic précoce se traduisant généralement par un meilleur pronostic. L'étude de l'expression des miARN à un stade primaire de la maladie peut donc servir de biomarqueurs pour un diagnostic précoce. Différents travaux réalisés sur des échantillons de sang (Heneghan *et al.* 2010, Huang *et al.* 2010) ou de salive (Gallo *et al.* 2010) ont mis en évidence la possibilité d'étudier les miARN, de façon précoce, comme biomarqueurs diagnostiques par des méthodes non-invasives.

L'identification de l'origine tissulaire de la pathologie est également un élément important pour la mise en place d'un éventuel traitement, notamment dans le cas du cancer. Ainsi, on observe une forte surexpression de miR-182 dans les cellules métastatiques d'origine pulmonaire (Barshack *et al.* 2010, Zhu *et al.* 2014).

Enfin, la corrélation entre l'expression de miARN et l'état d'avancement de la maladie a également été étudiée dans le cas du cancer colorectal. On observe notamment que le niveau d'expression de miR-31 est plus important dans des échantillons de cellules tumorales que dans des échantillons de cellules saines, de même qu'on observe une forte augmentation de l'expression de ce miARN au stade IV de la maladie (Bandres *et al.* 2006, Yang *et al.* 2013).

1.2.4.2. Principales méthodes de détection des microRNA

La caractérisation du niveau d'expression des miARN dans un organisme apparaît aujourd'hui comme un outil potentiel important dans le diagnostic et le pronostic de certaines pathologies. Cependant, de par leurs caractéristiques intrinsèques, la détection des miARN reste à ce jour un challenge important pour les chercheurs. En effet, la faible taille des miARN matures rend inefficace les

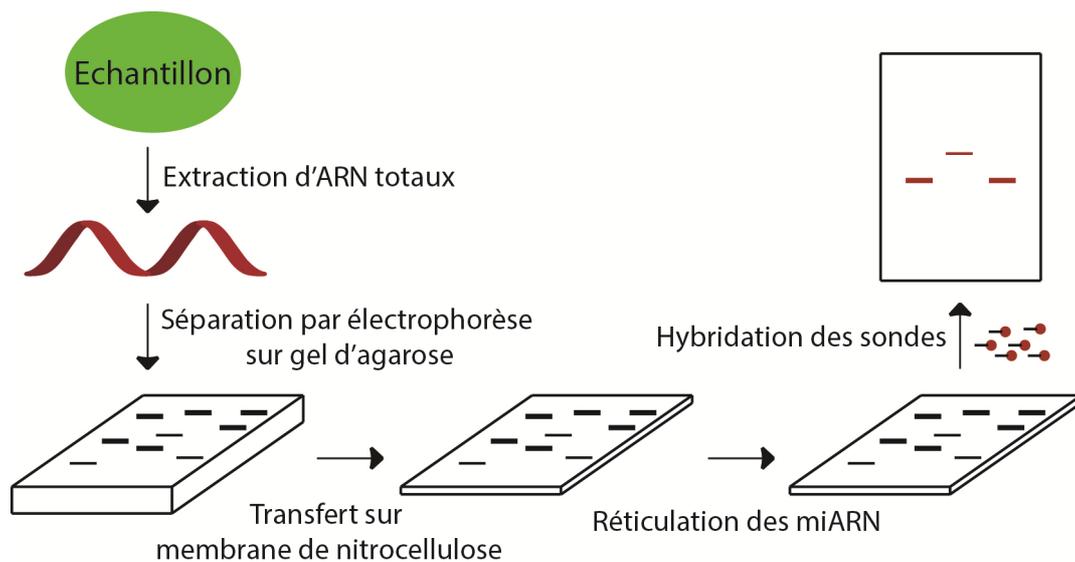
méthodes d'amplification génique conventionnelles (PCR), principalement à cause de l'impossibilité pour les amorces de se lier à leur cible. Il est également difficile de différencier chaque miARN du fait de la forte similarité entre leurs séquences, à laquelle s'ajoute également la présence de pri-miARN et pre-miARN.

Pour pallier à ces difficultés, un certain nombre de méthodes ont été mises au point au cours des dernières années, utilisant, entre autres, les techniques de « Northern blot », de puces à ADN, de réaction de transcription inverse couplée à la PCR (RT-PCR), d'hybridation *in-situ*, ou encore de séquençage haut-débit. Pour chacune des techniques qui vont être décrites ci-dessous, nous présenterons leurs avantages et leurs inconvénients et nous définirons la méthode de détection des miARN la plus avantageuse par les critères suivants ; (1) être suffisamment sensible pour obtenir une analyse quantitative de miARN, même sur une très faible quantité de matériel biologique ; (2) être suffisamment spécifique pour discriminer entre des séquences proches de miARN ; (3) être capable de réaliser plusieurs analyses simultanément (multiplexage) et enfin (4) être réalisable à un coût raisonnable.

1.2.4.2.1. La méthode de "transfert d'ARN" ou "Northern blot"

La technique de transfert d'ARN est la technique la plus classique pour la détection de miARN. Elle permet notamment l'examen de la taille et de l'expression de miARN cibles. Cette méthode consiste à faire migrer, après dépôt, un échantillon contenant les miARN ciblés sur un gel d'électrophorèse, puis de les transférer sur une membrane de nitrocellulose. Une fois le transfert réalisé, la membrane est chauffée ou exposée à un rayonnement ultra-violet (UV) afin de fixer (réticulation) les miARN de manière covalente sur le support avant leur détection par hybridation avec des sondes complémentaires fluorescentes (**Figure 2**).

Si cette technique a permis la découverte des premiers miARN, elle présente néanmoins certaines limites importantes. En effet, le faible poids moléculaire des miARN fait que leur prévalence dans l'ensemble des ARN est également très faible ce qui conduit à une mauvaise sensibilité des méthodes courantes d'analyse par transfert d'ARN. Pour pallier à ces problèmes et diminuer les temps de manipulation, de nouvelles méthodes de "Northern blot" ont été mises au point par différents laboratoires en modifiant, notamment, les sondes utilisées lors de la détection des ARN ou en améliorant les méthodes d'accroche des ARN lors du transfert sur membrane. Cependant, malgré les améliorations apportées à cette méthode, les temps de manipulation nécessaires pour sa réalisation restent trop importants en comparaison à d'autres techniques émergentes.



Figures 2 : Méthode de détection de microARN par la technique de transfert d'ARN : les ARN totaux sont extraits d'un échantillon biologique avant d'être séparés sur gel d'électrophorèse puis transférés sur membrane. Leur fixation sur la membrane suivit de l'hybridation de sondes spécifique permet l'analyse de l'échantillon.

1.2.4.2.2. L'utilisation de "Puces à ADN" ou "Microarrays"

La technique de puces à ADN est la méthode de séquençage haut-débit la plus couramment utilisée pour l'analyse de miARN (Ren *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2014). Elle permet d'étudier un grand nombre de miARN simultanément, ce qui réduit considérablement les temps de manipulation.

Cette méthode consiste à immobiliser des sondes oligonucléotidiques (ADN) de séquences identiques aux miARN cibles sur une lame de verre par des liaisons covalentes afin d'obtenir une puce prête à l'usage. Les miARN à analyser sont préalablement convertis en ADNc et agrémentés d'un ou plusieurs fluorophores spécifiques lors d'une réaction de "transcription inverse", avant d'être déposés sur la puce. Après hybridation des ADNc avec leurs séquences complémentaires, la puce est rincée puis analysée à travers l'intensité de fluorescence de chaque duplex sonde/ADNc formé pour quantifier la présence des miRNA recherchés (**Figure 3**).

Cette technique est néanmoins limitée par la faible concentration, la petite taille et les similitudes de séquences entre miRNA qui réduisent considérablement la sensibilité et la spécificité des puces à ADN. Pour pallier à ces problèmes, de nouvelles stratégies ont été mises en place, notamment en remplaçant les sondes ADN par des analogues oligonucléotidiques tels que les LNA (acronyme de l'anglais "locked nucleic acid") (Skreka *et al.* 2012) ou les PNA (acronyme de l'anglais "peptide nucleic acid") (Choi *et al.* 2013), plus spécifiques et formant des dimères plus stables. Un autre inconvénient

de cette technique réside dans la capacité à obtenir des données quantitatives puisque l'intensité du signal observé pour un miRNA donné ne fournit aucune indication sur son niveau d'expression. Enfin, le coût de fabrication des microarrays est encore très élevé et ne permet pas une utilisation routinière de cette technique.

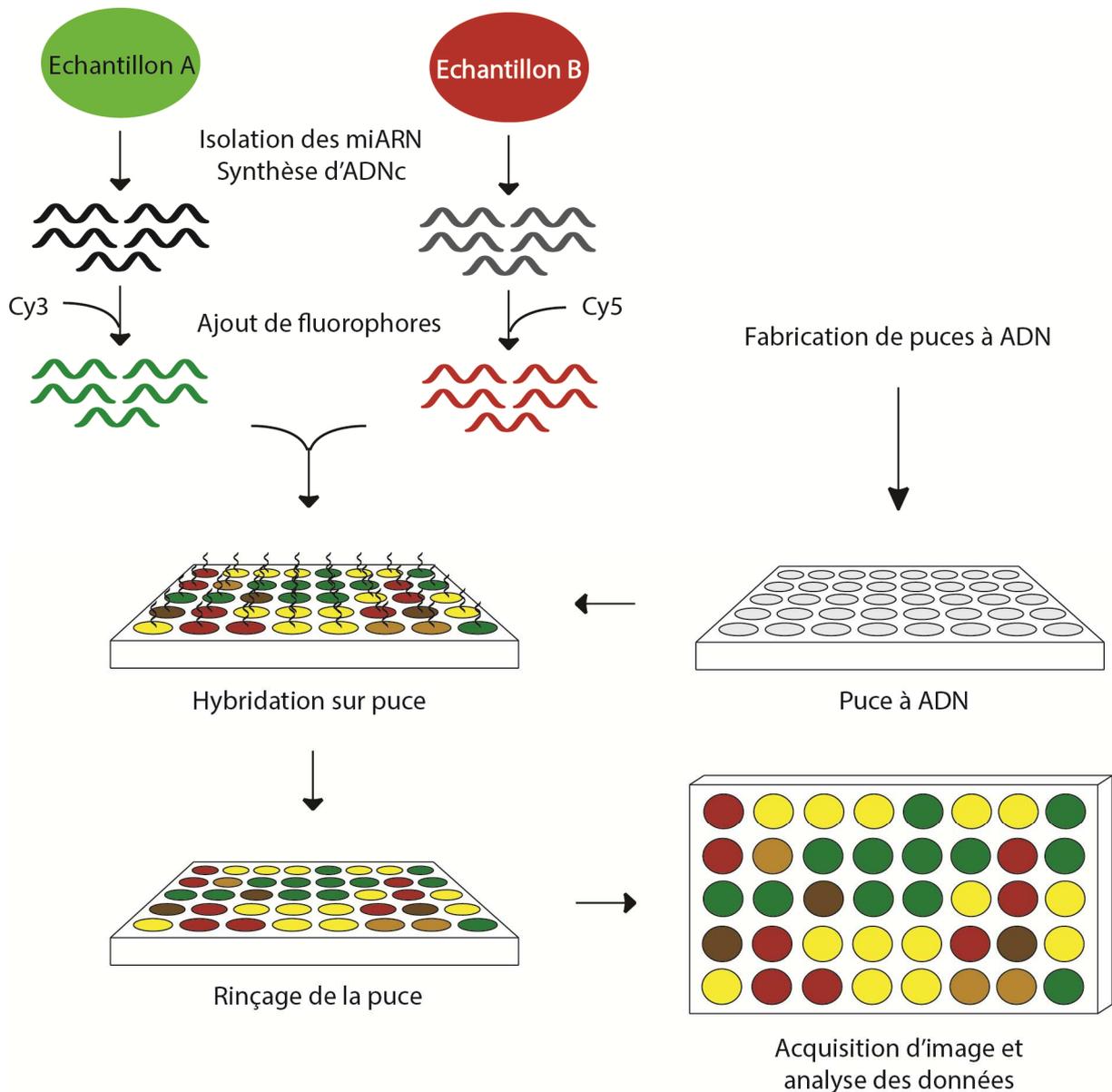


Figure 3 : Méthode de détection de microARN sur puce à ADN : cette méthode peut être divisée en six étapes principales : l'isolation des microARN et la synthèse d'ADNc, l'incorporation d'un fluorophore à la séquence, la fabrication de la puce à ADN, l'hybridation des cibles, l'acquisition d'une image, et l'analyse des données.

1.2.4.2.3. La détection électrochimique

La méthode de détection électrochimique utilise les variations de potentiel redox induites par l'hybridation des miARN ciblés sur un détecteur spécifique. Cette technique a pour avantage d'être très sensible et peu onéreuse. On distingue deux catégories de détection électrochimique, directe ou indirecte, dépendante ou non de modifications chimiques apportées aux miARN ciblés. La détection directe consiste à incuber une sonde préalablement fonctionnalisée par des fragments oligonucléotidiques (ADN, LNA, PNA) dans un milieu contenant le miARN ciblé et de mesurer la résistance de la sonde avant et après l'hybridation de la cible (**Figure 4**). En utilisant une puce présentant des nanofils fonctionnalisés de PNA, Zhang *et al.* ont démontré une limite de détection pour cette méthode de 1 femtomolaire (fM) et une capacité de discrimination dans le changement d'une base unique de la séquence de let-7b (Zhang *et al.* 2009).

La détection indirecte consiste à lier un composé électro-catalytique au miARN ciblé après son hybridation sur la sonde. Ce composé va permettre une réaction oxydative dont le potentiel va être mesuré et analysé. La limite de détection de cette méthode est de l'ordre du fM, ce qui correspond aux limites de détection des techniques basées sur l'utilisation de la réaction de PCR. Gao et al. décrivent de nombreux exemples de cette technique, dans lesquels des nanoparticules inorganiques sont utilisées comme catalyseur pour la détection de miARN spécifiques dans un échantillon d'ARN totaux extraits de cellules HeLa (Gao *et al.* 2006, Gao *et al.* 2007).

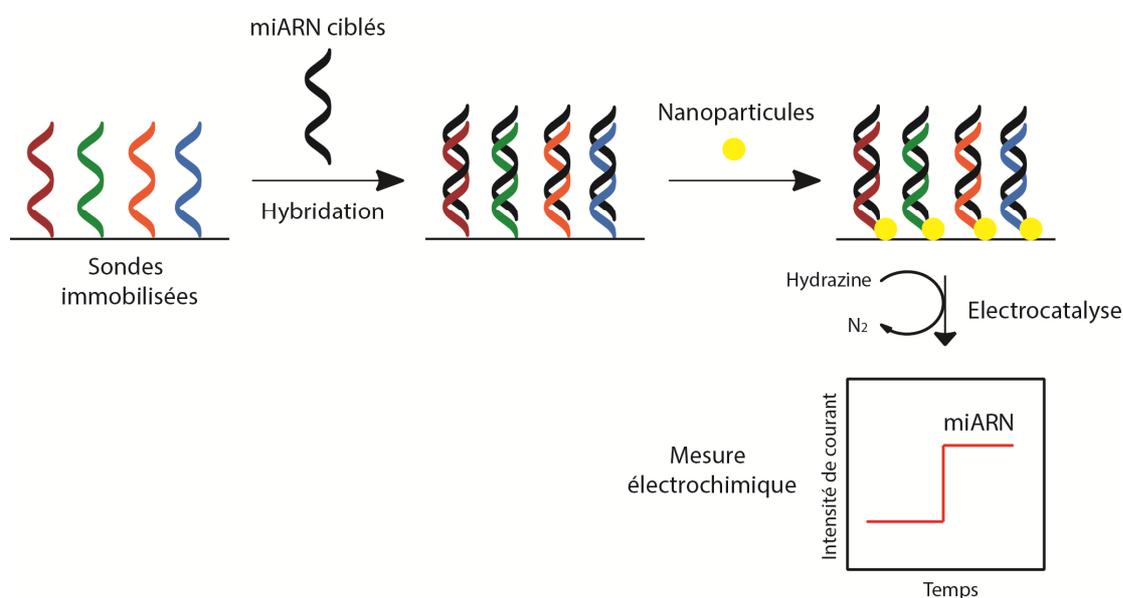


Figure 4 : Exemple de méthode de détection électrochimique de microARN : cette méthode peut être divisée en cinq étapes principales : l'immobilisation des sondes, l'hybridation des microARN ciblés, l'addition de nanoparticules, l'électroanalyse à l'aide d'hydrazine, et la détection électrochimique.

La détection électrochimique offre donc une sensibilité et une sélectivité importante, avec une limite de détection de l'ordre du fM. Cependant, cette technique est limitée en diagnostic par une faible fréquence d'analyse et la nécessité importante d'instruments spécifiques pour l'analyse électrochimique.

1.2.4.2.4. La transcription inverse couplée à la PCR en temps réel

La réaction en chaîne par polymérase (PCR, acronyme de l'anglais Polymerase Chain Reaction) sera étudiée plus en détail par la suite dans ce manuscrit (voir **partie 2.** de l'introduction, ci-après).

La PCR en temps réel est une méthode couramment utilisée pour l'étude quantitative de l'expression de gènes (Livak *et al.* 2001, Mocellin *et al.* 2003). Cependant, les techniques conventionnelles de PCR ne sont pas adaptées à la détection de petits fragments oligonucléotidiques tels que les miARNs. L'étude de molécules d'ARN par PCR nécessite, tout d'abord, une étape préliminaire de transcription inverse (RT-PCR), les fragments d'ARN n'étant pas reconnus par l'ADN polymérase. Cette méthode consiste à produire une molécule d'ADN complémentaire (ADNc), complémentaire de l'ARN ciblé, par l'utilisation d'une enzyme "reverse transcriptase", avant l'amplification de la séquence par PCR (**Figure 5**).

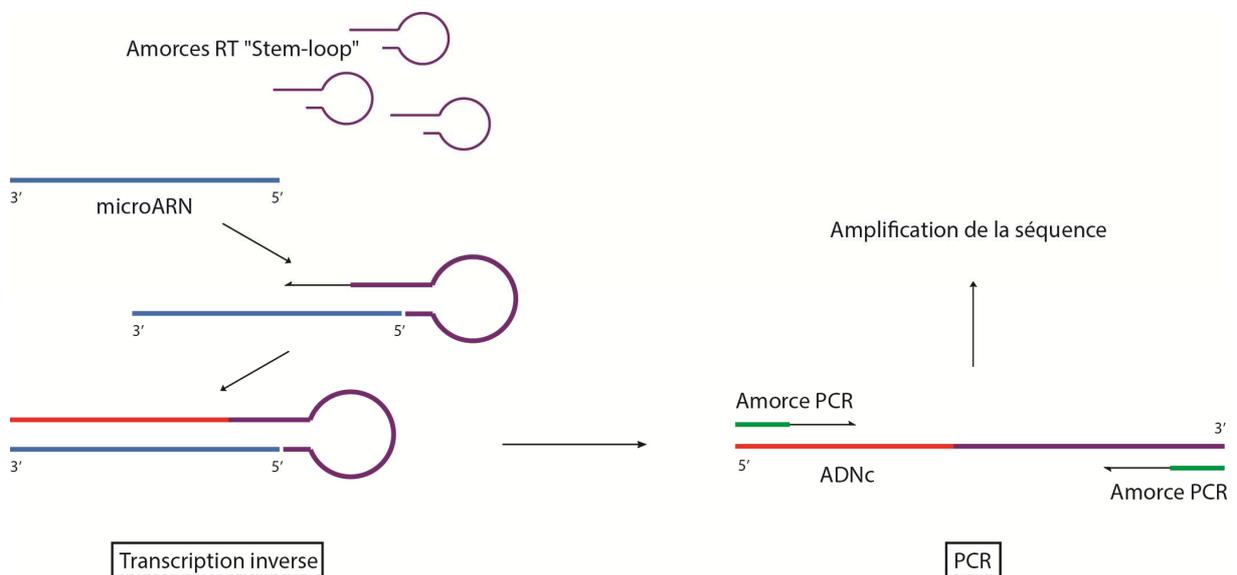


Figure 5 : Mécanisme de RT-PCR avec amorces en épingle à cheveux ("Stem-loop") : les amorces de transcription inverse vont s'hybrider à la séquence du (ou des) microARN ciblé(s) et permettre à l'enzyme de (transcriptase inverse) de synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc) qui rentrera dans un cycle d'amplification par PCR.

Plusieurs techniques de RT-PCR en temps réel ont été développées ces dernières années pour la détection de miARN (Schmittgen *et al.* 2004, Chen *et al.* 2005, Schmittgen *et al.* 2008), certaines étant capables de détecter la présence de miARN dans seulement quelques picogrammes d'ARN totaux (Huang *et al.* 2010). Le premier exemple de RT-PCR en temps réel décrit pour la détection de miARN se base sur l'étude des précurseurs de miARN (Schmittgen *et al.* 2004). Cependant, d'autres études ont démontré qu'il n'existe aucune corrélation entre la quantité de précurseurs de miARN et la quantité de miARN matures au niveau cellulaire (Lagos-Quintana *et al.* 2002, Raymond *et al.* 2005). Plus tard, Chen *et al.* ont développé une méthode quantitative de RT-PCR basée sur l'utilisation de sondes TaqMan, permettant une étude rapide et sensible de l'expression de miARN (Chen *et al.* 2005). Une autre méthode, développée par Raymond *et al.*, utilise la RT-PCR en temps réel combinée à l'utilisation de SYBR® green et d'amorce LNA pour la détection de miARN matures (Raymond *et al.* 2005). Cette méthode permet d'obtenir une sensibilité proche du fM mais l'utilisation d'amorce LNA augmente considérablement son coût. D'autres méthodes, basées sur l'utilisation de la PCR, ont été mises au point pour l'étude des miARN, notamment en augmentant la taille du miARN mature par des amorces particulières (e.g. "Stem-loop") ou l'utilisation de poly-(A) polymérase (Ro *et al.* 2006, Takada *et al.* 2007).

1.2.4.2.5. La détection sur billes-support ("Bead-based assay")

La détection de miARN sur billes-support est une technique basée sur l'hybridation de séquences spécifiques sur un support en suspension (microsphère) (**Figure 6**). Il existe différentes stratégies de détection utilisant ce type de support, cependant le système xMAP® (Luminex) est le plus couramment employé pour la détection de miARN spécifiques (Lu *et al.* 2005, Biscontin *et al.* 2010, Wang *et al.* 2012). Ce système utilise comme support des billes en matière polystyrène contenant un couple de fluorophores en concentrations variables (afin de réaliser un code couleur unique par support) et supportant des sondes spécifiques du miARN ciblé en surface (**Figure 6**). Les ADNc correspondant aux miARN ciblés sont synthétisés par une réaction de RT-PCR et fonctionnalisés par une molécule de biotine, avant d'être incubés en solution en présence des billes-support. Après hybridation des ADNc avec leurs sondes, les billes sont rincées et incubées en solution en présence de Streptavidine Phycoerythrin (Streptavidine-PE – protéine couplée à un fluorophore). Les billes sont à nouveau rincées puis analysées par cytométrie de flux. Le code couleur correspondant à la bille-support informe sur la séquence spécifique ciblée, alors que la présence de Streptavidine-PE indique la présence de cette séquence dans l'échantillon analysé. Par cette technique, les travaux de Lu *et al.* ont permis d'établir une méthode de mesure de l'expression de 217 miARN différents et leur classification dans le cas de différents types de cancers (Lu *et al.* 2005). Si cette technique permet

une analyse d'un nombre important de miARN ciblés simultanément (jusqu'à 100), elle est cependant limitée par la petite taille et les similitudes de séquences entre miRNA qui réduisent considérablement sa sensibilité et sa spécificité, et demande un investissement matériel important.

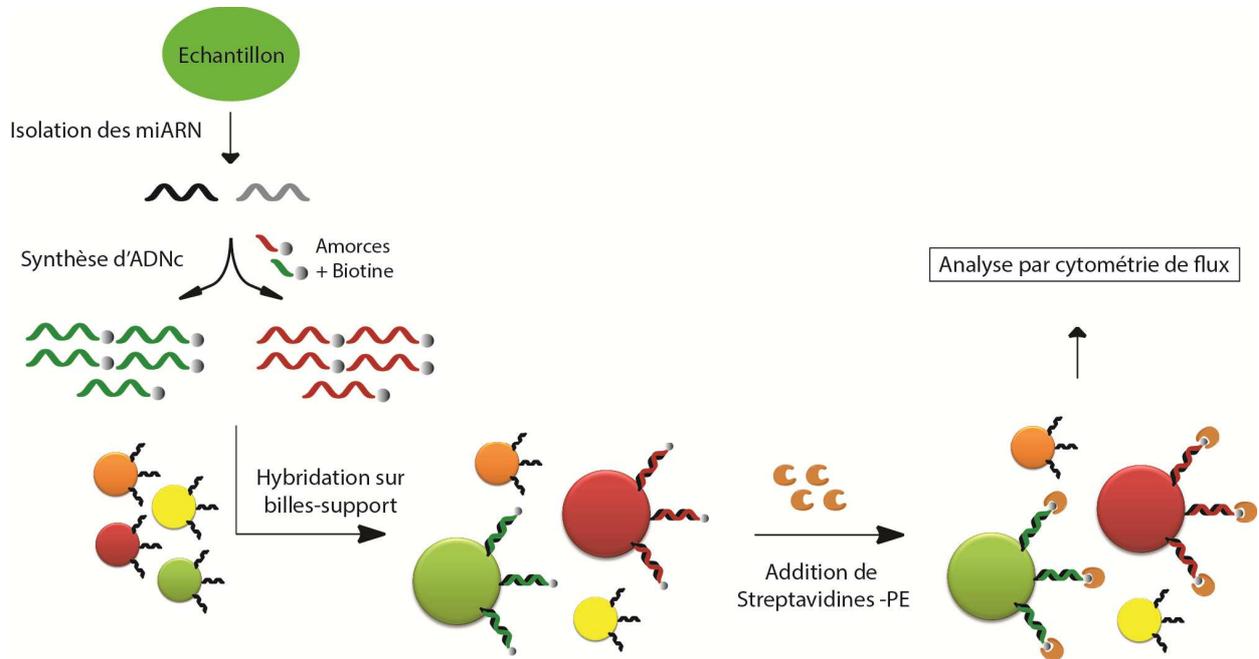


Figure 6 : Exemple de détection de microARN sur billes-support : schématisation du système xMAP (Luminex). Une réaction de RT-PCR permet la synthèse d'ADNc fonctionnalisé par d'une biotine à partir de miARN extrait d'un échantillon biologique. Les ADNc vont s'hybrider aux billes-support correspondantes, associées à un code couleur spécifique, et se lier à une molécule de streptavidine-PE avant d'être analysés par cytométrie de flux.

1.2.4.2.6. La spectroscopie de corrélation de fluorescence

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FSC, acronyme de l'anglais "Fluorescence Correlation Spectroscopy") est une technique permettant de mesurer les fluctuations d'intensité de fluorescence en solution. Se basant sur cette technique, Neely *et al.* ont développé une technique de détection des miARN en y associant une plateforme microfluidique et un système de laser capables d'observer la fluorescence de molécules unique en solution (Neely *et al.* 2006).

Un système de sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées par deux fluorophores et un désactivateur est mis en présence de l'échantillon à analyser. Les sondes associées aux fluorophores présentent une séquence complémentaire du miARN ciblé, alors que les sondes associées au désactivateur présentent la même séquence que le miARN ciblé. En présence de la cible, l'hybridation de celle-ci avec la sonde fluorescente va aboutir à l'observation d'un signal dans la

solution. Les sondes non-liées vont s'hybrider avec le désactivateur. Une analyse quantitative des miARN est ensuite réalisée par un décompte des signaux de fluorescence (**Figure 7**).

Cette méthode a pour avantage d'être rapide et ne nécessite aucune étape d'amplification des séquences recherchées. La limite de détection de cette méthode est de l'ordre de 100 fM. Les auteurs ont également démontré les capacités de cette méthode à discriminer des modifications d'un nucléotide unique dans la séquence. Cependant cette méthode nécessite l'utilisation d'équipements lourds (avec notamment un système optique complexe), limitant ainsi ses potentielles applications en laboratoire clinique.

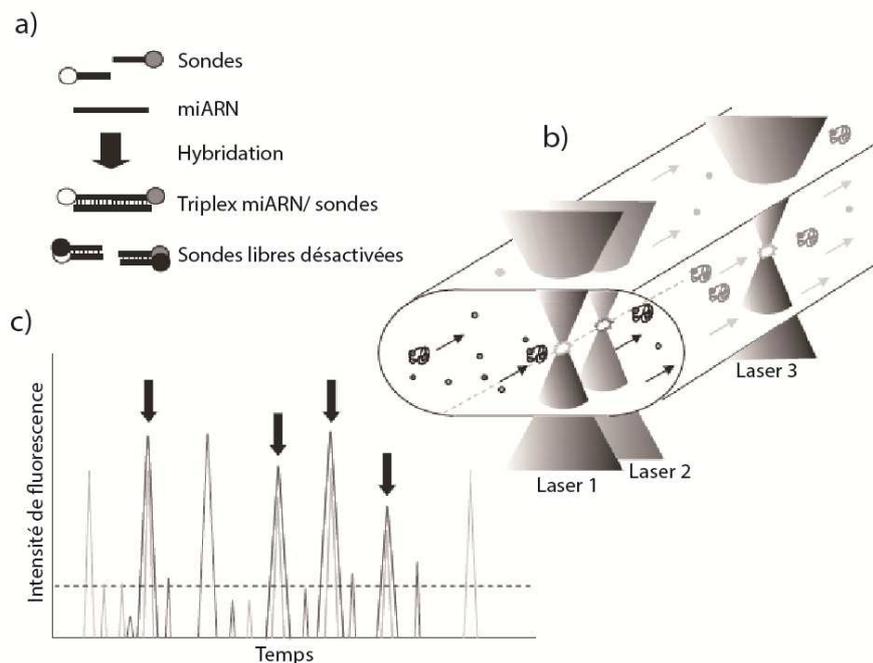


Figure 7 : Mécanisme de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FSC) : a) les microARN ciblés en solution vont s'hybrider avec des sondes fluorescentes complémentaires. La présence conjointe de sondes portant des molécules "désactivatrices" va permettre l'inhibition de fluorescence des sondes fluorescente libres dans le milieu ; b) la solution est ensuite injectée dans une ligne capillaire sur laquelle est focalisé une série de lasers permettant la détection des différents signaux de fluorescence ; c) les données sont collectées et analysées au cours du temps en fonction de l'intensité de fluorescence. Les flèches indiquent les pics conjoints de fluorescence correspondant au passage des miARN ciblés.

(Figure inspirée de Neely *et al.* 2006)

1.2.4.2.7. La détection par bioluminescence

La détection de miARN par bioluminescence est une méthode basée sur le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET, acronyme de l'anglais "Bioluminescence Resonance Energy Transfer") et l'hybridation compétitive de miARN et d'oligonucléotides synthétiques. Cette technique

permet d'étudier et de quantifier la présence de miARN dans un milieu biologique (Cissell *et al.* 2008).

Pour cela, deux sondes sont synthétisées ; (i) une première, analogue synthétique du miARN ciblé et fonctionnalisée par une protéine catalysant une réaction de luminescence (Renilla luciférase – Rluc) ; une seconde, complémentaire du miARN ciblé et fonctionnalisée par une "boite quantique" (nanostructure fluorescente). En l'absence de miARN ciblé, les deux sondes vont s'hybrider et on observera la formation d'un signal par BRET. En présence de la cible, on observe une compétition entre celle-ci et la sonde, diminuant ainsi l'intensité du signal dans la solution (**Figure 8**). Si cette méthode est avantageuse par son faible temps de réaction et la forte intensité de signal produite par ces sondes, l'observation d'une décroissance du signal comme mesure de détection limite son utilisation.

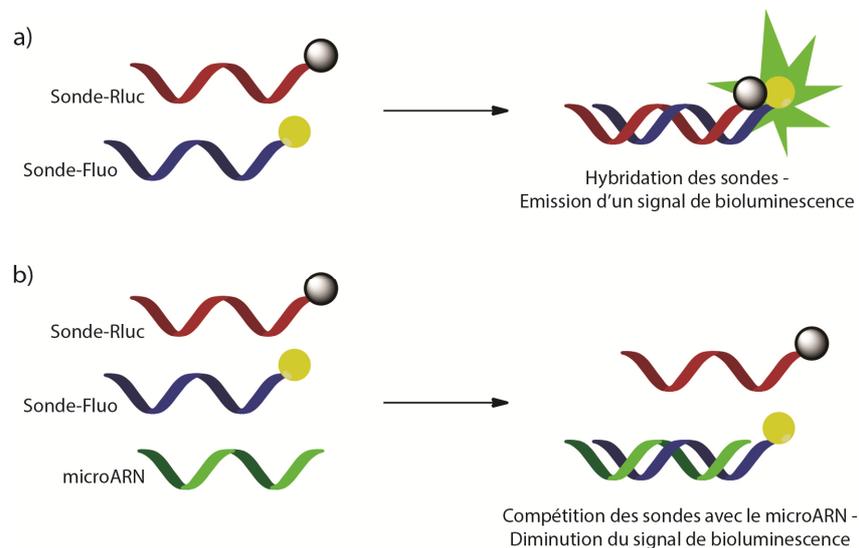


Figure 8 : Mécanisme de détection par bioluminescence: a) en l'absence de séquence ciblée, les deux sonde vont s'hybrider produisant un signal de bioluminescence dans le milieu ; b) en présence de la séquence ciblée, la compétition d'hybridation des séquences va induire une diminution du signal de bioluminescence (inspirée de Cissell *et al.* 2008).

1.2.4.2.8. Hybridation *in situ*

Comme son nom l'indique, il s'agit d'une méthode utilisant des sondes oligonucléotidiques (ADN, ARN) fonctionnalisée pour la détection de séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN dans des tissus ou des cellules fixées. L'avantage de cette technique est de fournir des informations sur le niveau d'expression des miARN dans différents types cellulaires. Cependant, cette technique est limitée par les faibles niveaux d'expression et par une faible affinité pour les séquences de petites tailles, telles que les miARN. L'introduction de sondes LNA pour la détection de miARN par Alenius *et al.* a

grandement amélioré les performances de cette technique (Obernosterer *et al.* 2007). En effet, les sondes LNA montrent une meilleure affinité pour les ARN que les sondes conventionnelles d'ADN ou d'ARN (Vester *et al.* 2004). Ces sondes permettent également de discriminer des modifications d'un nucléotide unique dans la séquence et sont donc particulièrement utilisées pour la détection de miARN et l'analyse en diagnostic (Kloosterman *et al.* 2006, Castoldi *et al.* 2006).

Plus récemment, Schmittgen *et al.* ont développé une nouvelle méthode de détection de miARN matures *in situ* dans des tissus fixés (Nuovo *et al.* 2009). Cette méthode est basée sur l'utilisation de la molécule de miARN comme amorce pour initier une réaction d'élongation d'une séquence longue d'une centaine de nucléotides. Cette technique a pour avantage de permettre la détection de la forme active des miARN et d'être bien moins coûteuse que l'utilisation de sondes LNA.

Cependant, si des améliorations ont été apportées à cette méthode afin d'augmenter la sensibilité et de diminuer les temps de procédure, l'hybridation *in situ* reste tout de même limitée pour une utilisation diagnostique par son faible potentiel de quantification et sa fréquence d'analyse.

2. La réaction de polymérisation en chaîne

Une grande partie des techniques de détection de biomarqueurs actuelles utilise la méthode de réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La PCR est une méthode d'analyse d'acides nucléiques basée sur l'amplification, à partir d'une faible quantité, d'une séquence spécifique d'ADN. Cette méthode permet de produire, de façon sélective plusieurs millions de copies d'un ADN ciblé en quelques heures.

2.1.1. Principes de la PCR

Développée au début des années 80 par Kary Mullis (Saiki *et al.* 1985, Saiki *et al.* 1988), la méthode de PCR consiste en l'amplification exponentielle d'une séquence d'ADN ciblée grâce à l'utilisation d'une enzyme : l'ADN polymérase. Cette réaction se produit par l'exécution successive d'un certain nombre de cycles de variation de température (généralement entre 30 et 45 cycles). Après une étape initiale de dénaturation à 94°C, chaque cycle se décompose de la manière suivante :

(i) une première étape de dénaturation, généralement en chauffant le milieu pendant 15 à 30 secondes à une température de 94°C, permet la dissociation de molécules d'ADN doubles brins en ADN simples brins ;

(ii) une deuxième étape d'hybridation ou d'appariement des amorces, généralement à des températures proches de 50-60°C permet aux amorces de s'hybrider aux ADN cibles (les amorces sont de courtes séquences d'ADN synthétiques complémentaires de l'ADN cible et permettant l'initiation de la réaction d'amplification) ;

(iii) une troisième étape d'élongation, généralement entre 68 et 72°C, permet à l'ADN polymérase de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN matrice ciblé.

La PCR est généralement utilisée comme étape initiale d'amplification de l'ADN dans les techniques de détection de biomarqueurs. La nécessité de réaliser une étude quantitative des échantillons d'ADN analysés a poussé les chercheurs à développer des techniques de PCR permettant, "en temps réel", le suivi de l'évolution de la quantité d'ADN répliqué.

2.1.2. La PCR en "temps réel"

Cette technique, basée sur l'analyse directe de l'évolution de la quantité d'ADN dans le milieu réactionnel, offre de nombreux avantages, notamment en réduisant de potentielles contaminations (les sondes étant directement présentes dans le milieu) et en minimisant la variabilité entre les

expériences (Jain 2010). Les systèmes de PCR en temps réel impliquent de nombreuses applications telles que la PCR quantitative (qPCR), le multiplexage, ou encore l'analyse à très haut-débit d'échantillons biologiques. Dans ces systèmes, la quantité de produit formé est directement observable par l'analyse de la fluorescence produite par une ou plusieurs sondes présentes dans le milieu réactionnel. La fluorescence ainsi observée est proportionnelle à la quantité de produit formé, correspondant à un dédoublement du nombre de molécules par cycle d'amplification. Grâce à ces mesures, il est possible de calculer de manière relative, la quantité de molécules d'ADN de la séquence amplifiée présentes initialement dans l'échantillon. Les récentes avancées dans la conception de sondes fluorogéniques, dans la sensibilité des instruments de mesure et dans l'optimisation des méthodes d'analyse permettent aujourd'hui de déterminer le nombre de molécules d'ADN d'une séquence ciblée présente dans un échantillon biologique avec une précision et une sensibilité importante.

Les applications de la PCR en temps réel sont nombreuses et comportent, notamment, la détection d'éléments pathogènes, l'étude de l'expression de gènes (RT-PCR), la détection de mutations sur l'ADN, l'analyse d'aberrations chromosomiques ou encore la détection de protéines (immuno-PCR).

Un grand nombre de systèmes de PCR en temps réel sont disponibles commercialement. Les procédures de détection des séquences nucléotidiques ciblées sont basées sur l'utilisation d'une sonde fluorescente ou fluorogénique pour la détection. S'il existe différents types de marqueurs fluorescents pour la PCR en temps réel (agents intercalants, marqueurs du petit sillon, etc.), seules les sondes ciblant des séquences spécifiques d'ADN seront abordées ci-après.

2.1.2.1. Les sondes TaqMan®

Les sondes TaqMan® sont constituées d'un oligonucléotide d'environ 12 à 22 bases, fonctionnalisé à sa partie 5'-terminale par un fluorophore et à sa partie 3'-terminale par un "désactivateur" ("quencher" de fluorescence). La présence de ce composé désactivateur va considérablement minimiser l'émission de fluorescence par un transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET, acronyme de l'anglais "Förster Resonance Energy Transfert"). Ce système de sondes utilise l'activité 5'-exonucléase de l'enzyme Taq Polymérase pour mesurer la quantité de séquence ciblée dans l'échantillon.

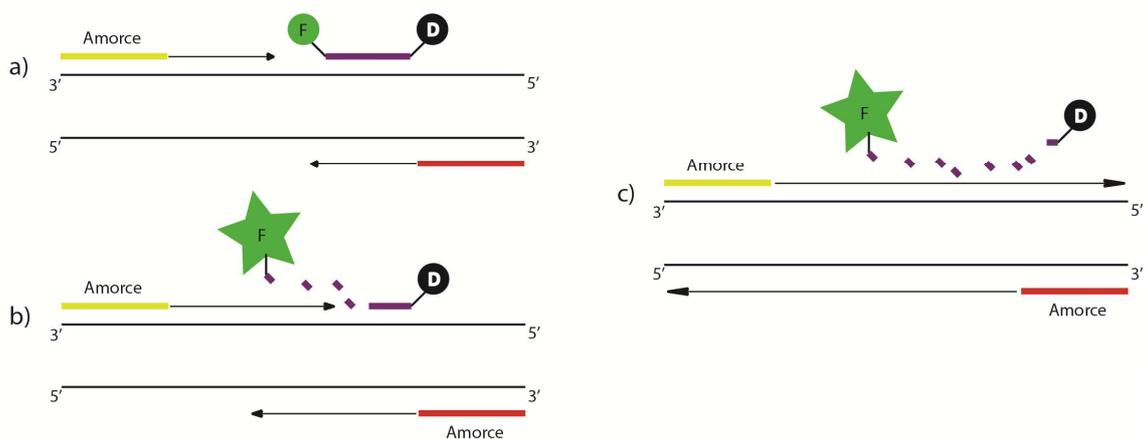
Dans la structure initiale de la sonde, la molécule fluorescente et le désactivateur sont étroitement liés, séparés uniquement par la longueur de l'oligonucléotide. Cependant, cette proximité ne désactive pas totalement la fluorescence et on observe un signal basal de fluorescence. Durant la PCR, la sonde TaqMan® va s'hybrider spécifiquement avec sa séquence complémentaire. Pendant la réplication de la séquence ciblée, l'activité 5'-exonucléase de l'enzyme polymérase va provoquer le

clivage de la sonde, séparant ainsi le fluorophore du désactivateur, et provoquant ainsi l'augmentation de l'intensité du signal de fluorescence dans le milieu (**Figure 9 A**)). Ce processus est répété à chaque cycle d'amplification et n'interfère pas avec l'accumulation du produit de PCR. Ce type de sonde trouve de nombreuses applications, notamment en qPCR (Weller *et al.* 2000, Ji *et al.* 2005), dans la détection de bactéries (Tarrago *et al.* 2008), ou encore dans la détection de mutations spécifiques sur l'ADN (Martino *et al.* 2010).

2.1.2.2. Les sondes FRET avec accepteur de fluorescence

Les sondes FRET sont composées de deux oligonucléotides distincts, fonctionnalisés par une molécule fluorescente à une de leurs extrémités. Chaque oligonucléotide est complémentaire d'une partie de la séquence cible de telle sorte à rapprocher les fluorophores lors de l'hybridation des sondes sur cette séquence.

A) TaqMan®



B) FRET

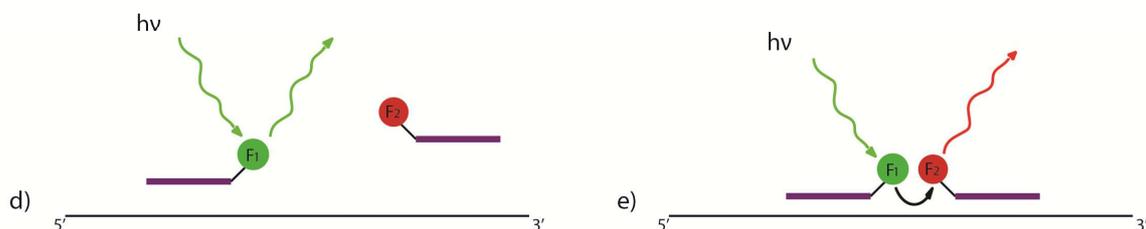


Figure 9: Principe des sondes TaqMan® (A) et FRET (B) ; a) la sonde TaqMan® et les amorces s'hybrident à leurs cibles ; **b)** l'élongation du brin complémentaire entraîne la dégradation de la sonde ; **c)** la dégradation de la sonde permet au fluorophore (F) de se détacher du désactivateur (D) provoquant l'émission d'un signal de fluorescence ; **d)** et **e)** l'hybridation des deux sondes (portant chacune un fluorophore à une de leurs extrémités) avec la séquence ciblée permet un transfert d'énergie (FRET) d'un premier fluorophore (F₁) (excité par une source lumineuse) à l'autre (F₂).

Un transfert d'énergie se produit entre le premier fluorophore (le donneur) et le second (l'accepteur) au moment où ces deux composés se retrouvent étroitement proches (**Figure 9 B**). Afin de permettre ce transfert, les fluorophores sont choisis de telle sorte que le spectre d'émission du donneur couvre au maximum le spectre d'excitation de l'accepteur. Durant la PCR, les deux oligonucléotides s'hybrident sur l'ADN ciblé de manière à créer une proximité entre les deux composés fluorescents. Le fluorophore donneur est alors excité par une source lumineuse externe, transférant une partie de son énergie d'excitation vers le fluorophore accepteur. L'émission de fluorescence de ce dernier va ensuite pouvoir être détectée et mesurée.

2.1.2.3. Les "balises moléculaires"

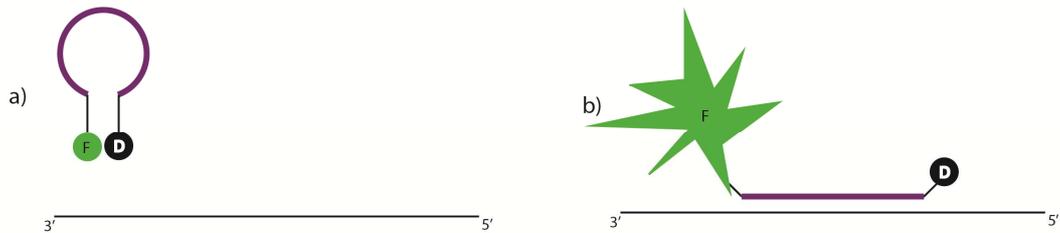
Les sondes de type "balises moléculaires" sont également composées d'un oligonucléotide complémentaire de la séquence ciblée, fonctionnalisées à ses parties terminales d'un fluorophore et d'un désactivateur. Cependant, la proximité de ces deux composés est assurée par la structure en épingle adoptée par la sonde. Dans ce cas, en l'absence d'hybridation avec une séquence complémentaire, la structure de la sonde est "fermée", empêchant l'émission d'un signal de fluorescence dû à la grande proximité du fluorophore avec le désactivateur. Lors de l'hybridation avec la séquence ciblée, la structure en épingle de la sonde va s'ouvrir éloignant le fluorophore du désactivateur et ainsi émettre un signal de fluorescence (**Figure 10 A**). Durant la PCR, les balises moléculaires se lient aux cibles à la fin de chaque cycle d'amplification et l'intensité du signal émis est proportionnelle à la quantité de séquences complémentaires. Si ces sondes souffrent des mêmes limites que les sondes TaqMan® en terme de bruit de fond, elles ne sont pas dépendantes des étapes d'amplification par PCR et peuvent être utilisées pour une mesure ponctuelle de la quantité de séquence ciblée. Une des limites de cette technique est la compétition entre la formation du duplex sonde:ADN et la formation du duplex d'ADN initial. Les balises moléculaires s'appliquent également à la quantification de séquences spécifiques d'ADN (Hadjinicolaou *et al.* 2009) ou encore pour la détection de mutations spécifiques sur l'ADN (Mhlanga *et al.* 2001).

2.1.2.4. Les sondes Scorpions

Les sondes Scorpions sont une variante des balises moléculaires, sur lesquelles une amorce intervenant dans l'amplification de la séquence ciblée a été greffée. Là encore, la proximité du fluorophore avec le désactivateur est assurée par la structure en épingle adoptée par la sonde. Dans ce cas, l'amorce présente sur la sonde va s'hybrider avec la séquence complémentaire de la séquence ciblée, entraînant l'amplification de celle-ci durant la réaction de PCR. Une fois formée, la

séquence ciblée est directement attachée à la sonde, minimisant de ce fait l'énergie d'hybridation entre les deux. La formation du duplex sonde:ADN est ainsi favorisée par rapport à la formation du duplex d'ADN initial (**Figure 10 B**). Cette technique, contrairement aux balises moléculaires, nécessite l'amplification de la séquence ciblée par PCR, et peut également être utilisée pour la détection de mutations spécifiques sur l'ADN (Solinas et al. 2001).

A) Balises moléculaires



B) Sondes Scorpions

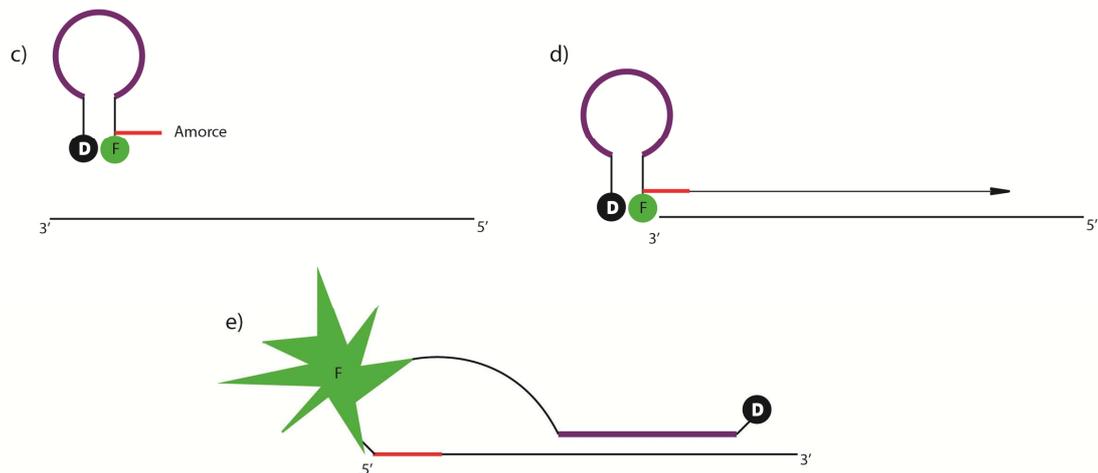


Figure 10 : Principes des balises moléculaires (A) et sondes Scorpions (B) ; a) et b) l'hybridation des balises moléculaires à la séquence ciblée ouverture de sa structure et l'émission d'un signal de fluorescence ; c) et d) l'hybridation de l'amorce sur la cible provoque l'élongation de la chaîne complémentaire de la sonde ; e) l'hybridation de la sonde au brin nouvellement synthétisé permet l'émission d'un signal de fluorescence.

2.1.3. La PCR digitale

Si la réaction de PCR permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN dans un échantillon biologique, cette technique est néanmoins limitée en spécificité et en sensibilité pour l'analyse d'échantillons biologiques complexes (e.g. échantillon d'ARN totaux extrait d'un milieu cellulaire). La PCR digitale (dPCR) permet de pallier à ces limitations et consiste à diviser l'échantillon étudié en un grand nombre de partitions, afin de réaliser une multitude de réactions de PCR simultanément. Pour

cela, l'échantillon est donc divisé en une multitude de fractions en dilution limite dans lesquelles la réaction d'amplification est réalisée pour chaque partition individuellement. Cette méthode permet d'augmenter considérablement la fiabilité et la sensibilité pour une analyse quantitative d'un échantillon d'acides nucléiques.

2.1.3.1. Principe de la dPCR et distribution de Poisson

L'échantillon à analyser est fractionné dans des compartiments de volumes équivalents où la distribution en acides nucléiques suit la loi de distribution de Poisson (Sykes *et al.* 1992, Vogelstein *et al.* 1999). Cette loi de distribution est basée sur l'hypothèse que chaque molécule d'ADN (ou d'ARN) se comporte comme une particule indépendante et est aléatoirement distribuée dans le milieu (sans précipitation, sédimentation ou agrégation) (Pekin *et al.* 2011). En conséquence, la probabilité $P(k)$ qu'un compartiment contienne k molécules ciblées (où $k \in \mathbb{N}_0$) peut être calculée par l'équation suivante :

$$P(k) = \frac{e^{-\lambda} \cdot \lambda^k}{k!}$$

où λ est le nombre moyen de molécules ciblées par compartiments

Un des objectifs de cette méthode étant de quantifier, avec une grande précision, le nombre d'ADN cible présent dans l'échantillon, il apparaît donc indispensable de compartimenter ces molécules de façon indépendante. Pour $\lambda = 1$, plus de 20% des compartiments contiennent au minimum 2 molécules d'ADN ciblées, alors que pour des valeurs plus faibles ($\lambda < 0,1$), la probabilité d'observer plus d'une molécule ciblée dans un compartiment est faible (dans ce cas, le nombre de compartiments inoccupés est $> 90\%$) (**Figure 11**).

Une fois individualisées, les différentes cibles peuvent être observées par des méthodes classiques de qPCR. Cette technique permet notamment de déterminer la concentration en ADN cible, ou de mesurer, pour exemple, le ratio entre des séquences d'ADN non mutées (sauvage) et mutées, dans un échantillon biologique. Le décompte des réactions contenant le produit d'amplification permet une mesure directe du nombre de séquences ciblées initialement présentes dans l'échantillon par un décompte de compartiments positifs (dans lesquels l'amplification a eu lieu) et de compartiments négatifs (ne contenant pas la séquence cible). La dénomination "digitale" de cette méthode provient de cette situation binaire (positive ou négative).

Une des difficultés de cette technique est cependant d'obtenir le bon compromis entre la probabilité de doublon dans les différents compartiments et la proportion de compartiments inoccupés. En effet, si l'échantillon contenant l'ADN ciblé n'est pas suffisamment dilué, tous les compartiments

seront positifs et aucune donnée quantitative ne pourra être extraite de cette analyse. Au contraire, si l'échantillon est trop dilué, on n'observera qu'une infime quantité de compartiments positifs, diminuant ainsi la fiabilité de l'analyse. Un dernier cas de figure s'observe, à des concentrations légèrement supérieures à la concentration idéale, dans lequel les compartiments peuvent être occupés par 2 ou plusieurs ADN ciblés, sans nécessairement observer une occupation totale (Day *et al.* 2013). Le biais provoqué alors dans le décompte de réactions positives peut être corrigé théoriquement par l'équation de Poisson ou par la pratique, en comparant l'abondance relative de cibles par compartiment grâce à l'intensité du signal dégagé par les sondes fluorescentes utilisées pour la détection des séquences ciblées (Vogelstein *et al.* 1999, Day *et al.* 2013).

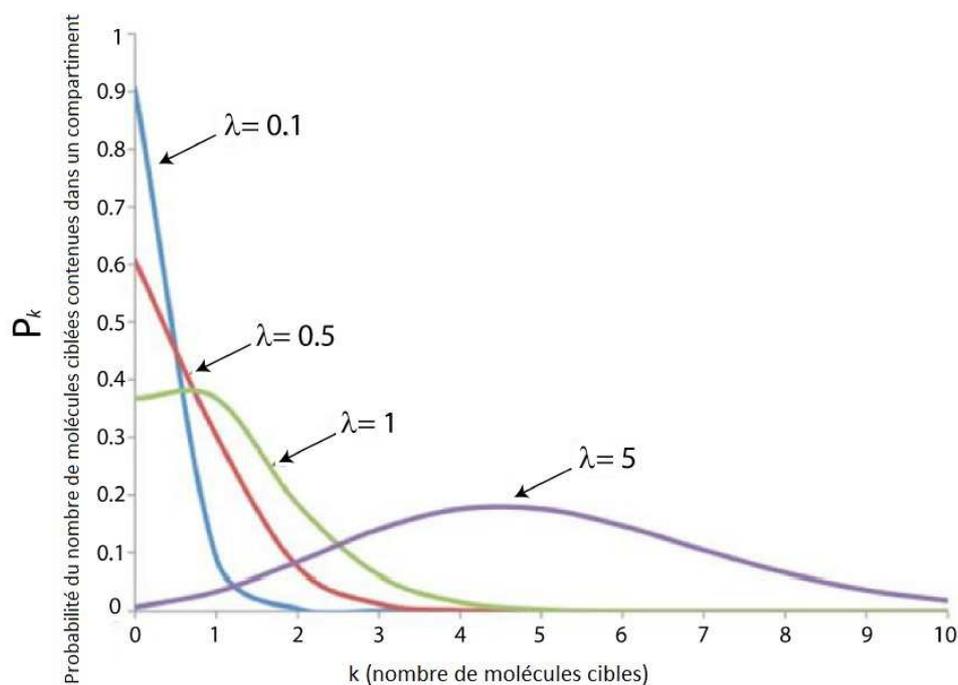


Figure 11 : Exemple de distribution de poisson : probabilité d'observer un nombre k de molécules par compartiment, en fonction du ratio du nombre de molécules totales n sur le nombre total de compartiments N (Taux d'occupation $\lambda = n/N$).

2.1.3.2. Applications de la dPCR

En 1992, Sykes *et al.* décrivent une procédure qu'ils qualifient de "méthode générale pour mesurer la quantité initiale de séquences cibles dans un échantillon, par l'utilisation de la dilution limite combinée à la PCR et la loi statistique de Poisson" (Sykes *et al.* 1992). Ces travaux représentent le premier exemple de dPCR permettant de quantifier une altération spécifique dans un large excès de séquences sauvages.

Quelques années plus tard, Kalinina *et al.* décrivent une procédure utilisant des microcapillaires dans le but de réaliser des réactions de PCR dans de très faibles volumes (10nL) (Kalinina *et al.* 1997). Dans ces travaux, l'utilisation de sondes TaqMan® permet la détection d'une cible unique d'ADN diluée dans un échantillon d'ADN génomique. Cette technique permet de quantifier le nombre de molécules cibles par le comptage du nombre de réactions de PCR positives, mais reste cependant limitée par une mise en œuvre relativement longue.

Le terme de PCR digitale apparaît en 1999 dans les travaux de Vogelstein *et al.*, qui décrivent une procédure de détection de séquences rares par l'utilisation de dilutions limitées en microplaques (Vogelstein *et al.* 1999). Dans ces travaux, un échantillon d'ADN, extrait de selles de patients atteints de cancer colorectal, est dilué de telle sorte à obtenir un taux d'occupation de compartiment d' $1/2$ dans une microplaque à 96 puits. Le rapport entre allèles mutants et sauvages de l'oncogène *RAS* est déterminé grâce à l'utilisation de deux balises moléculaires différentes permettant de discriminer les séquences ciblées, et par un simple décompte des signaux de fluorescence dans les différents puits.

Si la dPCR apparaît aujourd'hui comme un outil prometteur pour la détection de séquences oligonucléotidiques rares dans des échantillons biologiques, l'utilisation de microplaques demande un investissement en travail et en coût important, rendant cette méthode difficilement compatible avec une potentielle application clinique.

Afin de pallier à ces limitations, une méthode alternative a été mise au point, consistant en l'utilisation de gouttelettes aqueuses (contenant l'ADN ciblé et le mélange réactionnel nécessaire à la PCR) dispersées dans de l'huile pour la compartimentation des réactions de PCR. Cette méthode, appelée PCR en émulsion (ePCR), permet de réaliser des tests très sensibles et théoriquement moins coûteux en comparaison des plateformes utilisant des microchambres (Baker 2012, Hugget *et al.* 2013) et permet d'étudier un nombre de compartiments théoriquement illimité (dépendant du volume des gouttelettes et d'échantillon disponible) (Williams *et al.* 2006). Les premières procédures d'ePCR utilisaient l'agitation mécanique pour la génération de gouttes entraînant la production de gouttes de tailles très variables (Williams *et al.* 2006). Cette polydispersité des volumes réactionnels limite la possibilité d'obtenir des résultats quantitatifs et augmente le risque d'encapsuler plus d'une molécule cible par goutte. De plus, les gouttelettes générées par ces procédures sont difficilement manipulables (Theberge *et al.* 2010). Afin de contourner ces difficultés, différentes stratégies, utilisant des billes magnétiques, ont été élaborées dans le but de capturer les ADN amplifiés et de pouvoir les manipuler après la réaction de PCR. Une de ces stratégies, appelée "BEAMing" (contraction de l'anglais "Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics") utilise des billes magnétiques fonctionnalisées avec des amorces complémentaires de l'ADN cible qui, une fois "recouvertes" de multiples copies de l'ADN cible initialement encapsulé, sont marquées par fluorescence et analysées en cytométrie de flux (Dressman *et al.* 2003). La sensibilité de cette

technique (commercialisée par la société Sysmex Inostics) est principalement liée au taux d'erreurs générées par la polymérase utilisée lors de la préamplification des séquences d'intérêt. La possibilité de détecter une molécule d'ADN mutée parmi 10 000 molécules non-mutées a ainsi été décrite (Diehl et al. 2006). Cette technique est un outil très attractif pour la détection de séquences rares, mais requiert une procédure lourde et complexe pour une utilisation de routine en clinique.

Afin de mieux contrôler le volume des émulsions, des systèmes microfluidiques ont également été développés pour la réalisation de réactions de dPCR en microgouttelettes (Pekin *et al.* 2011, Taly *et al.* 2012). Ces méthodes seront discutées ultérieurement dans ce document.

3. Réactions induites par hybridation nucléotidique

Le concept de réactions guidées par la reconnaissance d'oligonucléotides (OTR, acronyme de l'anglais "Oligonucleotide-templated reaction") trouve de nombreux exemples dans la nature. Avant chaque division cellulaire, le matériel génétique de la cellule est dupliqué au cours de l'étape de réplication de l'ADN où chaque brin de la double hélice sert de modèle à la synthèse d'un nouveau brin complémentaire. Ce processus est probablement l'un des plus anciens exemples de réaction dirigée par l'ADN observable dans la nature. La chimie à l'origine de ce brin nouvellement formé repose sur la formation de liaisons phosphodiester catalysée par une enzyme ADN polymérase. Il existe également d'autres enzymes capables de produire des fragments d'ARN à partir d'un modèle ADN (mécanisme de transcription par l'ARN polymérase) ou, à l'inverse, de produire un fragment d'ADN à partir d'un modèle ARN (transcriptase inverse). La grande fidélité de transfert de l'information génétique durant le phénomène de réplication est dû à la haute spécificité d'appariement des bases nucléiques par des liaisons hydrogènes de Watson-Crick (une base Adénine fera toujours face à une base Thymine quand une base Guanine fera toujours face à une base Cytosine), mais aussi grâce à la reconnaissance de la structure particulière de l'ADN par l'enzyme polymérase. Si tous ces processus conduisent à la formation de liaisons phosphodiester, la nature a également mis en place, grâce à la reconnaissance de structures oligonucléotidiques, une machinerie de production de liaisons peptidiques (liaisons amides) catalysées par une protéine ribonucléique appelée ribosomes.

En se basant sur ces exemples, les OTR utilisent la reconnaissance de séquences oligonucléotidiques spécifiques pour réunir deux réactifs afin d'induire une réaction chimique souhaitée. Le premier exemple de ligation non enzymatique a été réalisé entre deux thymidines hexanucléiques guidées par l'hybridation de séquences polyadénosines (Naylor *et al.* 1966). Cependant, la dodécathymidine obtenue au cours de cette réaction présente un très faible rendement (ca. 5%). L'efficacité de ces systèmes a considérablement augmenté durant ces dernières années. Au cours de cette évolution, on peut également relever les travaux de von Kiedrowski qui décrit la première autocatalyse de deux trinucleotides dont le produit de la réaction (un hexanucléotide) va agir comme catalyseur, par hybridation complémentaire, de sa propre formation (rendement - ca. 12%) (Von Kiedrowski 1986).

Si ces réactions présentent un intérêt certain, elles se limitent néanmoins à la formation, à faible rendement, de liaisons phosphodiester entre nucléotides et n'offrent alors que des perspectives limitées. De récents travaux ont permis de diversifier les possibilités offertes par cette méthode tout en augmentant considérablement les rendements (Percivalle *et al.* 2013).

3.1. Principes et perspectives offertes par les OTR

Le concept général des OTR se base sur le rapprochement de deux molécules réactives, chacune liée de façon covalente à un fragment oligonucléotidique (ADN, ARN, etc..), grâce à leur appariement (Watson-Crick) à une séquence complémentaire. Cet appariement a pour effet d'augmenter la molarité effective des réactifs dont la concentration en solution est trop faible (généralement de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-9} molaire) pour observer la formation d'un produit réactionnel. Ce phénomène a pour effet d'augmenter de façon considérable la vitesse des réactions et d'en permettre, par conséquent, leur contrôle.

Il existe deux stratégies principales d'appariement rapportées dans la littérature : (i) les deux fragments oligonucléotidiques portant les réactifs sont complémentaires l'un de l'autre. Dans ce cas, l'hybridation de ces séquences rapproche les réactifs de façon à obtenir la réaction souhaitée à l'extrémité du duplex ainsi formé (**Figure 12 a**) ; (ii) les deux fragments oligonucléotidiques portant les réactifs sont complémentaires de séquences voisines d'un troisième fragment (plus long) qui servira de "matrice". Dans ce cas, la réaction se produira à condition que les deux fragments fonctionnalisés s'hybrident sur le troisième pour former un duplex portant le produit de la réaction en son centre (**Figure 12 b**).

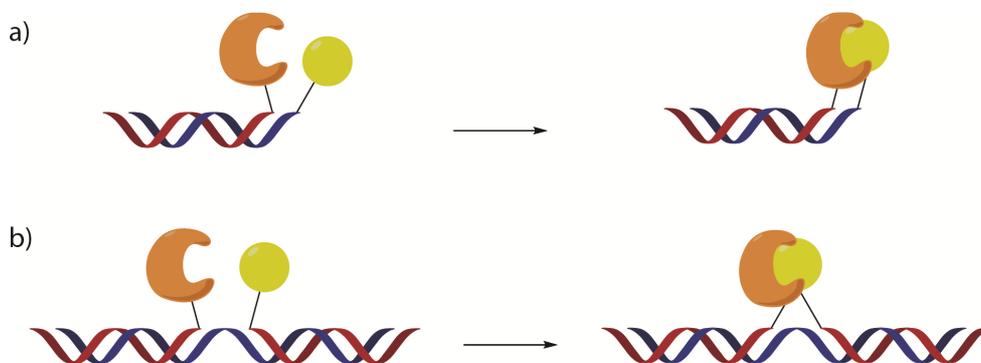


Figure 12 : Mécanisme général des "Oligonucleotide-templated reaction" (OTR) : a) l'hybridation de deux séquences complémentaires fonctionnalisées à leur extrémité induit la réaction ; b) la réaction se produit lors de l'hybridation de deux séquences fonctionnalisées sur une troisième séquence complémentaire.

La structure des séquences nucléotidiques mises en jeu dans ce type de réactions peut être de différentes natures. Les plus couramment utilisés sont, par essence, des ribo- ou déoxyribonucléotides (ADN et ARN) mais d'autres analogues structuraux tels que les LNA (Locked

Nucleic Acid) ou les PNA (Peptide Nucleic Acid) font l'objet d'un intérêt grandissant dans ce domaine. Les PNA sont notamment particulièrement étudiés du fait de leur caractéristique particulière (Nielsen *et al.* 1991). La chaîne latérale phosphodiester chargée est remplacée par une chaîne polyamides non chargée, offrant une meilleure affinité d'appariement à ces molécules lors de la formation de duplex hétérogènes PNA : ADN ou PNA : ARN en comparaison à des duplex d'ADN ou d'ARN.

De nombreuses applications ont été décrites durant la dernière décennie, notamment dans le domaine de la synthèse organique (Gartner *et al.* 2002, McKee *et al.* 2010, McKee *et al.* 2012), dans la détection de séquence spécifique d'ADN et d'ARN (Xu *et al.* 2001, Sando *et al.* 2002, Maguelliati *et al.* 2010) ou encore dans la synthèse de polymère et la chimie combinatoire (Gartner *et al.* 2001, Gartner *et al.* 2002).

3.2. Application des OTR dans la détection d'ADN ou d'ARN

L'habilité des OTR à former un produit en s'hybridant à une séquence "matrice" complémentaire offre une perspective d'utilisation de ces réactions pour la détection de séquences nucléotidiques spécifiques. Cette application implique une réaction hautement sélective et, de préférence, ne nécessitant pas l'ajout de réactifs autres que les sondes oligonucléotidiques elles-mêmes, rendant ainsi la réaction plus rapide et potentiellement biocompatible. L'ajout de réactifs complémentaires est particulièrement désavantageux dans le cas d'applications *in vivo*, dû à la formation de produits secondaires ou à la cytotoxicité des catalyseurs utilisés (Cu(I), Pd(II), Hg(II)...) (Silverman *et al.* 2006). Les premiers exemples d'application des OTR à la détection d'oligonucléotides ont été réalisés par les équipes de Kool et Letsinger à partir du milieu des années 90, mais nécessitaient des étapes de purification importantes (électrophorèse sur gel, HPLC) et de caractérisation des séquences hybridées (Wang *et al.* 1994, Rubin *et al.* 1995, Xu *et al.* 1999). La volonté d'observation de séquences *in vitro*, mais également *in vivo*, a nécessité une amélioration des conditions de détection. Différentes stratégies ont été mises au point afin de pallier à ces limitations et impliquent la spectroscopie optique (UV/Fluorescence) pour permettre une détection *in situ* rapide et simplifiée. Ces nouvelles approches peuvent être divisées en trois groupes principaux : (i) une première utilisant le transfert d'énergie par résonance entre molécules fluorescentes (Foster resonance energy transfer – FRET), (ii) une seconde se basant sur la restauration d'un signal de fluorescence désactivé (quenching), (iii) et enfin une troisième se basant sur des réactions fluorogéniques.

3.2.1. Détection par transfert d'énergie fluorescente (FRET) impliquant la formation d'une liaison covalente

Dans ce système, une réaction de substitution nucléophile (S_N2) est réalisée afin de lier de manière covalente deux oligonucléotides portant respectivement un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur. Une fois la liaison générée, la proximité de ces deux fluorophores va aboutir sur la production d'un signal de fluorescence spécifique (Xu *et al.* 2001) (**Figure 13 a**).

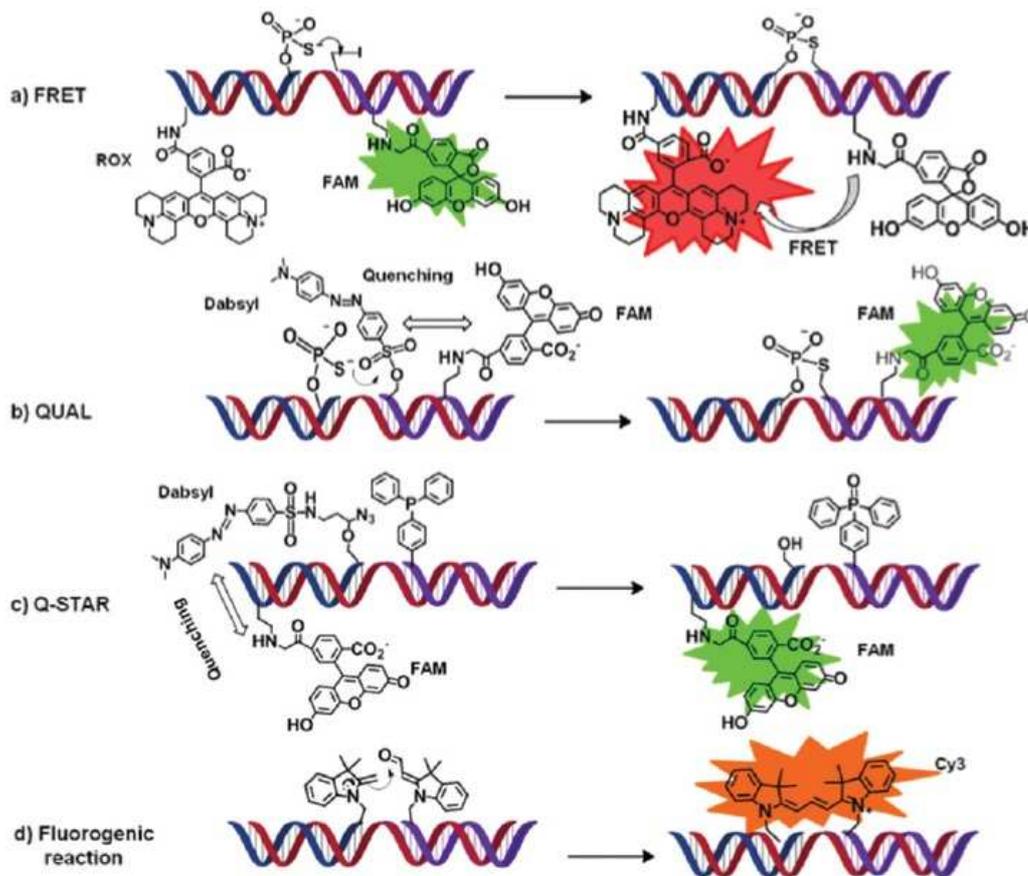


Figure 13 : Exemples d'OTR appliqués à la détection de séquences spécifiques : a) – d) quatre exemples appliqués d'OTR pour la détection de séquences spécifiques d'ADN (ou d'ARN). Pour chaque système, après hybridation des sondes (ici en bleu) sur la séquence ciblée (en rouge), il se produit une réaction chimique conduisant à l'apparition d'un signal de fluorescence caractéristique. (Figure issue de Percivalle *et al.* 2013)

Cette approche a été décrite pour la première fois par Kool *et al.* Ces derniers réalisèrent, grâce à l'effet "matrice" d'une séquence cible, une OTR (S_N2) entre un phosphorothioate (nucléophile) situé en partie 3'-terminale d'un premier oligonucléotide et un iodure situé en partie 5'-terminale d'un second oligonucléotide (électrophile). Les nucléotides ainsi liés sont porteurs, pour le premier, d'une molécule de rhodamine (ROX - jouant le rôle d'accepteur), et pour le second, d'une molécule de

fluoresceine (FAM - jouant le rôle de donneur). Cette méthode a permis la détection et l'identification de séquences spécifiques dans un milieu hétérogène d'ADN et d'ARN (Xu *et al.* 2001). Cependant, il n'existe qu'un nombre limité d'exemples d'OTR utilisant exclusivement le FRET pour ce type d'application, qui apparaît le plus souvent combiné à la restauration d'un signal de fluorescence désactivé.

3.2.2. Détection par restauration d'un signal de fluorescence

Cette méthode peut se diviser en deux approches différentes : (i) une première approche consiste à restaurer le signal d'un fluorophore par la perte, dans son entourage proche, d'une molécule responsable de sa "désactivation" (généralement par une réaction de clivage) (**Figure 13 b) et c)**) ; (ii) une autre approche consiste à restaurer le signal d'un fluorophore par une réaction modifiant sa structure électronique et/ou conformationnelle.

Les sondes dites "Quenched auto-ligation" (QUAL) sont probablement l'exemple le plus répandu de cette méthode dans la littérature (Sando *et al.* 2002, Sando *et al.* 2002), où la fluorescence est inhibée par un mécanisme de transfert d'énergie par résonance vers un substrat désactivant ("désactivateur"). Ces sondes "QUAL" sont généralement constituées de deux oligonucléotides ; un premier contenant un phosphorothioate (nucléophile) à son extrémité 3'-terminale, et un second contenant un groupement désactivateur (Dabsyl) directement attaché à la partie 5'-hydroxy terminale et un fluorophore (Sando *et al.* 2002). L'hybridation simultanée de ces deux sondes à une séquence d'ADN (ou d'ARN) complémentaire ciblée provoque la perte du "désactivateur" (via un mécanisme d'addition-élimination) et permet ainsi l'émission de fluorescence. Si les sondes "QUAL" ont, dans un premier temps, été utilisées dans des systèmes ne comportant qu'un seul fluorophore (une seule couleur), des travaux ont permis de mettre en évidence leur faculté à distinguer, simultanément et de manière hautement sélective, plusieurs oligonucléotides dont la séquence ne varie que d'un seul nucléotide, par un système à plusieurs fluorophores (multiplex) (Sando *et al.* 2004).

Malgré la haute sélectivité observée avec ce type de sondes, une limite réside dans le faible rendement de ses réactions, puisque l'affinité du produit formé pour son substrat est plus grande que celle de ses réactifs, limitant ainsi le nombre de fluorophores libérés en agissant comme un inhibiteur de la réaction. Afin de contourner cette difficulté, Kool *et al.* ont modifié les propriétés d'ancrage du groupement désactivateur (groupe partant) sur la sonde de manière à ce que le produit de la réaction déstabilise l'hybridation de cette sonde sur sa séquence cible (Abe *et al.* 2004).

Une autre limitation à l'utilisation de ces sondes réside dans le bruit résiduel (fluorescence) produit par le fluorophore désactivé, conséquence d'une inactivation incomplète ou d'une hydrolyse

partielle du "désactivateur". Dans le but de palier à ce problème, différents travaux ont mis en évidence l'intérêt de l'ajout d'un second "désactivateur" dans le système. Si cet ajout nécessite une seconde réaction d'hydrolyse pour "libérer" le fluorophore, il permet d'augmenter de façon considérable le rapport signal/bruit de ce type de sondes (Kleinbaum *et al.* 2010, Kleinbaum *et al.* 2010).

Différentes variations de ces sondes ont également été mises au point. Une de celle-ci a été obtenue en ajoutant au système un accepteur de fluorescence (sondes QUAL-FRET) (Abe *et al.* 2006, Silverman *et al.* 2006). Ces sondes associent la désactivation du fluorophore par un "désactivateur" au transfert de l'énergie par résonance d'un donneur de fluorescence (e.g., FAM) à un accepteur de fluorescence (e.g., Cy5 ou TAMRA). Le donneur de fluorescence est localisé sur la sonde nucléophile, empêchant ainsi la détection d'un signal dû à une hydrolyse involontaire du "désactivateur". Dans ce cas, le signal (FRET) est généré uniquement lors de la réaction (OTR-SN₂) entre les deux sondes, disposant, de manière suffisamment proche, le donneur et l'accepteur.

Un autre système, nommé "Q-STAR", associe aux sondes QUAL une activation de la fluorescence par une réaction bioorthogonale (biocompatible), où le fluorophore (Fluoresceine) et le "désactivateur" (Dabsyl) sont directement liés par un α -azido ether. En présence de l'oligonucléotide ciblé, la sonde Q-STAR s'hybride à proximité d'une seconde sonde portant un groupement triphénylphosphate (Franzini *et al.* 2009). Le groupement azido va être réduit (réaction de Staudinger), entraînant le départ du "désactivateur" et l'émission de fluorescence. Les sondes Q-STAR ont notamment été appliquées à la détection d'ADN double brin (Li *et al.* 2010). Des dérivés de ces sondes, comportant deux "désactivateurs" (2-STAR) ou présentant des fluorophores différents offrant une vaste gamme de fluorescence (allant du proche UV au proche IR), ont également été décrits (Franzini *et al.* 2011, Franzini *et al.* 2011).

Enfin, d'autres systèmes ont également été développés, dans lesquels l'hybridation de la sonde sur l'ADN ou l'ARN ciblé entraîne la conversion d'un pro-fluorophore (non fluorescent) en une molécule fluorescente. Sur ce principe, les travaux de Ito *et al.*, décrivent un système où une dinitro-benzensulfonyl-amino-coumarine (non-fluorescente) réagit par une réaction de substitution nucléophile aromatique avec un phosphorotioate pour former une amino-coumarine libre (fluorescente) (Shibata *et al.* 2009).

3.2.3. Détection par réactions fluorogéniques

Les OTR fluorogéniques impliquent généralement deux sondes nucléotidiques, conjuguées chacune à un précurseur de fluorophore. L'hybridation de ces sondes sur la séquence ciblée va induire une réaction entre ces précurseurs et produire ainsi un fluorophore. Ce type de détecteur a pour

avantage principal de n'avoir qu'un très faible (ou inexistant) bruit résiduel de fluorescence à l'état de précurseur, ce qui leur confère un très fort rapport signal/bruit lors de la formation du produit de réaction. A ce jour, seulement quelques exemples de ce système ont été décrits dans la littérature, du fait notamment du faible nombre de réactions existantes de ce type (Huang *et al.* 2008, Jentzsch *et al.* 2009, Maguelliati *et al.* 2010, Koripelly *et al.* 2010). Un premier exemple met en jeu une réaction "click" de cycloaddition catalysée par un complexe de cuivre (Cu^+ -THPTA) entre deux oligonucléotides fonctionnalisés (Jentzsch *et al.* 2009). Dans cette réaction, une 4-ethynyl-1,8-naphtalenimide réagit avec un benzylazide pour former une 4-(1,2,3-triazol-4-yl)-1,8-naphtalenimide fluorescente. Cependant, si l'on observe une sensibilité et une sélectivité de séquence importante de ces sondes, le complexe de cuivre présent dans le milieu désactive partiellement le fluorophore formé, ce qui implique une étape réactionnelle ultérieure afin de restaurer le signal (Jentzsch *et al.* 2009).

D'autres travaux décrivent une réaction de condensation aldolique entre un hétérocycle quaternaire d'ammonium, comportant un groupement méthylène activé, et un aryl-aldéhyde formant une hémicyanine fluorescente (Huang *et al.* 2008). Une fois encore, la limite de ce système réside dans l'ajout nécessaire d'une base aminée afin de catalyser la réaction. Une alternative à cette limitation a été rapportée par Ladame *et al.*, décrivant la formation par OTR d'une cyanine fluorescente par une réaction d'aldolisation-élimination dans des conditions de tampon et de pH physiologique (Maguelliati *et al.* 2010, Koripelly *et al.* 2010) (**Figure 13 d**).

Dans ce système, deux sondes PNA ont été synthétisées, comportant chacune cinq bases nucléiques complémentaires d'une séquence ciblée. Chaque PNA a été fonctionnalisé à sa partie C-terminale ou N-Terminale avec, respectivement, un méthylène indol et un indol-aldéhyde (base de Fischer) dont la réaction va produire une triméthyl cyanine (fluorophore). Ces travaux ont également démontré le potentiel de ces sondes à détecter des structures oligonucléotidiques secondaires (e.g. quadruplex, hairpin...).

En dépit du nombre important d'OTR reporté dans la littérature à ce jour, seulement une faible proportion de ces travaux s'applique à la détection de séquences oligonucléotiques spécifiques. Ce constat s'explique notamment par le besoin de réaliser ces réactions en condition physiologique de pH, de température et de concentration saline nécessaires à une application *in vivo*. L'ajout de réactifs secondaires, souvent observé dans ce type de réaction, peut également poser des problèmes de biocompatibilité et apparaît donc comme une limite à ce type de détection.

4. La microfluidique digitale en microgouttelettes

La microfluidique peut être décrite comme l'étude et le développement de systèmes micrométriques dans le but de manipuler et de contrôler de faibles volumes de fluides (Huebner *et al.* 2008). Depuis les années 80, cette technique a évolué pour s'adapter à des applications chimiques et biologiques, avec pour but de minimiser les réactifs et les solvants ainsi que les temps de réaction (Withesides 2006). La microfluidique digitale en est une sous-catégorie dont le principe est de compartimenter des réactifs dans de faibles volumes de gaz ou de liquides de façon à produire une multitude de réactions simultanément. Le terme de microfluidique digitale fera référence dans ce document à la microfluidique en gouttelettes dont l'objectif est la production et la manipulation d'émulsions, d'une phase dispersée aqueuse dans une phase continue huileuse, au sein de microcanaux (Teh *et al.* 2008). Les différents principes et concepts qui régissent cette technique seront abordés ci-dessous.

4.1. Principes et généralités

4.1.1. Régime laminaire

Puisque les phénomènes d'écoulement observés dans les systèmes microfluidiques ont une part prépondérante dans la pratique de cette discipline, il est indispensable d'en comprendre les principes de base. Ainsi, les flux dans les canaux microfluidiques sont généralement caractérisés par un faible "nombre de Reynolds" (Re) :

$$Re = \frac{\rho v l}{\mu}$$

où ρ correspond à la densité du liquide (kg.m^{-3}) ; v sa vitesse (m.s^{-1}) ;

μ sa viscosité dynamique (Pa.s^{-1}) ; et l la dimension caractéristique du système (m^2).

Re (sans dimension) peut être défini comme le degré de turbulence observé lors de l'écoulement d'une phase liquide. Cette valeur est directement liée à la vitesse d'écoulement, la densité du liquide, ainsi qu'à la section du canal traversé, de telle sorte que toute augmentation d'un de ces paramètres entraîne l'augmentation du nombre de Reynolds. Un régime de flux laminaire (**Figure 14 A**) se caractérise par un $Re < 2000$, alors qu'un $Re > 2000$ décrit un régime turbulent (**Figure 14 B**). Dans les systèmes microfluidiques où la section des canaux est généralement de l'ordre d'une centaine de micromètres carrés, le nombre de Reynolds est inférieur à 1. Dans de tels systèmes, les stress visqueux et les gradients de tension prédominent, alors que les forces d'inertie et gravitationnelles sont généralement négligeables. Les phénomènes de diffusion y sont, en conséquence, limités en

comparaison des phénomènes de convections. La prédominance de l'un ou l'autre de ces phénomènes dans un système est définie par le "nombre de Péclet" (Pe) :

$$Pe = \frac{Ul}{D}$$

où U est la vitesse moyenne du flux axial ($m.s^{-1}$) ; l la section du canal (m^2) ; et D la constante de diffusion ($m^2.s^{-1}$).

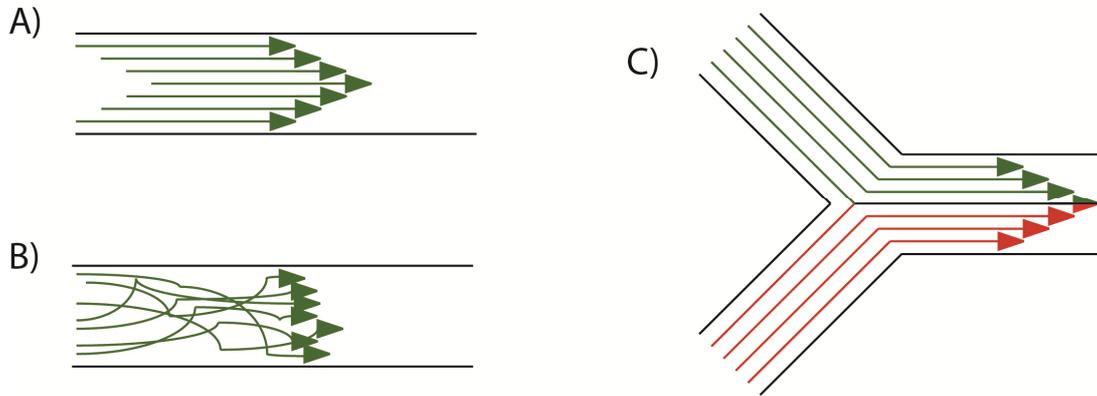


Figure 14: Différents régimes d'écoulement de fluides : A) laminaire ; B) turbulent ; C) écoulement conjoint de deux liquides en régime laminaire (diffusion à l'interface).

La valeur de Pe observée dans les canaux microfluidiques se situe entre 10 et 10^5 . Dans ce cas, deux liquides circulant conjointement dans un même canal ne se mélangeront pas (**Figure 14 C**), mais des échanges de molécules peuvent se produire à l'interface par des phénomènes de diffusion (Ismagilov *et al.* 2000).

Ces phénomènes sont dépendant des conditions intrinsèques du système et des molécules échangées et se définissent par la diffusion transverse " x " :

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt$$

où D correspond à la constante de diffusion et t le temps de contact à l'interface (s).

On peut définir la constante de diffusion D et le temps de contact t par les équations suivantes :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a} \quad \text{et} \quad t = \frac{L}{v} \quad \text{d'où} \quad \langle x^2 \rangle = \frac{kTL}{3\pi\eta a v}$$

où k correspond à la constante de Boltzman ; T la température (K) ; η la viscosité dynamique (Pa.s) ; a le rayon de la molécule (m) ; L la distance de contact entre fluides (m) et v la vitesse des fluides ($m.s^{-1}$).

La diffusion transverse étant limitée par la section du canal et inversement proportionnelle à la vitesse de déplacement des fluides, elle peut être contrôlée dans les canaux microfluidiques. Ces

caractéristiques rendent le régime laminaire intéressant pour l'analyse de molécules biologiques (détection d'ADN, de protéines) (Brewer *et al.* 2008). Cependant, dans le cas de cinétiques rapides entre deux ou plusieurs réactifs présents dans des phases distinctes, la réaction ne se produit que rarement sur l'ensemble du volume. Par conséquent, pour les réactions rapides, la quantité de produit formée est directement proportionnelle au degré de mélange des fluides. Différentes stratégies ont été mises au point afin de mélanger rapidement deux phases continues dans un canal microfluidique (Ottino *et al.* 2004, Ottino *et al.* 2004, Squires *et al.* 2005).

Un autre phénomène observé dans les systèmes microfluidiques est la dispersion de Taylor-Aris (Taylor 1953, Aris 1956). Cette dispersion se caractérise par une contrainte appliquée sur le liquide en progression par les bords du canal microfluidique, ce qui aboutit à l'apparition d'un front de progression de forme parabolique ("Poiseuille flow"). Dans ce cas de figure, la vitesse de progression du liquide est maximale au centre du canal, alors qu'elle est quasi nulle au niveau des parois (**Figure 15**). Ce phénomène induit une progression non-uniforme des particules en suspension (microgouttelettes, cellules, molécules...) mais peut être limité par une géométrie particulière des canaux (Frenz *et al.* 2009).

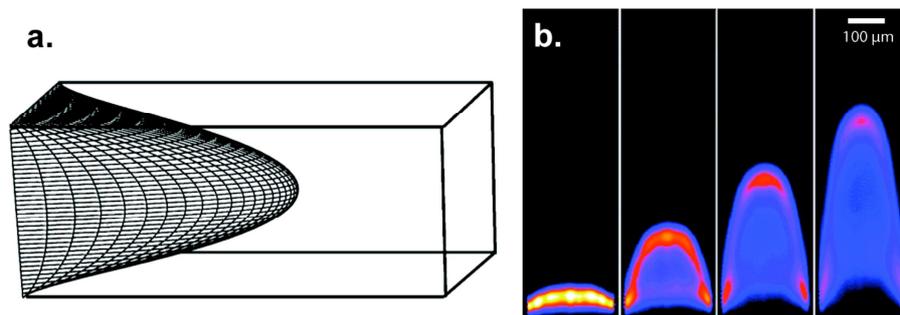


Figure 15 : Phénomène de dispersion de Taylor-Aris : a. Représentation tridimensionnelle du profil d'écoulement d'un liquide en flux laminaire (Jo *et al.* 2009) ; b. observation de la déformation d'un fluide et la répartition de son contenu pendant son écoulement (Datta *et al.* 2009) (Figure issue de Mazutis *et al.* 2009).

4.1.2. Production de gouttes : la microfluidique digitale.

La microfluidique digitale consiste à produire des gouttelettes dans des microcanaux entre deux liquides non miscibles. Dans ce système, une phase "dispersée" (gouttelettes) est sectionnée de manière régulière par une phase "continue" (liquide environnant). La fréquence de production des gouttelettes varie généralement entre 0.1 et 10 kHz, mais certains travaux rapportent des vitesses de production de l'ordre de 30 kHz, correspondant à la formation de 10^8 gouttelettes ($\varnothing = 25-30 \mu\text{m}$) par heure (Holtze *et al.* 2008). La taille des gouttes produites varie également, de quelques micromètres

à plusieurs centaines de micromètres de diamètres, ce qui correspond généralement à la section des canaux microfluidiques employés. Ces systèmes ont pour avantage de contrôler, avec une très grande précision, la variation en taille des gouttes produites et permettent d'obtenir une monodispersité importante ($CV < 1\%$). Un autre avantage de cette technique est de pouvoir faire varier le contenu des microgouttelettes formées en modifiant simplement les flux de différents liquides encapsulés simultanément (Song *et al.* 2006, Huebner *et al.* 2008).

La production de microgouttelettes est un processus complexe et dynamique dépendant de différents paramètres, tels que le nombre capillaire, la vitesse d'écoulement entre les phases, la viscosité des liquides employés, la concentration en tensioactif ainsi que la géométrie et la structure du module microfluidique. L'influence de l'inertie et de la gravité sont négligeables dans ce type de système (Gunther *et al.* 2006). Il n'existe pas de modèle standard dans la production de microgouttelettes car chaque module possède ses spécificités dues à la géométrie du système (Christopher *et al.* 2007). Au regard de la géométrie particulière de ces canaux, la formation de microgouttelettes peut être décrites comme un équilibre entre les contraintes de cisaillement appliquées aux fluides à l'interface, et la pression capillaire agissant contre cette contrainte. Cet équilibre entraîne la formation d'une gouttelette au niveau de la jonction entre les deux fluides. La production de microgouttelettes peut donc être décrite comme la rupture, due aux contraintes de cisaillement, de la phase dispersée par la phase continue (Joanicot *et al.* 2005). La taille des gouttelettes formées peut être associée aux caractéristiques du système par le nombre capillaire (sans dimension) :

$$Ca = \frac{v\mu}{\gamma} \sim \frac{w}{d}$$

où v correspond à la vitesse de la phase continue ($m.s^{-1}$), μ la viscosité dynamique ($Pa.s$), γ la tension

interfaciale ($N.m^{-1}$), w la dimension du canal à l'intersection des deux fluides (m^2) et d la taille de la goutte (m).

Il existe deux types de jonction couramment utilisés pour la formation de gouttelettes en microfluidique digitale : la jonction en T et la focalisation hydrodynamique.

4.1.3. La jonction en T

Les premières études de production de microgouttelettes dans des systèmes microfluidiques décrivent la rupture d'un flux perpendiculaire par une force de cisaillement induite par la présence d'un second flux perpendiculaire. Une partie de la phase dispersée est entraînée par le courant de la phase continue formant un coude liant la goutte en formation à sa phase. Cette goutte va croître

jusqu'à ce que les forces de cisaillement surpassent les tensions interfaciales, aboutissant à la rupture du coude et la formation d'une gouttelette (Thorsen *et al.* 2001) (**Figure 16**). L'équation suivante relie le diamètre de la gouttelette produite aux différentes contraintes imposées par le système :

$$r = \frac{\gamma}{\eta \varepsilon}$$

où r correspond au diamètre de la gouttelette (m), γ à la tension interfaciale (N.m^{-1}), η la viscosité de la phase continue (Pa.s) et ε la force de cisaillement au niveau de la jonction (N).

D'autres travaux ont permis de décrire ce processus, notamment les travaux de Garstecki *et al.* (Garstecki *et al.* 2006). D'après cette étude, le processus de formation de gouttelettes débute quand la phase dispersée pénètre le canal principal occupé par la phase continue. Le film de phase continue présent entre l'interface des deux liquides et les parois du canal diminue, alors que la pression dans le canal augmente. Le gradient de pression et le flux dans ce canal déforment la gouttelette en formation et l'interface se déplace du front vers l'arrière de la gouttelette. Quand l'interface est localisée à l'arrière de la goutte, la jonction la connectant à la phase dispersée est rompue libérant une gouttelette dans le flux de phase continue. Le volume de cette gouttelette formée peut être ajusté en modifiant la vitesse des flux entre les deux phases. Ce modèle ("squeezing regime") est confirmé par les résultats expérimentaux en modifiant les vitesses des flux et pour des viscosités variables des phases employées (Van der Graaf *et al.* 2006, Christopher *et al.* 2008, De Menech *et al.* 2008). Garstecki *et al.* ont également mis en avant l'importance de la dimension de la jonction entre les phases. Ainsi quand la section du canal principal (phase continue, S_p) est bien plus importante que la section du canal secondaire (phase dispersée, S_s) de telle sorte que $S_p/S_s > 4$, les contraintes de cisaillement imposées sur la goutte en formation sont trop importantes et cette dernière n'a pas le temps d'atteindre une taille suffisante pour remplir le canal avant de se détacher de sa phase : on est alors dans un régime au "goutte à goutte" ("dripping regime") qui peut être décrit par le nombre capillaire (Garstecki *et al.* 2006, Thorsen *et al.* 2001, Nisisako *et al.* 2002, Husny *et al.* 2006, Christopher *et al.* 2008). Puisque les contraintes de cisaillement prédominent dans ce type de régime, la viscosité de la phase dispersée a donc également un rôle significatif dans la production de gouttelettes (Gupta *et al.* 2009). En effet, quand la viscosité de la phase dispersée augmente, les forces de cisaillement augmentent également et facilitent le départ de gouttelettes de tailles réduites. A l'inverse, l'augmentation de la viscosité de la phase continue provoque l'effet contraire puisqu'elle entraîne la diminution du nombre capillaire et donc l'augmentation du volume des gouttelettes formées. Ces différents phénomènes peuvent également être observés dans un régime

dominé par les gradients de pression ("squeezing regime"). Un troisième régime apparaît quand les vitesses de flux sont trop importantes ou quand les tensions interfaciales sont faibles (Ca élevé), aboutissant sur la production irrégulière de gouttes plus polydisperses en taille ("Jetting regime"). La transition du "dripping" au "jetting" peut se produire à des valeurs de Ca faible quand la viscosité de la phase continue est élevée (Guillot *et al.* 2005, De Menech *et al.* 2008, Tice *et al.* 2004).

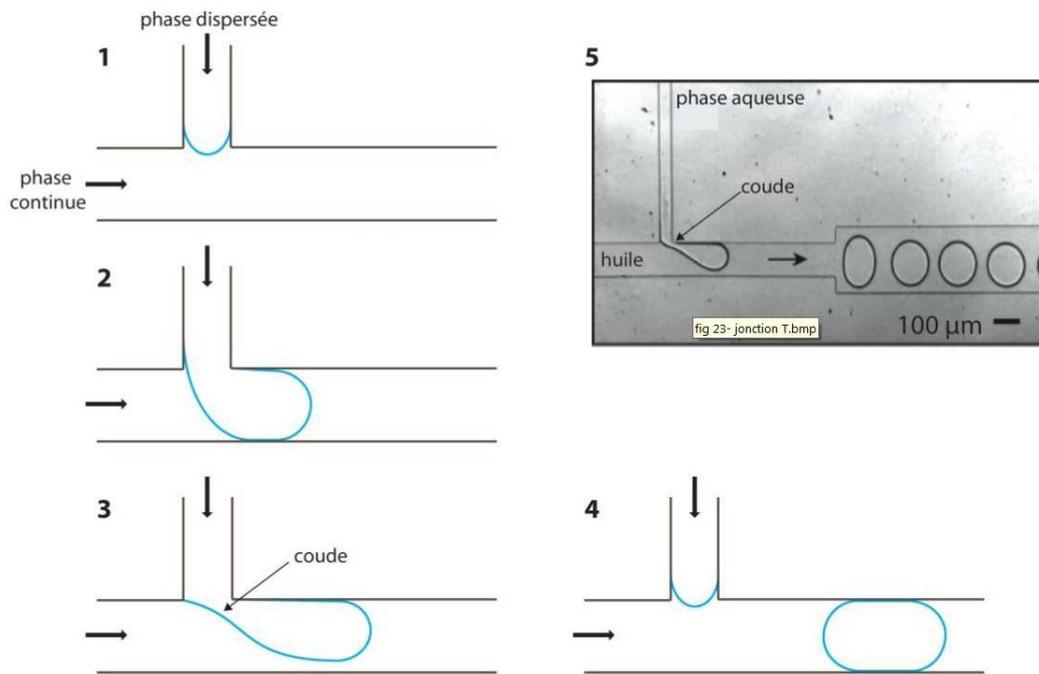


Figure 16 : Production de microgouttelettes avec une jonction en T : (1 – 4) observation des différentes étapes de formation d’une microgouttelette à travers une jonction en T ; (5) photo d’un canal de production de microgouttelette utilisant une jonction en T (Figure issue de Beneyton *et al.* 2011).

4.1.4. La focalisation hydrodynamique

La focalisation hydrodynamique est un système dans lequel les différentes phases (continue et dispersée) sont introduites dans des canaux microfluidiques aboutissant sur une jonction croisée qui va induire la production de microgouttelettes. La phase continue est séparée en deux canaux distincts qui vont se rejoindre pour couper le canal de la phase dispersée au niveau de la jonction (**Figure 17**). Les deux liquides sont alors contraints de s’écouler dans un même canal étroit localisé en aval de la jonction (Anna *et al.* 2003, Garstecki *et al.* 2005, Ward *et al.* 2005).

La géométrie particulière de la jonction, ainsi que les flux volumiques participent à la déformation de l’interface. L’expérience démontre que, dans ce type de système, la gouttelette en formation va se placer à l’embouchure de la jonction et ainsi obstruer le flux de phase continue. L’augmentation de la

pression dans cette phase va aboutir à la cassure du flux de phase dispersée, générant le départ d'une gouttelette dans le canal de sortie. Ce processus est lent en comparaison du temps de relaxation de l'énergie interfaciale et résulte de l'addition d'une série d'états d'équilibre. Ainsi, le coude qui lie la gouttelette en formation à sa phase devient si fin et instable qu'il rompt rapidement sans contribuer au volume de la gouttelette formée (Garstecki *et al.* 2005). Certains travaux ont également pu mettre en évidence que ce phénomène n'était pas dirigé par les tensions de surfaces mais par les pressions extérieures (pousse-seringue) imposées aux liquides dans la puce. (Garstercki *et al.* 2005). Ce mécanisme est assez proche de celui observé pour la jonction en T. La distribution des pressions au niveau des orifices d'entrée des canaux s'équilibre bien plus rapidement ($\approx 10^{-8}$ s) que le temps d'obstruction du canal de sortie ($\approx 10^{-3}$ s). Cette différence observée entre le temps de progression lent dans le canal efférent et le processus d'équilibre rapide des interfaces conduit à la formation parfaitement régulière de microgouttelettes, et donc à la production d'une émulsion hautement monodisperse en taille.

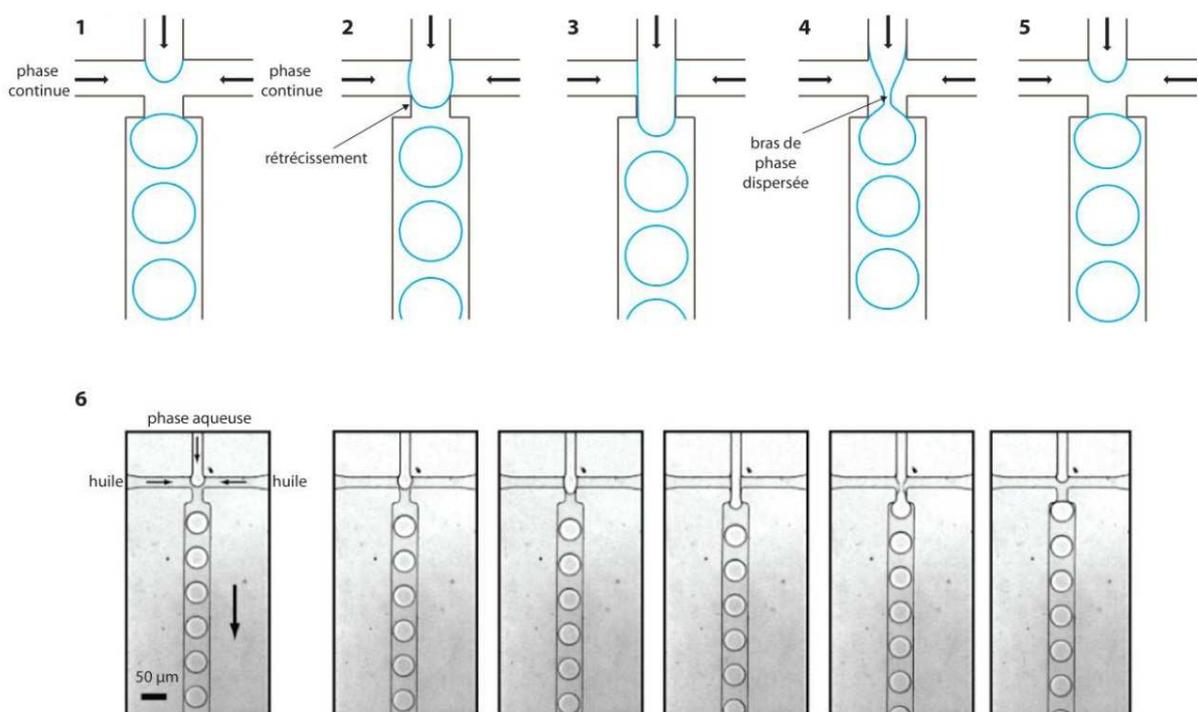


Figure 17 : Production de microgouttelettes avec la focalisation hydrodynamique : (1 – 6) Représentations schématiques et photos des différentes étapes de production de microgouttelettes par la focalisation hydrodynamique (Figure issue de Beneyton *et al.* 2011).

Le volume des gouttelettes générées par la focalisation hydrodynamique dépend de plusieurs paramètres qui peuvent être contrôlés. Ainsi, le débit d'injection des différents liquides dans les canaux influe sur ce volume et peut être défini par un système de pousse-seringue électrique. De

même, les dimensions de la jonction et la section des canaux sont également des paramètres importants pour déterminer le volume des gouttes formées (Dollet *et al.* 2008). On note que plus la jonction est fine, plus le volume des gouttes sera faible, alors que plus le rapport des débits de phase continue sur phase dispersée est bas, plus le volume des gouttes sera élevé. En présence de débit très important ($Ca > 0.1$), on observe le même phénomène de "dripping" décrit dans les systèmes de jonction en T (Anna *et al.* 2003, Gerstecki *et al.* 2005). Durant ce régime de "goutte-à-goutte", le coude formé entre la goutte en formation et sa phase ne se rétracte pas et laisse se détacher des microgouttelettes de taille inférieure à la section du canal. Dans un régime extrême (nombre capillaire très élevé), on observe également un phénomène de "jetting", où les gouttes sont produites avec des volumes aléatoires et accompagnées souvent de microsatelites (gouttelettes de très faible volume se détachant de la phase dispersée au moment de la production d'une goutte) (Nie *et al.* 2008).

Enfin, un certain nombre de travaux ont mis en évidence l'effet joué par l'ajout d'un tensioactif dans la phase continue lors de la production de microgouttelettes (Anna *et al.* 2006, Jin *et al.*, Wang *et al.* 2009). Ce dernier va agir en diminuant les tensions interfaciales, ce qui aura pour conséquence d'augmenter le temps de détachement de la gouttelette en formation permettant ainsi à cette dernière d'acquérir un volume plus important dans des conditions de dimensions de canaux et de débit de liquides équivalents.

4.1.5. Comparaison entre jonction en T et focalisation hydrodynamique

Si les systèmes de jonction en T et de focalisation hydrodynamique sont tous deux utilisés pour la production de gouttelettes en microfluidique digitale, les paramètres à prendre en compte pour la formation d'une émulsion monodisperse en taille divergent (Abate *et al.* 2009). On observe notamment, à des valeurs de Ca faible ($<10^{-2}$), que, contrairement à la focalisation hydrodynamique, des gouttelettes peuvent être générées dans un système à jonction en T indépendamment des paramètres de viscosité ou de tension interfaciale entre liquides. A des valeurs de Ca moyennes ($10^{-2} < Ca < 10^{-1}$), les deux systèmes permettent la production de gouttelettes, bien que l'on observe un volume plus important avec la focalisation hydrodynamique à paramètre équivalent. A des valeurs de Ca plus élevées (≈ 0.1), les deux phases circulent dans le canal efférent sans former d'émulsion dans un système à jonction en T, alors qu'on observe toujours la production de gouttelettes dans le système à focalisation hydrodynamique ("dripping"). De part ces constatations, la focalisation hydrodynamique apparaît mieux adaptée à la production à très haut débit de gouttelettes monodisperses en microfluidique digitale (>10 kHz). Cependant, si la fréquence de production n'est pas un paramètre essentiel de la manipulation, la jonction en T peut être particulièrement

intéressante pour la production alternative de microgouttelettes (Belloul *et al.* 2013). Plusieurs travaux ont notamment mis en évidence l'intérêt de ce système en microfluidique en couplant deux jonctions en T successives pour l'étude de protéines cristallisées (Zheng *et al.* 2004, Zheng *et al.* 2004) ou pour la synthèse de nanoparticules (Hung *et al.* 2006, Frenz *et al.* 2008). Enfin, à des valeurs de Ca très élevées (>0.1), l'utilisation de système de focalisation hydrodynamique aboutit à la production d'une émulsion polydispense en taille due au phénomène de "jetting". Ce phénomène a cependant été utilisé pour la production de doubles émulsions où une microgouttelette est encapsulée dans une seconde gouttelette de plus grand diamètre (Utada *et al.* 2005) ou pour l'encapsulation de cellule unique (Chabert *et al.* 2008).

Outre les différents régimes observés liés au nombre capillaire, une des caractéristiques principales de la jonction en T réside dans le fait que la phase dispersée, lors de la production de gouttelettes, est en contact permanent avec la paroi du canal principal, ce qui peut induire une modification de ces propriétés de surfaces. En effet, les puces les plus couramment utilisées en microfluidique sont fabriquées en matière polymère PDMS (Poly(diméthylsiloxane)), dont l'effet sur une phase aqueuse (généralement la phase dispersée) peut provoquer des problèmes de production d'émulsion dus aux phénomènes de "mouillage" (que nous traiterons ultérieurement). Ces problèmes sont limités par l'utilisation d'un module à focalisation hydrodynamique dans lequel la phase dispersée est constamment entourée de la phase continue au travers du canal efférent. Pour illustrer ce phénomène, les travaux de Liao *et al.*, portant sur l'encapsulation de protéines dans un système d'émulsion d'eau-dans-l'huile, ont mis en évidence l'impossibilité d'utilisation de module à jonction en T pour ces expériences dû à un effet de "collage" des protéines sur les parois du canal. Cet effet n'est cependant pas observé lors de l'utilisation de module à focalisation hydrodynamique (Liao *et al.* 2005). D'autres travaux ont également mis en évidence la tendance à la production de satellites lors de l'utilisation de jonction en T pour la production d'émulsions (Tan *et al.* 2005, Husny *et al.* 2006, van der Graaf *et al.* 2006, Sang *et al.* 2009). Au regard de ces problèmes, l'utilisation de module à focalisation hydrodynamique apparaît comme la méthode la plus adaptée à l'utilisation en microfluidique digitale.

4.1.6. Autres méthodes de production de microgouttelettes

D'autres méthodes microfluidiques alternatives ont été mises au point pour la production d'émulsion. Ces méthodes sont indépendantes de la géométrie des canaux et nécessitent l'utilisation d'une source d'énergie externe au module. Elles offrent généralement une fréquence de production moindre mais une meilleure flexibilité dans le volume des gouttes formées. Ainsi, certains travaux ont mis en évidence, en combinant jonction en T et déflexion membranaire, la possibilité de

produire de larges gouttelettes de plus de 100pL (Willaime *et al.* 2006, Zeng 2009). Dans ce système, la déflexion de la membrane altère le débit de la phase dispersée, modifiant ainsi le volume des gouttes produites. D'autres travaux, utilisant l'ajout de valves au point d'entrée des différentes phases, ont démontré la possibilité de contrôler le volume des gouttelettes formées (Abate *et al.* 2009). Enfin, la production de gouttes peut également être engendrée par l'application d'un champ électrique pulsé (CEP) ($A=900\text{ V}$; $t=50\text{ ms}$) mais la fréquence est généralement faible ($<100\text{ Hz}$) (He *et al.* 2005).

4.1.7. Double émulsion

La double émulsion consiste en l'encapsulation d'une gouttelette composée d'un liquide donné dans un second liquide non miscible au premier. Plusieurs applications de ce type d'émulsion sont décrites dans la littérature et permettent notamment la formation lente de produits réactionnels dont les réactifs sont séparés dans différentes gouttelettes au sein d'une même goutte. Cette technique, couplée à la cytométrie de flux (FACS – Fluorescent-activated cell sorting), a notamment été utilisée pour la détection à haut débit de variants protéiques optimisés (Mastrobattista *et al.* 2005).

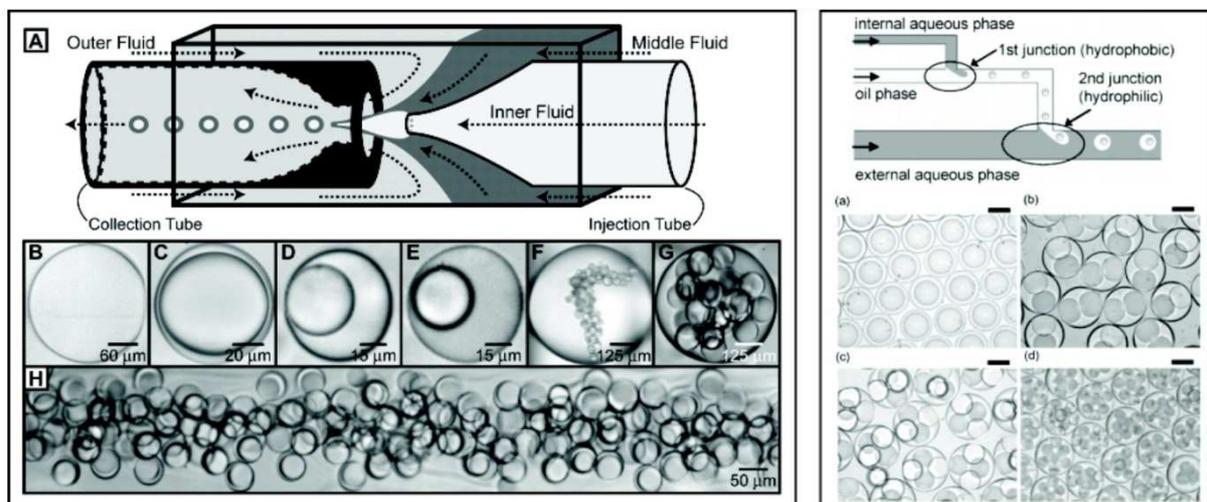


Figure 18 : Productions et exemples d'émulsions doubles : (à gauche) méthode de préparation d'une émulsion double par un système capillaire et exemples d'émulsion doubles d'eau dans l'huile dans l'eau (Utada *et al.* 2005) : (à droite) méthode de préparation d'une émulsion double par une succession de jonction en T et exemples d'émulsions doubles (Okishima *et al.* 2004) (Figure issue de Mazutis *et al.* 2009)

Ce type d'émulsion a d'abord été obtenu par agitation mécanique, ou en contraignant les fluides à passer au travers d'une membrane, mais ces différentes techniques aboutissent nécessairement sur une distribution aléatoire en volume de gouttes, ainsi que sur un faible rendement de double

encapsulation (Matsumoto *et al.* 1976, Ficheux *et al.* 1998, Nakashima *et al.* 2000, Bernath *et al.* 2004). L'apport de la microfluidique, combinant une série de jonction en T (Okushima *et al.* 2004) ou de module de focalisation hydrodynamique (Pannacci *et al.* 2008, Xu *et al.* 2009) a permis d'augmenter considérablement le rendement et la monodispersité volumique des gouttes obtenues (**Figure 18**).

4.1.8. Phénomène de mouillage

Si la géométrie des modules a un rôle prépondérant dans la production d'une émulsion, les phénomènes de mouillage sont également à prendre en considération. En effet, pour une émulsion d'eau-dans-l'huile uniforme, la phase continue (huileuse) doit "mouiller" préférentiellement les parois des canaux microfluidiques par rapport à la phase dispersée (aqueuse). Si ces conditions sont respectées, cette dernière ne rentrera pas en contact avec les parois du canal efférent et sera toujours entourée d'un fin film de phase continue (Gunter *et al.* 2006). A l'inverse, une émulsion d'huile dans l'eau nécessitera un mouillage préférentiel des canaux par la phase aqueuse. Ainsi, le type d'émulsion produit dépendra donc des propriétés de mouillage à la surface des canaux microfluidiques et sera indépendant de la structure des tensioactifs employés (Shui *et al.* 2009). Ces caractéristiques s'opposent à la production d'émulsion par action mécanique qui dépend fortement de la proportion des parties hydrophobiques et hydrophiliques des tensioactifs utilisés (Dukhin *et al.* 1995).

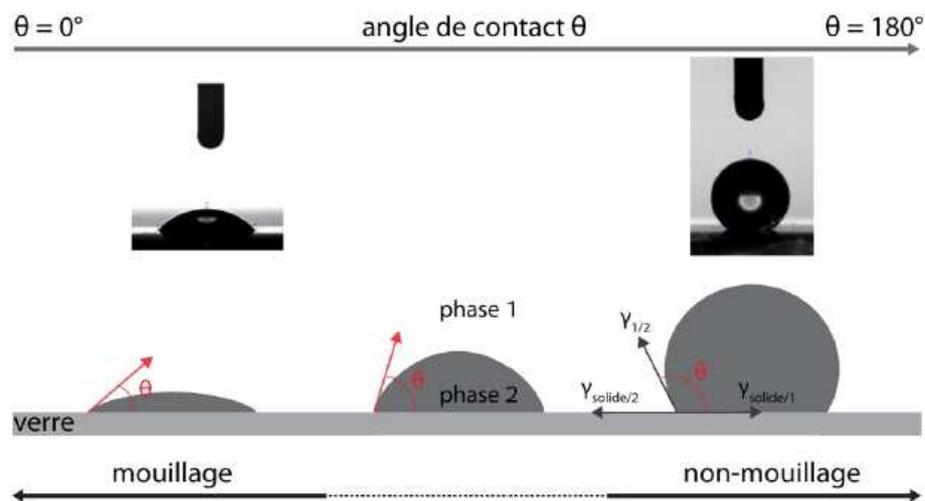


Figure 19 : Phénomène de mouillage : Schématisation de l'effet du mouillage sur une surface de verre. Dans des situations extrêmes, l'angle de contact liquide/verre $\theta = 0^\circ$ correspond à un mouillage parfait (gauche), alors qu'un angle $\theta = 180^\circ$

correspond à une situation de non-mouillage parfait. Les tensions interfaciales entre les différentes phases (1 et 2) et la surface du verre est représenté par γ . (Photographies provenant de www.nml.lhu.edu.tw)

D'un point de vue physique, le mouillage à la surface des canaux peut être décrit par la tension interfaciale γ et l'angle de contact θ observé entre liquide (phase) et solide (paroi) (**Figure 19**). La tension interfaciale est définie comme la différence de travail (W) appliquée à l'interface en fonction de la quantité de surface (A),

$$\text{soit } \gamma = \frac{\delta W}{\delta A},$$

qui peut se définir également comme la force agissant parallèlement à l'interface par unité de surface (mN.m^{-2}) (Barnes *et al.* 2005). L'angle de contact représente l'angle décrit par un dépôt liquide en contact avec la surface d'un solide. Si cet angle est inférieur à 90° , on observe le phénomène de mouillage et le liquide occupe une large surface sur son support. A l'opposé, quand l'angle est supérieur à 90° , le mouillage du support est défavorable et le liquide cherche à minimiser la surface de contact en formant une goutte. Dans les cas limites, on peut définir un mouillage parfait quand $\theta = 0^\circ$ et l'absence totale de mouillage quand $\theta = 180^\circ$.

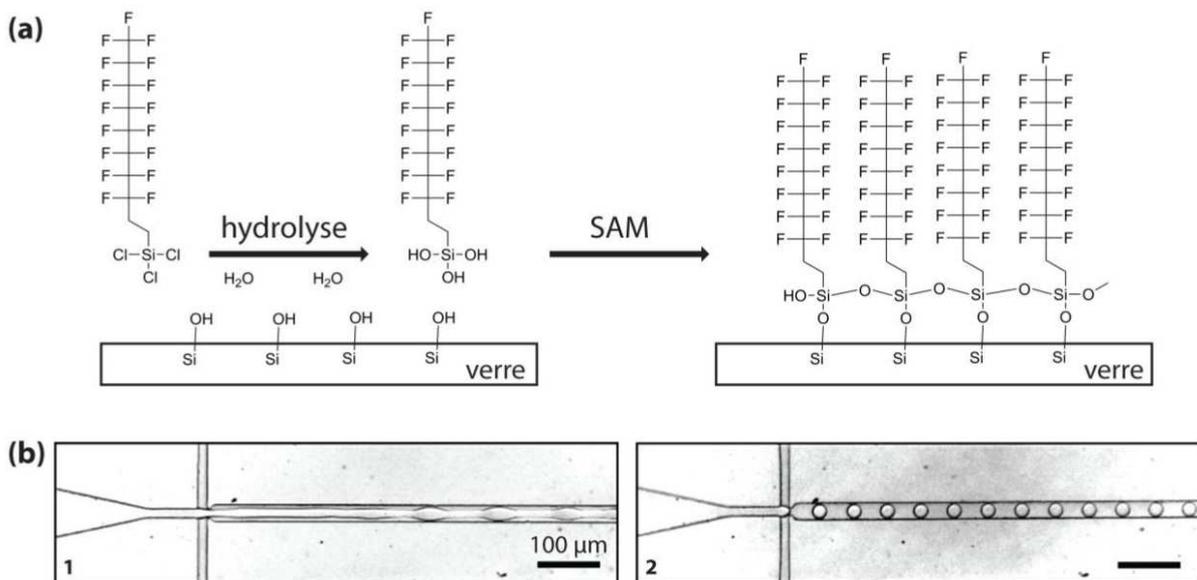


Figure 20 : Effet d'un traitement de surface sur le phénomène de mouillage : (a) traitement d'une surface vitrée à l'aide d'un silane perfluoré (1H, 1H, 2H, 2H-perfluorodecyltrichlorosilane) ; (b) phénomène de mouillage (1) et effet du traitement de surface (2) sur la production de microgouttelettes (Figure issue de Beneyton *et al.* 2011)

Pour une application en microfluidique digitale, il a été démontré qu'en condition de mouillage ($\theta < 120^\circ$), la phase dispersée adhère à la paroi des canaux et il devient impossible de produire une émulsion (Dreyfus *et al.* 2003). Pour réduire les problèmes liés à ce phénomène, les canaux microfluidiques sont généralement traités avec un agent de surface avant leurs utilisations. Les produits les plus couramment utilisés pour ce traitement sont des silanes perfluorés (octadecyltrichlorosilane (OTS), tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl (FTS), etc...). Ces silanes se lient de façon covalente à la surface polaire du support solide par des liaisons Si-O-Si, formant ainsi une monocouche hydrophobe recouvrant l'intégralité de la surface exposée (Sagiv *et al.* 1980, Calhoun *et al.* 2008) (**Figure 20**).

En plus de ces traitements, l'ajout d'un tensioactif dans la phase continue, à une concentration proche de la concentration micellaire critique (CMC, cf. ci-après), contribue également à diminuer ces phénomènes de mouillage (Reiter *et al.* 2000, Tice *et al.* 2003). En réunissant ces conditions, l'angle de contact observé entre une gouttelette de phase dispersée (aqueuse) et la paroi des canaux microfluidiques est proche de 180° , permettant ainsi la parfaite production d'émulsions (Dreyfus *et al.* 2003, Xu *et al.* 2006).

4.2. Tensioactifs et stabilité des microgouttelettes

Les gouttelettes produites en microfluidique digitale sont généralement collectées en sortie de module sous forme d'une émulsion dans laquelle les gouttes sont en contact étroit les unes avec les autres. Durant cette période de promiscuité, ces dernières ont tendance à fusionner (coalescence) pour minimiser les surfaces de contact entre les phases jusqu'à obtenir deux phase bien distinctes. Ce phénomène peut être minimisé par l'ajout d'un tensioactif dans une des phases de l'émulsion.

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles composées d'une partie hydrophile (tête polaire ou ionique) et d'une partie hydrophobe (queue apolaire). Dans un milieu liquide, la structure particulière de ces composés va provoquer leurs diffusions aux interfaces (adsorption) de sorte à présenter leur partie hydrophile au milieu aqueux et leur partie hydrophobe au milieu environnant (solide, gaz ou liquide) (**Figure 21**), et aura pour effet d'abaisser les tensions interfaciales. La variation de cette tension dépend de la concentration de tensioactifs en solution et de la quantité de molécules adsorbées. Elle est définie par la loi de Gibbs :

$$\Gamma = - \frac{c}{RT} \frac{d\gamma}{dc}$$

où Γ correspond à la concentration de tensioactif adsorbé (mol.L^{-1}), c la concentration totale de tensioactif (mol.L^{-1}), γ la tension de surface (mN.m^{-2}), R la constante des gaz parfait et T la température (K).

Au-delà d'une certaine concentration appelée "concentration micellaire critique" (CMC), les tensioactifs saturent aux interfaces et les monomères libres en solution s'agrègent pour former des micelles (auto-assemblage ordonné de molécules amphiphiles renfermant en son centre les parties répulsées par le milieu environnant).

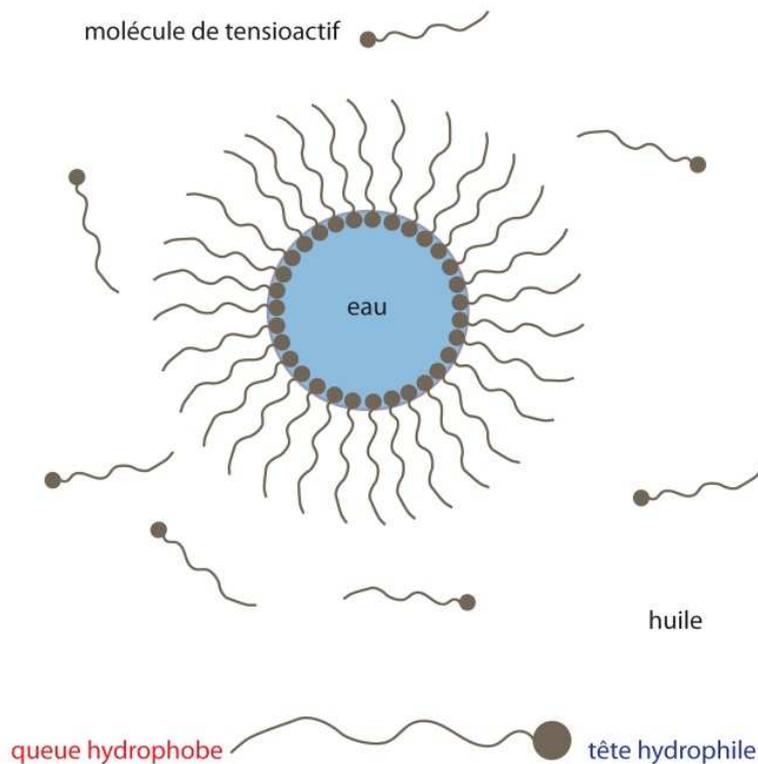


Figure 21 : Organisation des tensioactifs dans une émulsion d'eau-dans-l'huile : Représentation schématique d'un tensioactif et organisation spatiale des tensioactifs dans le cas d'une émulsion d'eau dans l'huile.

4.2.1. Stabilité des émulsions

En microfluidique digitale, les tensioactifs ont donc un rôle prépondérant : d'une part, en réduisant les tensions interfaciales, et d'autre part en limitant les phénomènes de coalescence par l'augmentation des pressions de séparation entre les gouttelettes en interaction (Sjöblow 2006). Une adsorption suffisamment rapide à l'interface entre huile et eau est généralement atteinte pour une CMC proche de $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (Holtze *et al.* 2008), et on observe une diminution rapide de la stabilité des émulsions en-dessous d'une concentration critique en tensioactifs, dépendant principalement des caractéristiques chimiques de ces derniers. A l'inverse, on observe typiquement une stabilité

optimale des émulsions (pour un tensioactif donné), à une concentration en tensioactif supérieure à la CMC. Au-delà de cette concentration, les microgouttelettes produites acquièrent une résistance relative (dépendante de la structure du tensioactif) au phénomène de coalescence et l'ajout de tensioactif supplémentaire dans le milieu n'apporte rien à la stabilité de l'émulsion. Dans ces conditions, la coalescence des microgouttelettes peut être induite par des variations de pression osmotique. En effet, lorsque cette pression augmente au-delà d'une valeur critique, le film de phase continue situé entre les microgouttelettes devient instable et conduit à la coalescence de l'émulsion. En d'autres termes, à une concentration en tensioactifs supérieure à la CMC, la stabilité du système est maximale et elle est contrôlée par la pression osmotique (Bibette *et al.* 1992, Mason *et al.* 1995).

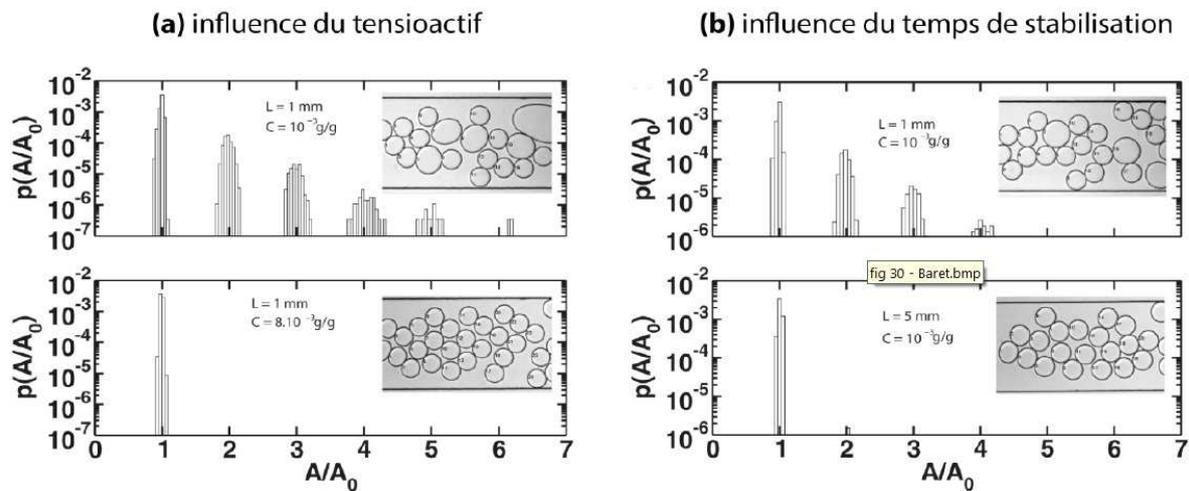


Figure 22 : Etude de l'influence du tensioactif et du temps d'incubation sur la stabilisation des émulsions : (a et b) des microgouttelettes sont produites dans un module microfluidique et incubées dans un canal de longueur L et durant un temps τ avant leurs contacts ; (a) étude comparée de l'influence de la concentration en tensioactif (pour 10^{-3} et 8.10^{-3} g/g) sur la stabilité des microgouttelettes face à la coalescence ; (b) étude de l'influence du temps de stabilisation (pour des longueurs de canaux de 1 et 5mm) sur la stabilité des microgouttelettes face à la coalescence. (Figure modifiée de Baret *et al.* 2009)

Si l'utilisation de tensioactifs est essentielle à la pratique de la microfluidique digitale, cette dernière apparaît, à l'inverse, comme un outil potentiel pour l'étude de ces composés à travers différentes étapes et contraintes imposées à l'émulsion (production, stabilisation, collecte, stockage, etc.). Différents travaux ont ainsi été réalisés, mettant notamment en évidence le rôle prépondérant de la dynamique d'adsorption des tensioactifs à l'interface dans la stabilité des microgouttelettes produites (Baret *et al.* 2009) (**Figure 22**). Ainsi, il a été mis en évidence que la stabilité des microgouttelettes dépend, d'une part, de la concentration en tensioactif solubilisé dans la phase continue et, d'autre part, du délai d'incubation des gouttelettes avant leurs contacts les unes avec les

autres. Ces travaux, basés sur une étude expérimentale, ont permis de décrire la stabilité des microgouttelettes par la relation suivante :

$$LC^2 \approx k$$

où L correspond à la longueur du canal d'incubation (m), C la concentration en tensioactif (mol.L^{-1}) et k le facteur de stabilité.

Le facteur k définit le régime dans lequel l'émulsion produite est stable ou instable. Le temps imparti à la gouttelette produite avant sa collecte permet donc aux tensioactifs de s'organiser à l'interface et de minimiser ainsi les phénomènes de coalescence. D'autres travaux, utilisant ce concept de stabilisation dynamique, ont permis de mettre au point des systèmes de fusion sélective de microgouttelettes dans des modules microfluidiques (Mazutis *et al.* 2009).

4.2.2. Compatibilité des tensioactifs

Les composés encapsulés à l'intérieur des microgouttelettes sont directement exposés aux interfaces entre phase continue et dispersée et, de ce fait, peuvent entrer en interaction avec les tensioactifs. Ces interactions physicochimiques peuvent engendrer des phénomènes indésirables, tels que la perte d'une activité biologique ou la formation de produits secondaires. Certaines études ont démontré que la surface des gouttelettes peut jouer un rôle significatif au cours des réactions biologiques et que la proportion d'interface par rapport au volume de la gouttelette peut engendrer un phénomène d'adsorption de composés biologiques (enzymes) et réduire ainsi leurs activités (Beverung *et al.* 1999, Roach *et al.* 2005, Holtze *et al.* 2008, Liu *et al.* 2009). De plus, une récente étude a démontré l'implication des tensioactifs dans des phénomènes de "fuites" et d'échanges de composés entre microgouttelettes au sein d'une même émulsion (Skhiri *et al.* 2012). Considérant ces interactions, la nature chimique ainsi que la compatibilité des tensioactifs et des huiles employées doivent donc être prise en compte pour des applications biologiques en microfluidique digitale.

Afin de prévenir d'éventuelles réactions indésirables, une série de polymères de surface a été développée ces dernières années (Chapman *et al.* 2000, Satulovsky *et al.* 2000, Huber *et al.* 2003, Lahann *et al.* 2003). Les polymères les plus couramment employés pour limiter l'adsorption de composés biologiques aux interfaces sont les poly(éthylène)glycol (PEG) (Prime *et al.* 1991, Popat *et al.* 2004, Holtze *et al.* 2008). Différents travaux ont démontré que les phénomènes de "répulsion stérique" aux interfaces sont optimisés par l'utilisation de PEG dont le nombre de groupement éther successif est supérieur à six ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ où $n > 6$) (Prime *et al.* 1991, Harder *et al.* 1998). Les tensioactifs composés d'une partie polaire en PEG décrivent une parfaite compatibilité avec les

réactions biologiques (Roach *et al.* 2005, Holtze *et al.* 2008). Cependant, le bon équilibre entre les longueurs des parties hydrophiles et hydrophobes des tensioactifs reste difficile à trouver. Le ratio des poids moléculaires doit être ajusté de telle sorte à minimiser le temps d'adsorption des tensioactifs aux interfaces (de l'ordre de la ms) et de permettre une stabilité optimale de l'émulsion au regard des applications souhaitées (production, collecte, analyse, incubation, réaction biologique, etc.). Différents tensioactifs ont été synthétisés pour l'application en microfluidique digitale, notamment par Holtz *et al.*, avec l'association d'un PEG (partie hydrophile) à deux poly(perfluoropropylène)glycol (PFPE – partie hydrophobe) avec un ratio molaire respectif de 1:10 (Holtz *et al.* 2008). D'autres tensioactifs biocompatibles ont également été élaborés avec des groupements hydrophiles variables tels que des morpholinophosphates (Clausell-Thormos *et al.* 2008), des pyridinium (Vyas *et al.* 2006) ou encore des sucres (Li *et al.* 2008).

4.3. Techniques et applications

Une fois produites dans des canaux microfluidiques, les gouttelettes vont pouvoir être manipulées selon les applications souhaitées. La possibilité de réaliser différentes réactions chimiques ou biologiques au sein de ces microcompartiments, tout en contrôlant leur structure et leur stabilité permet d'envisager un outil de criblage à très haut-débit puissant. De plus, les différentes techniques de manipulation et d'analyse des microgouttelettes développées ces dernières années permettent un grand nombre d'applications (voir Zhu *et al.* 2012, Zhu *et al.* 2013 pour des revues récentes), telles que l'analyse de séquences génomiques (Pekin *et al.* 2011) ou encore l'évolution dirigée de protéines (Beneyton *et al.* 2014).

4.3.1. Les puces microfluidiques

L'expérimentation en microfluidique digitale requiert l'utilisation de modules qui soient rapides et simples à fabriquer, dans des matériaux peu coûteux. Les premières techniques de moulage de matériaux élastomères ont été décrites par Aumiller au milieu des années 70 (Aumiller 1974), et leur intégration dans des applications biologiques a débuté à la fin des années 80 (Masuda *et al.* 1989, Xia *et al.* 1998, Quake *et al.* 2000, Whitesides *et al.* 2001).

De nombreux matériaux (verre, silicone, poly(acrylamide), etc.) sont utilisés pour différentes applications, cependant, les propriétés particulières du poly(diméthylsiloxane) (PDMS) en font le matériau le plus couramment utilisé en microfluidique à ce jour. Les principales raisons de cette utilisation résident dans le coût, assez faible en comparaison d'autres matériaux, tels que le verre

notamment, et la facilité de fabrication. En effet, l'utilisation de PDMS permet de réaliser, simplement, des puces contenant des structures de microcanaux complexes en un temps très court, de l'ordre de quelques heures (Anderson *et al.* 2000, Yun *et al.* 2008). Le PDMS est également un matériau optiquement transparent, permettant le suivi et l'analyse directe des microgouttelettes dans la puce. C'est également un matériau chimiquement inerte et perméable aux gaz, pouvant être combiné à un grand nombre de systèmes, tels que des vannes pneumatiques (Unger *et al.* 2000), des Lasers (Yang *et al.* 2000), des électrodes (Klemic *et al.* 2002), de la fibre optique (Chabinyk *et al.* 2001), des électro-aimants (Siegel *et al.* 2006), des microplaques (Ottesen *et al.* 2006, Maerkl *et al.* 2007) ou encore de la spectrométrie de masse (Chen *et al.* 2008).

Le PDMS comporte néanmoins certaines limites, notamment sa propension à absorber et se déformer au contact de certains solvants organiques (alcanes, aromatiques) (Lee *et al.* 2003). L'usage de ce type de solvants en microfluidique requiert donc l'utilisation d'autres matériaux tels que le verre (Utada *et al.* 2005, Abate *et al.* 2008), le silicone (Yobas *et al.* 2006), les acrylates (Xu *et al.* 2006) ou d'autres (voir les revues de Xia *et al.* 1998, Xia *et al.* 1998).

Les puces réalisées en matière PDMS sont particulièrement bien adaptées à la microfluidique digitale utilisant la production d'émulsion d'eau-dans-l'huile (Thorsen *et al.* 2001), mais leurs propriétés de mouillage nécessitent un traitement de surface adapté pour la production d'émulsion d'huile dans l'eau (Lee *et al.* 2003, Xu *et al.* 2006).

4.3.2. Mélange et diffusion dans les microgouttelettes

Lors de la production de microgouttelettes encapsulant plusieurs liquides miscibles, on observe un phénomène de mélange indépendant du régime laminaire. Les frottements périphériques imposés à la gouttelette lors de son passage à travers le canal microfluidique y induisent un régime turbulent, caractérisé par des mouvements de rotation hémisphériques des liquides (Tice *et al.* 2003) (**Figure 23 a**). Cependant, en pratique, les flux liquidiens circulent conjointement avant leur encapsulation (régime laminaire) et se retrouvent confinés séparément dans chaque hémisphère de la gouttelette, limitant le mélange de ceux-ci aux phénomènes de diffusion (lents) (**Figure 23 b**).

Afin d'obtenir un mélange uniforme et rapide au sein des gouttelettes, plusieurs stratégies ont été mises au point. Une première stratégie consiste à séparer les liquides en amont de leur encapsulation en plusieurs lignes de flux avec, par exemple, l'écoulement d'un premier liquide au centre du second (**Figure 23 c**). La stratégie la plus couramment utilisée consiste à générer une advection chaotique au sein de la gouttelette par l'introduction d'une géométrie en "serpentin" dans le canal efférent du module microfluidique (Song *et al.* 2003, Song *et al.* 2003) (**Figure 23 d**). Dans ce cas, les contraintes appliquées aux gouttelettes font varier leurs vitesses à travers le canal

microfluidique, induisant une circulation asymétrique des flux et un mélange rapide de leurs contenus (de l'ordre de la ms) (Song *et al.* 2003, Liau *et al.* 2005).

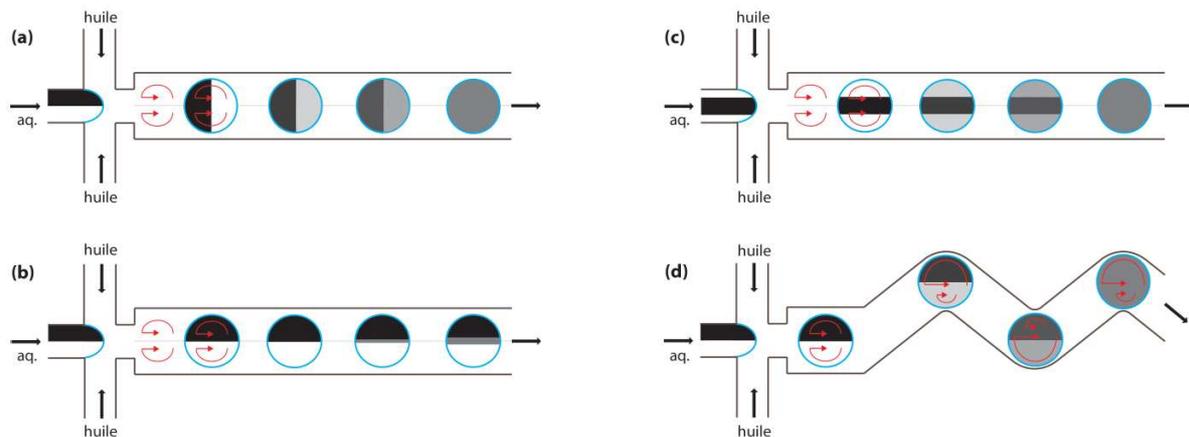


Figure 23 : Modélisation des mécanismes de mélange au sein des microgouttelettes : (a - d) deux phases aqueuses sont encapsulées simultanément grâce à un système de focalisation hydrodynamique ; (a) représentation théorique du mécanisme de mélange dans lequel les liquides sont mélangés par des mouvements de rotations internes ; (b) représentation pratique, les liquides restent confinés dans chaque hémisphère de la microgouttelette et le mélange se fait par diffusion ; (c - d) représentations de méthodes de mélange efficaces.

4.3.3. Division des microgouttelettes

Les gouttelettes produites dans un module microfluidique peuvent être, par la suite, divisées de manière contrôlée afin d'augmenter la fréquence de production. Différents modèles de division ont ainsi été décrits dans la littérature ces dernières années (Link *et al.* 2004, Abate *et al.* 2011), se basant sur des géométries particulières des canaux au passage des gouttelettes, tels que la présence d'obstacles ou de jonctions en T. La division des microgouttelettes dans ces systèmes dépend donc de la géométrie des canaux mais également de la taille des gouttes qui y circulent. Dans le cas d'une division par une jonction en T (**Figure 24**), il existe, pour chaque rapport entre section du canal et taille de gouttelette, une valeur de débit critique à laquelle ces gouttelettes vont systématiquement se diviser en deux gouttelettes "filles" de volume équivalent. Link *et al.* ont démontré que la "rupture" de la gouttelette dépendait uniquement de sa forme dans le canal (Link *et al.* 2004), et ils définissent une valeur d'"extension critique" ε de telle sorte que

$$\varepsilon = \frac{l}{\pi w}$$

où l correspond à la longueur de la microgouttelette, et w à la largeur de la microgouttelette

On observe ainsi que pour des valeurs de $\varepsilon \geq 1$ (la gouttelette est plus longue que large et remplie ainsi totalement la section du canal), il y a rupture systématique de la gouttelette.

Dans certains cas cependant, on observe, en plus de la production de deux gouttelettes filles, la formation de microgouttelettes satellites (Leshansky *et al.* 2009). Ces satellites peuvent potentiellement fusionner avec d'autres gouttelettes et ainsi contaminer le reste de l'émulsion.

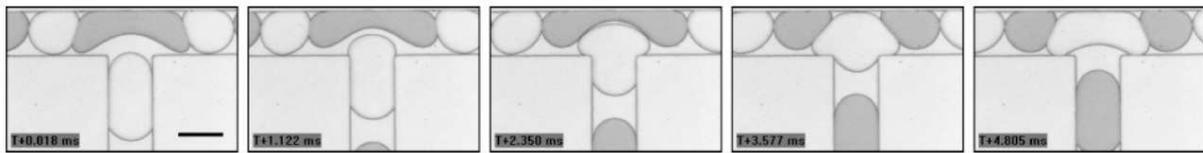


Figure 24 : Exemple de division contrôlée de microgouttelette dans un système de jonction en T : Les microgouttelettes arrivent au niveau de la jonction en T et sont divisées en deux gouttelettes filles sous l'effet de la pression des fluides

(Figure issue de Mazutis *et al.* 2009)

4.3.4. Incubation des microgouttelettes

La plupart des réactions biologiques et chimiques nécessitent un temps d'incubation ou de réaction pouvant aller de plusieurs secondes à plusieurs jours. Afin de réaliser ces expériences en microfluidique digitale, il est donc nécessaire d'incuber les émulsions pendant des temps plus ou moins longs avant de pouvoir les analyser. De plus, le temps et la méthode d'incubation ne doivent pas impacter la stabilité de l'émulsion. Un certain nombre de stratégies ont été décrites ces dernières années afin de permettre ces applications.

On distingue deux méthodes d'incubation dépendant du temps nécessaire à la réaction : une méthode d'incubation sur puce, où l'émulsion est conservée dans le module microfluidique tout au long de la réaction avant l'analyse, et une méthode d'incubation hors puce, où l'émulsion est collectée et stockée pendant la durée de la réaction avant d'être réinjectée pour l'analyse.

Pour des temps d'incubation courts (de la ms à la s), des modules comportant un canal efférent de longueur variable (ligne de délai) peuvent être utilisés (Song *et al.* 2003) (**Figure 25 a**). Cependant, ce type de module n'est pas utilisable pour des temps d'incubation plus longs. Si l'on considère l'équation suivante :

$$t = l \cdot \frac{S}{Q}$$

où t correspond au temps de rétention dans le module (s), l la longueur du canal (m),

S la section du canal (m^2) et Q le débit global ($L \cdot h^{-1}$)

on constate que pour un temps de rétention de 60 s, avec une section de canal standard de 100 μm^2 et un débit de 200 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, la longueur du canal devrait être supérieure à 3 m. Au-delà de cette problématique, la pression appliquée à l'intérieur du canal est proportionnelle à sa longueur et inversement proportionnelle à sa section :

$$P = c\eta \frac{l}{S^3} Q$$

où P correspond à la pression interne (Pa), η la viscosité ($\text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$), l la longueur du canal (m), S la section du canal (m^2), Q le débit global ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) et c une constante dépendante de la section du canal (sans dimension)

Dans ces conditions, la pression observée dans des canaux longs et étroits peut facilement dépasser les conditions limites d'utilisation de puce en matière PDMS (les liaisons PDMS-verre supportent des pressions maximales de 450 kPa (Bhattacharya *et al.* 2005)). Cette pression diminue de façon importante en augmentant la largeur et/ou la profondeur des canaux. Cependant, quand la section des canaux devient nettement supérieure au diamètre des gouttelettes produites, on observe un écoulement hétérogène de l'émulsion dû à la dispersion de Taylor-Aris (les gouttelettes circulant au centre du canal s'écoulent plus rapidement que celles proches des parois) (Frenz *et al.* 2009). L'ajout de zones de constriction dans le canal permet de limiter ce phénomène en redistribuant aléatoirement la disposition des gouttelettes au sein du canal (Frenz *et al.* 2009) (**Figure 25 b**). Ces systèmes permettent d'obtenir des temps d'incubation sur puce allant de 1 minute à 1 heure.

Pour des temps d'incubation supérieurs à 1 heure, il est nécessaire d'immobiliser l'émulsion au sein de la puce dans des réservoirs (Courtois *et al.* 2008, Koster *et al.* 2008) ou par des systèmes de rétention des gouttelettes, dans lesquelles ces dernières sont immobilisées individuellement dans des micro-chambres (Tan *et al.* 2007, Shi *et al.* 2008, Huebner *et al.* 2009, Schmitz *et al.* 2009) (**Figure 25 c)–e**). Si ce type de module est particulièrement intéressant pour l'analyse cinétique des réactions induites, il est néanmoins limité par le nombre de microgouttelettes potentiellement immobilisées (< 1000). De plus, à des temps d'incubation importants, on observe une diffusion de la phase aqueuse à travers le PDMS ou la phase continue, entraînant la diminution du volume des gouttelettes (Courtois *et al.* 2008, Huebner *et al.* 2009). Différentes solutions contribuent à limiter ce phénomène, notamment l'utilisation d'une huile perfluorée en phase continue (Schmitz *et al.* 2009) ou l'immersion des modules microfluidiques dans un bain d'eau pendant l'incubation (Taly *et al.* non publié).

Enfin, la méthode d'incubation hors puce permet l'analyse d'un nombre très important de gouttelettes ($>> 10^6$). Dans ce type de système, l'émulsion est produite et collectée dans un réservoir externe pour l'incubation avant d'être réintroduite sur puce pour analyse. Durant le temps

d'incubation et les différentes manipulations, l'intégrité de l'émulsion doit être assurée par l'ajout d'un tensioactif dans la phase continue.

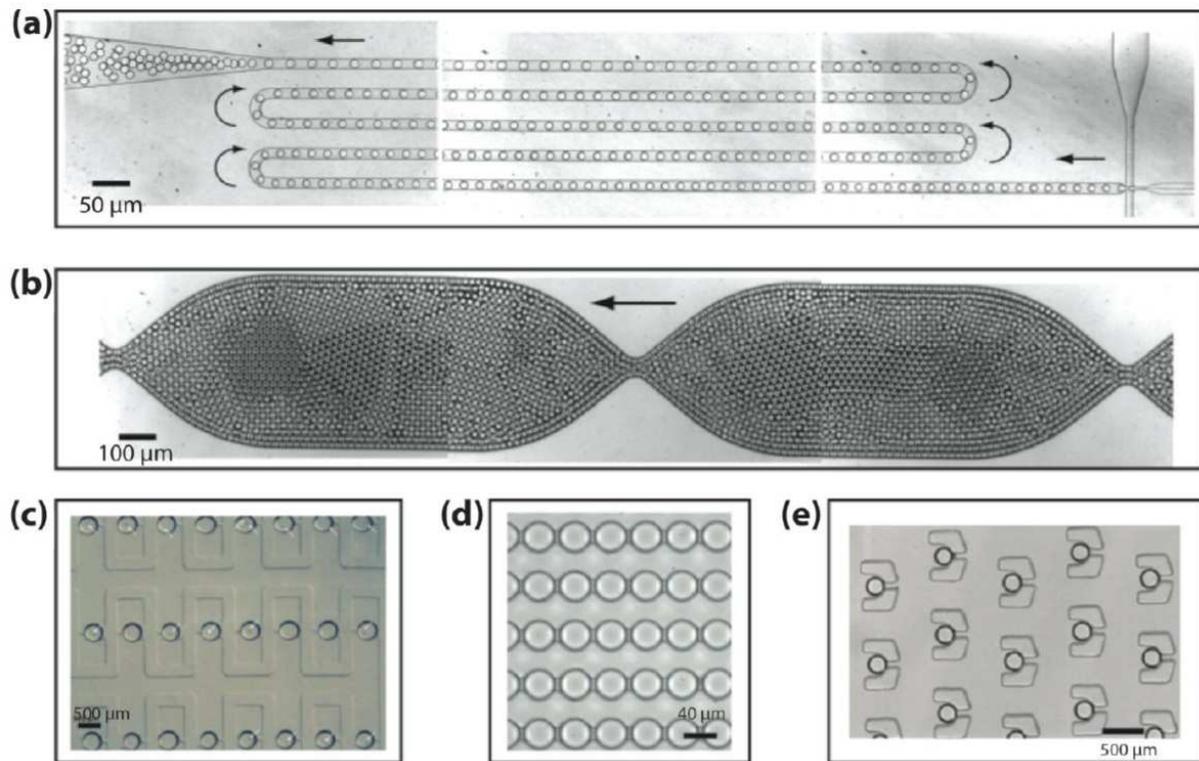


Figure 25 : Exemple de systèmes d'incubation d'émulsions sur puce : (a) incubation utilisant une ligne de délai rectiligne (Mazutis *et al.* 2009) ; (b) incubation utilisant une ligne de délai contenant des zones de constriction (Frenz *et al.* 2009) ; (c – e) incubations utilisant des systèmes d'immobilisation des microgouttelettes (Shi *et al.* 2008, Schmitz *et al.* 2009, Huebner *et al.* 2009)

4.3.5. Fusion des microgouttelettes et picoinjection

Dans le cas de réactions chimiques ou biologiques, l'addition de réactifs complémentaires en cours d'expérience est souvent nécessaire. Cet ajout de réactifs au sein de gouttelettes déjà formées, et dont la stabilité est volontairement accrue par la présence de tensioactifs dans l'émulsion, peut apparaître comme une limite en microfluidique digitale. Cependant, différents systèmes ont été mis au point pour contourner cette difficulté, par la fusion contrôlée de microgouttelettes (Bremond *et al.* 2008, Mazutis *et al.* 2009) ou l'ajout de phase aqueuse directement au sein des gouttelettes (Abate *et al.* 2010).

La fusion contrôlée de microgouttelettes en microfluidique digitale relève une contradiction entre la volonté de conserver l'intégrité de l'émulsion contre les phénomènes de coalescence et celle de déstabiliser les gouttelettes pour permettre leur fusion. La coalescence de gouttelettes à l'intérieur

de canaux microfluidiques a été largement démontrée en l'absence de tensioactifs stabilisants (Song *et al.* 2003, Hung *et al.* 2006, Tan *et al.* 2007, Niu *et al.* 2008, Um *et al.* 2009). Cependant, la fusion contrôlée de microgouttelettes non-stabilisées requiert une parfaite synchronisation et conduit souvent à la formation d'un nombre important de coalescences indésirables qui rendent notamment impossible la collecte de ces émulsions. Ainsi, la fusion spontanée de microgouttelettes stabilisées par l'ajout de tensioactifs s'avère indispensable à la réalisation de réactions nécessitant une période d'incubation. Différentes techniques conduisant à la fusion de microgouttelettes stabilisées ont été développées ces dernières années.

Une première méthode consiste à déstabiliser les gouttelettes en chauffant de façon localisée les microgouttelettes au sein du module microfluidique à l'aide d'un laser (Baroud *et al.* 2007) (**Figure 26 c**). Cette technique souffre néanmoins de certaines limitations puisque l'exposition au laser peut nuire à l'intégrité du matériel biologique (dégradation de l'ADN, de protéines, etc.) et la fréquence de fusion est limitée (10-100 Hz). Une autre méthode consiste à réaliser une fusion passive (sans énergie extérieure) provoquée par la décompression des gouttelettes au passage de zones de constriction introduites dans le canal microfluidique (Bremond *et al.* 2008) (**Figure 26 b**). Une seconde stratégie passive consiste à fusionner, à haut débit, une microgouttelette stabilisée et une seconde partiellement instable (concentration en tensioactif faible) en synchronisant leur passage à travers un canal microfluidique (Mazutis *et al.* 2009) (**Figure 26 a**). Si par leur simplicité, ces méthodes de coalescence peuvent facilement être intégrées au sein d'un module microfluidique, leur manque de reproductibilité pour des applications chimiques ou biologiques, du essentiellement à l'influence importante du contenu des microgouttelettes de même que la difficulté de synchroniser les microgouttelettes entre-elles, limitent considérablement leurs utilisations.

L'apport d'une source extérieure d'énergie pour déstabiliser ponctuellement les microgouttelettes apparaît donc comme inévitable. Pour cela, des méthodes de fusion active ont été développées, dans lesquelles les microgouttelettes sont déstabilisées à l'aide d'un champ électrique induit (**Figure 26 d**). Dans ce type d'expérience, les microgouttelettes produites sont synchronisées à l'aide d'un module microfluidique spécifique et déstabilisées pendant leur contact par un champ électrique alternatif (Ahn *et al.* 2006, Priest *et al.* 2006, Niu *et al.* 2009). Cependant, la fusion pourra se produire uniquement si la conductivité des gouttelettes est nettement supérieure à celle de la phase continue (Lion *et al.* 2006) et si ces dernières sont suffisamment proches l'une de l'autre au moment de leur passage à travers le champ électrique (Chabert *et al.* 2005, Thiam *et al.* 2009). L'exposition au champ électrique va induire une polarisation des microgouttelettes, créant ainsi une force d'attraction entre elles. Cette force, proportionnelle au carré du champ électrique, va provoquer la rupture du film de phase continue présent au moment de leur contact et induire la coalescence. Dans ce cas, la fusion est indépendante du contenu de l'émulsion, mais nécessite la fabrication de puces incorporant des

microélectrodes et l'addition de matériel supplémentaire à la plateforme microfluidique (générateur, amplificateur). Une des principales limites de cette technique est la difficulté à synchroniser les microgouttelettes par paire lors de leurs passages à travers le champ électrique (Zagnoni *et al.* 2009, Niu *et al.* 2009, Wang *et al.* 2009). En effet, la fréquence de réinjection n'étant pas constante tout au long de l'expérience, la synchronisation de deux émulsions réinjectées parallèlement peut être difficile à mettre en œuvre et ainsi résulter en la collecte d'un mélange de gouttelettes fusionnées et non fusionnées.

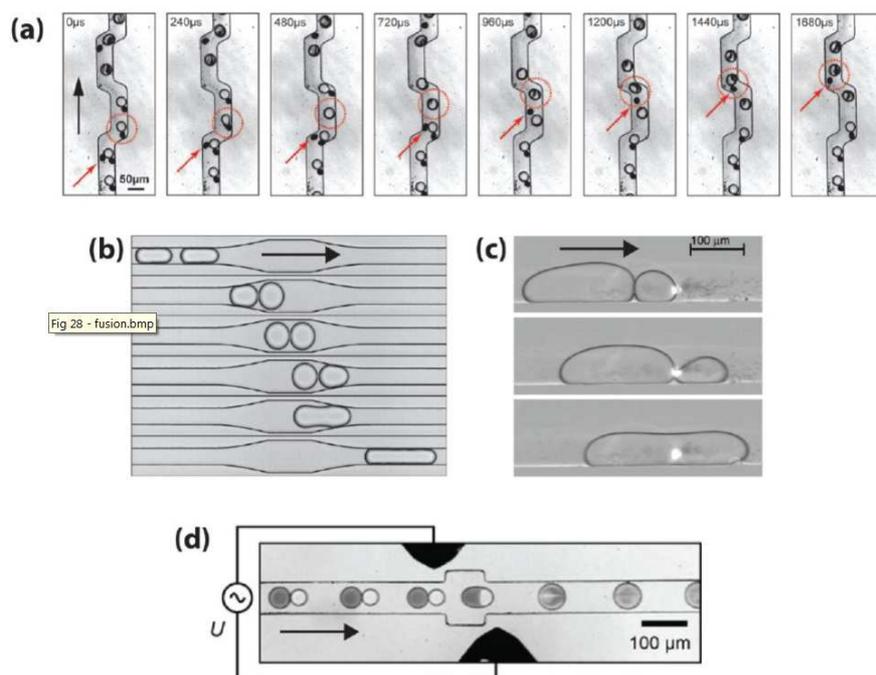


Figure 26 : Exemples de systèmes de fusion de microgouttelettes : (a) - (b) méthodes de fusions passives (Mazutis *et al.* 2009, Bremond *et al.* 2008) ; (c) méthode de fusion par déstabilisation de l'émulsion à l'aide d'un laser (Baroud *et al.* 2007) ; (d) méthode de fusion par déstabilisation de l'émulsion grâce à un champ électrique (Frenz *et al.* 2008).

Une récente technique baptisée "pico-injection" permet d'injecter directement un volume de phase aqueuse contrôlé au sein des microgouttelettes (**Figure 27**). L'injection de liquide se produit grâce à une géométrie particulière des canaux microfluidiques et sous l'effet d'un champ électrique interne (Abate *et al.* 2010, O'Donovan *et al.* 2012) avec une fréquence bien supérieure aux techniques de fusions décrites précédemment (10 kHz contre 1-2 kHz). Dans ce système, l'émulsion est réinjectée dans un module de pico-injection, où les microgouttelettes vont traverser un canal contenant une micro-embouchure correspondant à une jonction en T. En amont de cette embouchure, les microgouttelettes vont être déstabilisées par le passage à travers un champ électrique (microélectrodes) et une solution (phase aqueuse) va être injectée dans ces gouttelettes sous l'effet

d'une pression au niveau de la jonction en T. Le volume injecté est dépendant de la pression induite sur la solution additionnelle ainsi que sur la vitesse de passage des gouttelettes.

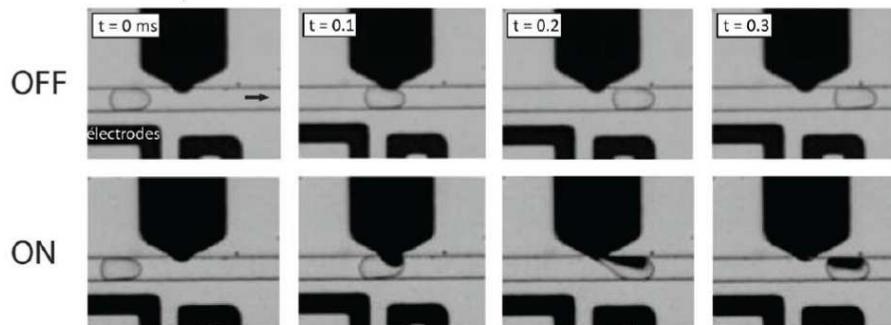


Figure 27 : Méthode de picoinjection : observation en microscopie optique et au cours du temps d'un mécanisme contrôlé de picoinjection. En l'absence d'une impulsion électrique (OFF), la gouttelette traverse le canal sans interférer avec le canal de picoinjection. L'action conjointe d'une impulsion électrique et d'une pression appliquée dans le canal de picoinjection (ON) induit l'absorption d'une quantité de liquide au par la microgouttelette au moment de son passage (Figure issue de Beneyton *et al.* 2011)

4.3.6. Analyse et tri des microgouttelettes

La microfluidique digitale, tout comme la plupart des méthodes spectroscopiques, se base sur l'utilisation d'un microscope optique combiné à une source de lumière (laser) et un détecteur optique (PMT) afin d'observer un éventuel signal de fluorescence au sein des gouttelettes. L'utilisation de matériaux transparents que sont le PDMS et le verre, ainsi que les dimensions et l'épaisseur relativement faibles des puces sont parfaitement adaptées à des systèmes de détection complexes comprenant plusieurs sources lumineuses (Psaltis *et al.* 2006). La très haute fréquence de production de microgouttelettes impose la collecte d'une quantité importante d'informations en un minimum de temps. La majorité des études rapportées en microfluidique digitale utilise un équipement comportant une caméra rapide permettant d'enregistrer plus de 10^6 images par seconde. Ce type de caméra est indispensable pour l'observation des microgouttelettes à l'intérieur des puces microfluidiques.

La détection de fluorescence au sein de microgouttelettes peut être réalisée à l'aide d'une caméra comportant un récepteur à transfert de charge (CCD) mais la méthode la plus communément rencontrée combine l'utilisation de lasers à des détecteurs optiques hautement sensibles (Lichtman *et al.* 2005). L'utilisation de lasers permet d'obtenir une excitation intense et ciblée à une longueur d'onde bien spécifique. Les dispositifs de détection optique les plus couramment utilisés en

microfluidique sont les tubes photomultiplicateurs (PMT) et les détecteurs photodiodes à avalanche (APD). Ces deux dispositifs présentent une sensibilité importante pour la détection de photons et sont particulièrement bien adaptés pour des applications nécessitant un faible bruit de fond et une très haute sensibilité de détection. Les signaux obtenus sont généralement analysés grâce à une carte d'acquisition combinée à un logiciel de collecte de données (eg. Labview). L'identification de ces signaux permet l'analyse des microgouttelettes par fluorescence, aussi bien en terme de dimensions (mesure de la largeurs des gouttelettes, déduite de la mesure du temps de passage de la gouttelette à travers la source lumineuse) qu'en terme d'intensités.

Les composés fluorescents utilisés en microfluidique digitale sont nombreux. On peut notamment citer l'utilisation de molécules fluorescente organiques (Song *et al.* 2003, Pekin *et al.* 2011), de protéines fluorescentes (Dittrich *et al.* 2005) ou encore de microbilles fluorescentes (Kumaresan *et al.* 2008). L'utilisation de boîtes quantiques ("Quantum Dots") (Xiang *et al.* 2012) est également possible pour des applications particulières. La sonde idéale, fluorescente ou non, doit être de petite taille, interférer au minimum avec les réactions biologiques, et produire un signal intense et spécifique (Litchman *et al.* 2005, Walter *et al.* 2008).

La microfluidique digitale est particulièrement adaptée pour l'étude cinétique de réaction biologique. Une des premières études de ce type a été réalisée sur l'activité de la ribonucléase A (Song *et al.* 2003). L'utilisation d'une caméra CCD a permis une étude cinétique en analysant, à différents points de mesure, la fluorescence contenue dans les microgouttelettes. Cette méthode nécessite cependant une procédure d'analyse longue et complexe et se trouve limitée par une exposition non-uniforme de l'émulsion par la source lumineuse. Pour pallier à ces difficultés, les stations microfluidiques actuelles sont généralement équipées de dispositifs optiques et d'outils informatiques permettant une lecture directe et précise du signal. Un exemple de ce type de plateforme intègre l'utilisation d'un microscope confocal à l'outil microfluidique (Srisa-Art *et al.* 2007, Srisa-Art *et al.* 2008). Ce type de dispositifs permet d'obtenir une très haute sensibilité et possède un temps de réponse extrêmement court, permettant une étude cinétique de réaction de l'ordre de la milliseconde.

Certaines réactions chimiques ou biologiques peuvent nécessiter d'isoler les microgouttelettes "positives" du reste de l'émulsion. Des méthodes de tri sélectif intégrées aux modules microfluidiques ont été élaborées afin de collecter préférentiellement les gouttelettes contenant le produit de réaction souhaité. Cette technique, reposant sur l'utilisation de la force diaélectrophorétique (DEP), consiste à dévier les microgouttelettes de leurs trajectoires par l'application d'un champ électrique. Les microgouttelettes sont alors polarisées et attirées par le pôle positif du champ électrique (**Figure 28**). Ce phénomène nécessite cependant que la permittivité diélectrique de la phase dispersée soit bien supérieure à celle de la phase continue, ce qui se vérifie dans le cas d'une émulsion d'eau ($\epsilon \approx 80$) dans une huile perfluorée ($\epsilon \approx 2$). Le premier exemple de tri

sélectif en microfluidique digitale a été développé par le groupe du Prof. Weitz (Ahn *et al.* 2006). Dans ce système, les puces microfluidiques sont réalisées à l'aide d'une lame de verre traitée en surface par de l'oxyde d'indium-étain (lame ITO) permettant la conductivité du matériau. Le module intègre une électrode interne à l'embouchure d'un double canal de sortie permettant d'imposer un champ électrique (700V, 10kHz) au passage des gouttelettes. En l'absence de champs électriques, les microgouttelettes s'engouffrent dans le canal dont la résistance hydrodynamique est la plus faible. A l'inverse, l'application d'un champ électrique va dévier la trajectoire de l'émulsion dans un canal de collecte. La possibilité d'imposer des pulses électriques au niveau des électrodes permet de trier l'émulsion à une fréquence de 1.6 kHz (Ahn *et al.* 2006).

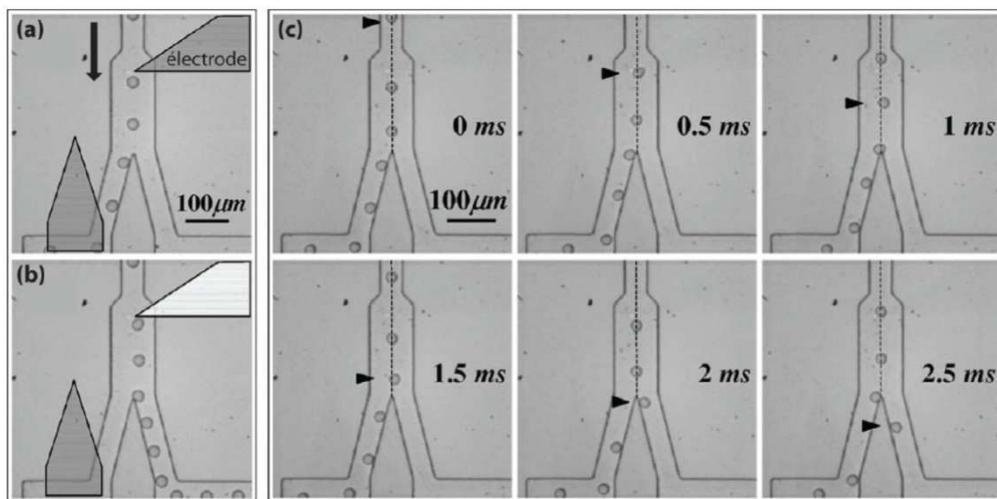


Figure 28 : Méthode de tri de microgouttelettes sur puce: (a) en l'absence de champ magnétique, les gouttelettes suivent la canal possédant la résistance hydrodynamique la plus faible (gauche) ; (b) sous l'influence de pulse électrique, les gouttelettes sont déviées et redirigées vers les canal de droite (Figure issue de Ahn *et al.* 2006)

4.4. Applications biologiques en microfluidique digitale

Le confinement de réactions chimiques ou biologiques dans des microgouttelettes de faibles volumes (pL), offre de nombreuses perspectives dans l'analyse et le criblage à très haut-débit. En contrôlant la concentration en réactifs et le débit des flux, il est possible, grâce à la microfluidique digitale, de produire une émulsion en maîtrisant parfaitement le volume et le contenu des microgouttelettes (Baret *et al.* 2009).

Un grand nombre d'expériences rapporté dans la littérature indique que le volume optimal des microgouttelettes applicable au criblage à très haut débit se situe entre le picolitre et la dizaine de picolitre (≈ 0.5 à 65 pL), correspondant à des tailles de gouttelettes de 10 à 50 micromètres de

diamètre (Chabert *et al.* 2008, Kiss *et al.* 2008, Srisa-Art *et al.* 2008). Si la diminution du volume des gouttelettes pourrait permettre une fréquence d'analyse encore plus grande, il devient cependant difficile de produire et de manipuler ces émulsions (Chiu *et al.* 2009).

Les exemples de réactions chimiques ou biologiques en microfluidique digitale sont aujourd'hui nombreux (Song *et al.* 2006, Huebner *et al.* 2008, Teh *et al.* 2008), cependant nous nous limiterons à quelques exemples d'intérêt sur lesquels reposent la base de ce travail de thèse.

4.4.1. Amplification de l'ADN en microgouttelettes

La possibilité d'amplifier l'information génétique en utilisant la réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été une véritable révolution dans le domaine de la génomique et d'un grand nombre d'autres disciplines biologiques. Depuis la fin des années 80, l'apport de la PCR dans les techniques de séquençage s'est avéré être un outil indispensable pour l'étude des gènes, et a permis de déchiffrer le génome complet de nombreux organismes, incluant celui de l'Homme. Cependant, l'utilisation de cette technique pour la conception d'une banque d'ADN ou d'un mélange complexe de gènes est souvent limitée par plusieurs facteurs. En effet, on constate d'une part que les fragments d'ADN les plus courts sont généralement amplifiés de façon préférentielle par rapport aux fragments les plus longs, et d'autre part, on peut observer la formation de fragments erronés due à une recombinaison entre séquences d'ADN analogues. La compartimentation de chaque fragment d'ADN dans un espace isolé peut donc permettre de limiter considérablement ces biais (Williams *et al.* 2006). La PCR en émulsion (ePCR) trouve aujourd'hui de nombreuses applications, et plus particulièrement dans la détection de mutations rares (Dressman *et al.* 2003, Diehl *et al.* 2005, Li *et al.* 2006, Pekin *et al.* 2011) ou de séquences spécifiques d'ARN (Pipper *et al.* 2007, Eastburn *et al.* 2013).

Afin de respecter la loi de Poisson sur la distribution de microparticules lors de l'encapsulation, il est nécessaire de travailler à des concentrations faibles pour obtenir une émulsion ne contenant, au maximum, qu'une molécule d'ADN par gouttelette. Dans ces conditions, le nombre de microgouttelettes occupées est nettement inférieur au nombre de de microgouttelettes vides et le seuil de détection est fortement conditionné par le nombre de séquence d'ADN analysée. La microfluidique digitale a pour avantage de produire des émulsions parfaitement monodisperses en taille, permettant une comparaison entre microcompartiments pertinente, à des fréquences pouvant aller jusqu'à 10 kHz, permettant l'analyse d'un grand nombre de compartiments en un minimum de temps.

Les premières expériences d'amplification de fragments d'ADN ont été réalisées en utilisant un système de capillaires pour la production de gouttelettes avec des volumes de l'ordre du millilitre (Dorfman *et al.* 2005, Chabert *et al.* 2006). La taille importante de ces émulsions limite cependant les

fréquences de production et d'analyse et rend ce système peu efficace. La production ultérieure de gouttelettes de volumes inférieurs, contenant des microparticules paramagnétiques, a conduit à des résultats probants pour l'analyse d'échantillons biologiques, mais une fois encore, la limite de cette méthode réside dans le faible débit d'analyse (Pipper *et al.* 2007). Les meilleures fréquences d'analyse ont été atteintes avec la production de microgouttelettes de plus faible volume (pL), mais des problèmes de stabilité de l'émulsion durant le thermocyclage apparaissent et limitent encore une fois les possibilités d'analyse (Beer *et al.* 2007, Beer *et al.* 2008). Si l'amplification de long fragment d'ADN (>500 bp) en gouttelettes reste encore difficile à réaliser, l'utilisation de nouvelles huiles et l'optimisation des tensioactifs utilisés en microfluidique digitale ont permis récemment d'augmenter considérablement la résistance des émulsions au thermocyclage (Kiss *et al.* 2008, Schaerli *et al.* 2009). Une de ces études démontre la possibilité d'amplifier et d'analyser quantitativement un fragment d'ADN de 245 paires de bases par ePCR dans des microgouttelettes de 65pL de volume. Le nombre de microgouttelettes positives observé (dans lesquelles la réaction d'amplification génique a eu lieu) à différentes concentration d'ADN de départ, a été mis en comparaison avec une distribution statistique théorique (la loi de Poisson). Les résultats obtenus démontrent la pertinence de cette méthode pour l'analyse d'échantillons biologiques.

4.4.2. Détection de mutations spécifiques sur l'ADN par dPCR en microgouttelettes

Plus récemment, une méthode de détection de d'ADN génomique muté, ciblée sur l'oncogène KRAS, a été élaborée (Pekin *et al.* 2011). Cette technique combine la microfluidique digitale pour la compartimentation d'un échantillon d'ADNg provenant de lignés cellulaires cancéreuses et l'utilisation de deux sondes TaqMan® distinctes afin de discriminer les séquences du gène muté par rapport au gène sauvage. La très haute sensibilité de cette méthode permet d'observer une séquence mutée sur un excès de $2 \cdot 10^5$ séquences sauvages, ouvrant ainsi la possibilité d'user de cette méthode comme potentiel outil diagnostique (Pinheiro *et al.* 2012). Cet exemple sera rediscuté dans la partie expérimentale (**Chapitre 3**).

Objectif du travail de thèse

Les différents travaux réalisés pendant cette thèse avait pour objectif de développer de nouveaux outils de détection de biomarqueurs spécifiques par des méthodes non-invasives en utilisant la technologie de microfluidique en gouttelettes.

Les travaux réalisés précédemment au sein du laboratoire, notamment sur la détection de mutations spécifiques du gène *KRAS* dans le cas de l'étude de cancers colorectaux (Pekin *et al.* 2011), ont permis d'établir une preuve de principe sur l'efficacité de la réaction de dPCR en microgouttelettes pour la détection de séquences spécifiques rares dans un échantillon biologique.

Cependant, si cette méthode offre des perspectives intéressantes, elle souffrait néanmoins de certaines limitations induites :

- (i) par le nombre important de manipulations des microgouttelettes produites. Ces dernières sont, dans un premier temps, produites dans un module microfluidique et collectées hors puce pour être thermocyclées avant d'être réinjectées dans un second module microfluidique pour analyse. Ces différentes manipulations peuvent affecter considérablement l'intégrité de l'émulsion et ainsi induire des biais dans les résultats lors de l'analyse. De plus, la collecte hors puce de ces émulsions peut également entraîner d'éventuelles contaminations de l'échantillon.
- (ii) par l'utilisation de sondes TaqMan® dont l'efficacité peut varier de façon non-négligeable entre différents lots utilisés, limitant ainsi la reproductibilité des analyses. Ces sondes peuvent également être limitées par une faible spécificité en fonction de la séquence ciblée. Enfin, ce type de sondes souffre d'un signal de fluorescence basal non-négligeable pouvant limiter leurs sensibilités pour l'étude de séquences rares dans des échantillons biologiques.
- (iii) par l'utilisation d'un tensioactif non-commercialisé (au début de ces travaux de thèse), fournit gracieusement par l'entreprise Raindance Technologie, et dont la production, de même que la pérennité de la collaboration, n'étaient pas assurés à l'époque.
- (iv) enfin, par la limitation d'application de cette méthode aux seules mutations présentes sur l'ADN comme biomarqueur diagnostic.

Dans ce contexte, notre projet avait pour objet d'étude trois axes principaux :

- (i) le développement de nouveaux tensioactifs fluorés alternatifs applicables à la microfluidique digitale et permettant, notamment, la réalisation de réactions de dPCR en gouttelettes tout en conservant l'intégrité des émulsions thermocyclées (**Chapitre 1**).
- (ii) le développement de nouvelles sondes alternatives à l'utilisation de sondes TaqMan® commerciales, avec pour objectif d'augmenter la sensibilité de même que la spécificité des sondes tout en augmentant le rapport signal sur bruit de fluorescence (**Chapitre 2**).
- (iii) le développement d'une stratégie de détection efficace et reproductible de biomarqueurs spécifiques (plus particulièrement de microARN) par l'utilisation d'une plateforme microfluidique commerciale (Raindrop®, Raindance Technologie) (**Chapitre 3**).

Enfin, une étude parallèle a été réalisée pour le développement de nouveaux modules microfluidiques pour la réalisation de réactions de PCR intégralement sur puce, à travers différentes stratégies d'incubations statiques et mobiles (Annexes).

Chapitre 1 : Développement et validation d'une nouvelle gamme de tensioactif pour l'application en microfluidique digitale

Scientifiques impliqués dans ce travail : Deniz Pekin, Youssr Skhiri et Estelle Mayot

1. Introduction

Comme mentionné précédemment, les tensioactifs jouent un rôle prépondérant dans la majorité des applications en microfluidique digitale. En effet, la grande variété d'applications décrites impose fréquemment d'importantes contraintes aux émulsions, notamment en pression lors de confinements des émulsions dans de module en ligne de délai (Song *et al.* 2003, Frenz *et al.* 2009), en température lors de réaction de PCR en émulsion (Pekin *et al.* 2011), ou encore par des temps de stockage importants lors d'incubation de cellules en microgouttelettes (Beneyton *et al.* 2014), pouvant conduire à l'observation de phénomènes de coalescence. De par leur structure polaire, les tensioactifs sont adsorbés aux interfaces et interviennent dans la stabilité des émulsions, en abaissant les tensions de surface et en minimisant les phénomènes de coalescence (Holtze *et al.* 2008, Baret *et al.* 2012). Si la stabilité des gouttelettes est un facteur primordial dans lequel les tensioactifs sont directement impliqués, d'autres contraintes s'imposent. Ainsi, les matériaux utilisés pour la micro-fabrication de puce microfluidique (e.g. PDMS) ne doivent pas être affectés par la nature du tensioactif employé. De plus, le bon déroulement de réactions biologiques de même que la viabilité de cellules encapsulées en émulsion nécessitent une parfaite biocompatibilité du système. En effet, toute interaction produite aux interfaces impliquant d'éventuels composés encapsulés peuvent nuire au bon déroulement des applications souhaitées. De même, la compartimentation stricte de réactions chimiques ou biologique implique de limiter au maximum les phénomènes d'échange de composés entre microgouttelettes afin d'éviter d'éventuelles contaminations entre gouttelettes.

Une des premières solutions apportée pour limiter ces phénomènes a été de remplacer les conventionnelles huiles silicones ou hydrocarbonées par l'utilisation d'huiles perfluorées pour la production des émulsions. Ces huiles sont parfaitement inertes et ont pour avantages d'être à la fois hydrophobes et lipophobes, minimisant ainsi la solubilité de composés organiques. De plus, leur bonne solubilité pour les gaz (Lowe *et al.* 1998) est un point important pour des applications nécessitant l'incubation de cellules (Clausell-Tormos *et al.* 2008).

Si ces huiles perfluorées offrent de nombreux avantages, elles imposent l'utilisation de tensioactifs fluorés pour leurs utilisations en microfluidique digitale. Cependant, les tensioactifs partiellement

fluorés, commerciaux ou décrits dans la littérature, sont encore peu nombreux et n'offrent pas une stabilité et une biocompatibilité adaptées à nos applications (à l'exception du tensioactif EA[®] développée par l'entreprise RainDance Technologies, mais non commercialisé et disponible uniquement pour une utilisation dans le cadre des applications développées par cette compagnie). On trouve ainsi de courtes chaînes perfluorées (Riess *et al.* 2000, Krafft 2001), fonctionnalisées à leur extrémité par un groupement hydroxy (e.g. perfluoro-octanol, perfluoro-décaneol) ou un acide carboxylique (e.g. acide perfluoro-tétradécanoïque), ou des polymères perfluorés fonctionnalisés (Krytox[®] produit par Dupont) (Clausell-Tormos *et al.* 2008).

La molécule de Krytox[®] a fait l'objet de plusieurs études pour la production d'émulsions d'eau dans des huiles perfluorées (Holtze *et al.* 2008, Clausell-Tormos *et al.* 2008). Il s'agit d'un perfluoropolyéther (PFPE - partie hydrophobe) fonctionnalisé par un acide carboxylique (partie hydrophile) en bout de chaîne (**Figure 29**). Si ce tensioactif présente un réel intérêt pour la stabilité des émulsions, sa partie acide, sous forme ionique en solution, peut interagir avec des biomolécules encapsulées (ADN, ARN, protéines) et provoque dans la plupart des cas la perte de leur activité biologique (Roach *et al.* 2005). L'addition de composés hydrophiles inertes, tels des polyéthylènes glycol, sur la molécule de Krytox[®], a permis d'obtenir des composés stabilisants et biocompatibles (Holtze *et al.* 2008) et a donné lieu à la production du tensioactif non-commercialisé EA[®] (RainDance Technologies) (**Figure 29**).

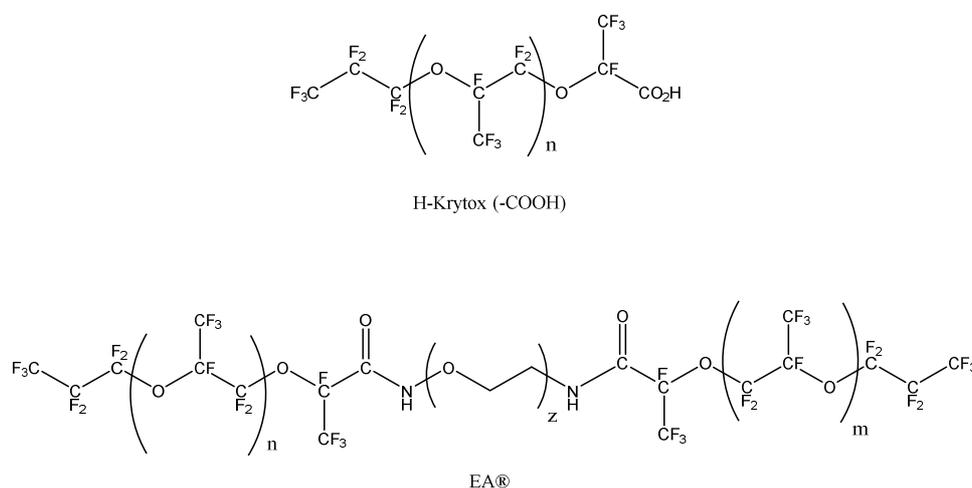


Figure 29 : Structure des molécules de Krytox[®] et de tensioactif EA[®]

En se basant sur cet exemple, nous avons entrepris d'élaborer une nouvelle gamme de tensioactifs perfluorés polymériques utilisant le Krytox[®] associé à un ou plusieurs groupements polyéthylène glycol (PEG) hydrophiles. Nos composés sont ensuite fait l'objet d'une étude afin d'évaluer leur intérêt dans des applications microfluidiques selon trois critères primordiaux : (i) la stabilisation des émulsions, notamment en présence de contraintes de pressions ou de températures importantes ;

(ii) la compatibilité avec les composés et réactions biologiques ; (iii) la minimisation des fuites de composés entre les gouttelettes au sein de l'émulsion.

2. Matériels et méthodes

(Partie retirée)

Chapitre 2 : Développement et étude de nouvelles sondes fluorogéniques

Scientifiques impliqués dans ce travail : Hinesh Patel et Sylvain Ladame

Ces travaux ont été réalisés, en partie, au sein du laboratoire du Dr Sylvain Ladame (Impérial Collège, Londres, UK)

1. Introduction

L'objectif initial de ce travail était de développer une méthode alternative à l'utilisation de sondes TaqMan® pour la détection de séquences oligonucléotidiques spécifiques (ADN ou ARN). En effet, si ces sondes sont largement utilisées à ce jour, notamment en diagnostic moléculaire, elles souffrent néanmoins de certaines limitations. Ces limitations incluent notamment la nécessité d'amplifier la séquence ciblée d'ADN par une réaction de PCR, afin d'observer un signal de fluorescence. De plus, la détection de séquences spécifiques d'ARN impose une étape de transcription inverse, préliminaire à la réaction de PCR, entraînant un temps d'analyse et un coût relativement élevé. Enfin, la désactivation du fluorophore au sein de la sonde est imparfaite, ce qui engendre un signal basal de fluorescence non négligeable.

Afin de pallier à ces limitations, nos travaux se sont orientés vers l'utilisation de sondes utilisant une réaction fluorogénique induite par hybridation nucléotidique. Notre stratégie a donc consisté en la synthèse de deux systèmes de sondes complémentaires d'une séquence ciblée, présentant un substrat fluorogénique associé à une séquence spécifique d'acide nucléo-peptidique (PNA, acronyme de l'anglais "peptide nucleic acid").

Les PNA sont des analogues structuraux des acides nucléiques, dans lesquels le squelette ribose-phosphate a été remplacé par une chaîne pseudo-peptidique sur laquelle sont fixées les différentes bases puriques et pyrimidiques par des liaisons amides. Contrairement aux acides nucléiques, ces composés sont dépourvus de charges, limitant ainsi les phénomènes de répulsion lors de la formation de duplexes avec l'ADN ou l'ARN. Ces caractéristiques permettent une meilleure spécificité d'appariement ainsi qu'une meilleure stabilité des doubles-brins formés par hybridation avec une séquence complémentaire d'acides nucléiques (ARN ou ADN). De plus les PNA présentent l'avantage d'une grande stabilité chimique *in vitro* mais aussi *in vivo* en raison d'une résistance importante aux protéases et aux nucléases (Ray *et al.* 2000).

Les systèmes de sondes synthétisées utilisent respectivement : (i) une détection par réaction fluorogénique, dans laquelle deux précurseurs non fluorescents de cyanine ont été chacun couplés à un PNA. L'hybridation des sondes sur la séquence ciblée entraîne une réaction d'aldolisation-

élimination conduisant à la formation d'une cyanine Cy3 et à l'émission d'un signal de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 540\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570\text{nm}$) (**Figure 45**) ; et (ii) une détection par restauration d'un signal de fluorescence, dans laquelle une coumarine 334 est réactivée par une réaction d'addition de Michael pour émettre un signal de fluorescence caractéristique ($\lambda_{\text{ex}} = 480\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520\text{nm}$) (**Figure 47**).

Ces sondes ont d'abord été testées pour leur efficacité dans différentes conditions de concentrations et de températures en solution avant d'être intégrée à la microfluidique digitale. Les séquences ciblées ont été : (i) les microARN (miARN) miR-17* et miR-92 dont la surexpression a été observée dans le cas de cancer colorectal (Humphreys *et al.*, 2013) ; (ii) le miARN miR-132 dont la surexpression a été observée dans des cas de polyarthrite rhumatoïde (Chatzikyriakidou *et al.* 2012) ; et (iii) un allèle mutant du gène codant pour le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR, mutation p.T790M).

2. Matériels et méthodes

2.1. Réactifs

L'éthyl-2-(3,3-diméthyl-2-méthylèneindol-1-yl) acétate, le 2-((E)-2-(formylméthylène)-3,3-diméthylindolin-1-yl) acétate, le 2,3,6,7-Tetrahydro-8-hydroxy-1H,5H-benzo[ij]quinolizine-9-carboxaldéhyde, le acétoacétate d'éthyl, l'acide 3-formylbenzoïque, le NaOH, l'acide chlorhydrique, la pipéridine, la 2,6-lutidine, le DIPEA, le TFA, le TIPS, HATU, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane, l'acétonitrile, le diéthyle éther, le N-méthyl-2-pyrrolidone, le chloroforme-D, le DMSO-D6 ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les bases PNA (A, C, G, T) acido-aminés ont été achetées chez ASM Research Chemicals. L'huile HFE-7500 a été achetée chez 3M. Les différents oligonucléotides (ADN et ARN) synthétiques ont été achetés chez Eurofins Genomics.

2.2. Synthèse de l'acide 2-(3,3-diméthyl-2-méthylèneindolin-1-yl) acétique

A une solution d'éthyl-2-(3,3-diméthyl-2-méthylèneindol-1-yl) acétate (1,30 g ; 5,30 mmol) dans l'éthanol (40 mL) est ajoutée une solution de NaOH 1N (30 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 12 h à 25°C avant l'évaporation des solvants sous pression réduite. Le produit de la réaction est solubilisé dans une quantité minimum d'eau (15 mL) et acidifié par l'ajout d'une solution de HCl 1N jusqu'à pH = 3 puis concentré et filtré sur Büchner. Cette étape est répétée au minimum deux fois. Le filtrat est ensuite concentré et le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:2 ; $R_f = 0,20$) pour obtenir le produit final (860 mg, 75%) (**Figure 41**). ^1H NMR

(400MHz, DMSO) δ : 7,15 (dd ; J = 7,3 ; 0,7 Hz ; 1H) ; 7,06 (td ; J = 7,7 ; 1,2 Hz ; 1H) ; 6,73 (t ; J = 7,2 Hz ; 1H) ; 6,65 (d ; J = 7,9Hz, 1H) ; 4,26 (s ; 2H) ; 3,85 (d ; J = 2,0 Hz ; 1H) ; 3,81 (d ; J = 2,0 Hz ; 1H) ; 1,28 (s ; 6H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 170,1 ; 160,8 ; 145,5 ; 136,7 ; 127,3 ; 121,7 ; 118,6 ; 105,6 ; 74,4 ; 43,6 ; 43,5 ; 29,7 (x2) ppm. HRMS (ESI) m/z : calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 218,116 ; trouvé 218,119.

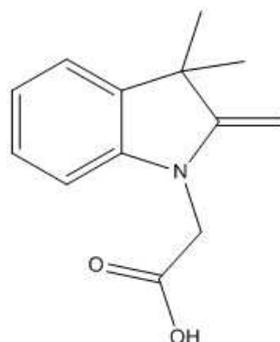


Figure 41 : Structure de l'acide 2-(3,3-diméthyl-2-méthylèneindolin-1-yl) acétique.

2.3. Synthèse de l'acide 2-((E)-2-(formylméthylène)-3,3-diméthylindolin-1-yl) acétique

A une solution de 2-((E)-2-(formylméthylène)-3,3-diméthylindolin-1-yl) acétate (2,80 g ; 10,20 mmol) dans l'éthanol (60 mL) est ajoutée une solution de NaOH (4%, 30 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 12 h à 25°C avant l'évaporation des solvants sous pression réduite. Le produit de la réaction est solubilisé dans une quantité minimum d'eau (25 mL) et acidifié par l'ajout d'une solution de HCl 1N jusqu'à pH = 3 puis concentré et solubilisé dans l'éthanol. La suspension est filtrée et cette étape est répétée au minimum deux fois. Le filtrat est ensuite concentré et le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:2 ; $R_f = 0,15$) pour obtenir le produit final (2 g, 80%) (**Figure 42**). ^1H NMR (400MHz, DMSO) δ : 9,85 (d ; J = 8,9 Hz ; 1H) ; 7,38 (d ; J = 7,3 Hz ; 1H) ; 7,20 (t ; J = 7,6 Hz ; 1H) ; 6,99 (t ; J = 7,5Hz ; 1H) ; 6,92 (d ; J = 7,8 Hz ; 1H) ; 5,18 (d ; J = 8,9 Hz ; 1H) ; 4,21 (s, 2H) ; 1,59 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (100MHz, DMSO) δ : 185,4 ; 172,9 ; 170,5 ; 143,7 ; 139,1 ; 127,7 ; 121,8 ; 121,7 ; 108,7 ; 98,5 ; 47,0 ; 46,2 ; 29,0 (x2) ppm. HRMS (ESI) m/z : calculé pour $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 246,112 ; trouvé 246,111.

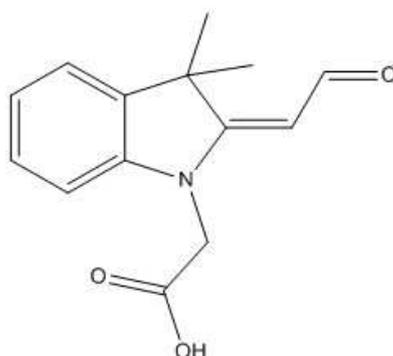


Figure 42 : Structure de l'acide 2-((E)-2-(formylméthylène)-3,3-diméthylindolin-1-yl) acétique.

2.4. Synthèse de la Coumarine 334

Une solution de 2,3,6,7-Tetrahydro-8-hydroxy-1H,5H-benzo[*ij*]quinolizine-9-carboxaldéhyde (1g ; 4,6 mmol, 1 éq.) et d'acétoacétate d'éthyle (1,2 g ; 9,2 mmol, 2 éq.) dans de l'éthanol est traitée avec de la pipéridine (0,37 mL). Le milieu réactionnel est agité à reflux pendant 3 h avant d'être refroidi à 4°C et filtré. Le produit solide est lavé avec de l'éthanol froid (4°C) et filtré avant d'être séché pour obtenir le produit final (**Figure 43**). ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 8,34 (s, 1H) ; 6,96 (s, 1H) ; 3,35 (q ; J = 6,14 Hz ; 4H) ; 2,87 (t ; J = 6,39 Hz ; 2H) ; 2,75 (t ; J = 6,39 Hz ; 2H) ; 2,67 (s, 3H) ; 1,97 (m, 4H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 196,2 ; 161,4 ; 153,8 ; 148,9 ; 148,0 ; 127,9 ; 119,7 ; 114,8 ; 108,1 ; 105,6 ; 50,4 ; 50,0 ; 30,8 ; 27,5 ; 21,2 ; 20,2 ; 20,1 ppm.

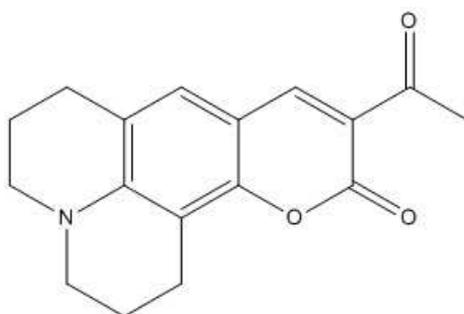


Figure 43 : Structure de la Coumarine 334.

2.5. Synthèse de la Coumarine 334 "désactivée"

Une solution de Coumarine 334 (500 mg ; 1,77 mmol) et d'acide 3-formylbenzoïque (320 mg ; 2.13 mmol) dans de l'éthanol est traitée avec de la pipéridine (1 éq). Le milieu réactionnel est agité à reflux pendant 12 h avant d'être refroidi et filtré. Le produit solide est lavé à l'éther, filtré puis purifié sur colonne CLHP semi-préparative-C18 10 x 250 mm (gradient linéaire de 30 min de 0 à 100% d'ACN dans l'eau avec 0,1% de TFA) pour obtenir le produit final (**Figure 44**). ^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ :

8,43 (s, 1H) ; 8,22 (s, 1H) ; 8,02 (d ; J = 15,75 Hz ; 1H) ; 7,94 (d ; J = 7,61 Hz ; 1H) ; 7,70-7,63 (m, 2H) ; 7,39 (t ; J = 7,75 Hz ; 1H) ; 7,24 (s, 1H) ; 3,37-3,30 (m, 4H) ; 2,79-2,66 (m, 4H) ; 1,92-1,81 (m, 4H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 185,4 ; 168,8 ; 160,3 ; 153,2 ; 148,9 ; 148,2 ; 141,9 ; 134,3 ; 131,1 ; 130,1 ; 128,5 ; 128,4 ; 128,3 ; 128,0 ; 125,1 ; 119,6 ; 114,0 ; 107,8 ; 104,7 ; 49,8 ; 49,2 ; 26,8 ; 20,5 ; 19,6 ; 19,5.

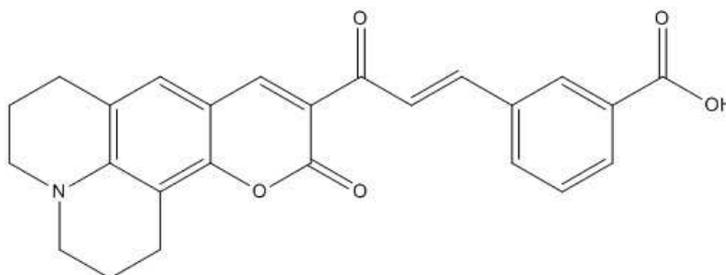


Figure 44 : Structure de la Coumarine 334 "désactivée".

2.6. Synthèse des sondes PNA

2.6.1. Synthèse peptidique sur support solide : méthode générale

Cette méthode permet la synthèse de peptides artificiels par un couplage linéaire successif de monomères acido-aminés sur un support solide (généralement une résine fonctionnalisée). Chaque monomère présente une fonction N-terminale protégée par un groupement Fmoc (9-fluorométhoxycarbonyl) et une fonction C-terminale libre. La synthèse consiste en une succession de déprotections des fonctions N-terminales et de couplages par formation de liaisons amides. La structure des monomères synthétiques étant extrêmement variée, cette technique permet la synthèse d'un nombre important de composés différents (e.g. PNA). De manière générale, la synthèse peptidique sur support solide se décompose de la manière suivante :

- (i) **Préparation de la résine** : une résine (Rink Amide MBHA), fonctionnalisée par un groupement amine protégé par un groupement Fmoc, est déposée sur une colonne d'extraction en phase solide (SPE). Après l'ajout de dichlorométhane (DCM), la colonne est placée sous agitation mécanique pendant 20 min. Cette étape permet à la résine de "gonfler", augmentant ainsi l'exposition de ses groupements réactifs. La résine est ensuite rincée avec du N-méthyl-2pyrrolidone (NMP) avant le début de la synthèse.
- (ii) **Déprotection de la fonction amine** : avant chaque couplage, il est indispensable d'effectuer une déprotection de la fonction N-terminale du polymère en formation. Dans cette étape, une solution de pipéridine 20% dans du NMP est ajoutée à la colonne et

agitée pendant 20 min. La résine est ensuite filtrée puis lavée avec du DCM (3x) et du NMP (3x). Cette étape est répétée une fois et aboutit à la déprotection du groupement Fmoc sur l'amine terminale.

- (iii) Activation du monomère et couplage :** le monomère de PNA protégé est activé par agitation dans un tube (1,5 mL, Eppendorf) en présence d'un agent de couplage peptidique (HATU) et d'un mélange de bases (2,6-lutidine + DIPEA) en solution dans du NMP, avant d'être ajouté à la colonne contenant la résine. Le mélange est agité pendant 30 min, filtré puis lavé avec du DCM (3x) et du NMP (3x). Cette étape est répétée une fois et aboutit à l'addition d'un nouveau monomère sur la résine.
- (iv) "Capping" des groupements amines libres :** à la fin de chaque étape de couplage, une solution d'anhydride acétique et de 2,6-lutidine dans du NMP est ajoutée à la colonne. Le mélange est agité pendant 15 min, filtré puis lavé avec du DCM (3x) et du NMP (3x). Cette étape permet d'acétyler les groupements amines libres (n'ayant pas réagi dans l'étape précédente) et de limiter ainsi la formation de sous-produits indésirables. Les étapes (ii) à (iv) sont ensuite répétées jusqu'à formation du PNA souhaité.
- (v) Clivage de la résine :** à la fin de la formation du PNA souhaité, ce dernier est clivé de son support (résine) par l'ajout d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA), de triisopropylsilane (TIPS) et d'eau (rapport v/v = 95 : 2,5 : 2,5) dans la colonne. Le mélange est agité pendant 60 min, puis le produit est récupéré par filtration, concentré sous pression réduite et précipité par l'ajout de diéthyle éther. La solution est ensuite centrifugée et le surnageant est retiré pour obtenir le brut réactionnel.
- (vi) Purification :** le produit brut est solubilisé dans de l'eau milliQ avant d'être analysé et purifié sur colonne semi-préparative par chromatographie liquide haute-performance (HPLC) avec un gradient d'éluant eau/acétonitrile contenant 0,1% de TFA. Le produit est ensuite caractérisé par spectrométrie de masse (MALDI) puis lyophilisé et stocké à -80°C.

2.6.2. Synthèse des sondes PNA-Cy3

Deux PNA 7-mer sont synthétisés sur une résine (Rink Amide MBHA) en utilisant la synthèse peptidique supportée en série Fmoc. Chaque PNA contient deux monomères ϵ -N,N-diméthyl-lysine afin d'assurer une bonne solubilité de ces composés dans une solution aqueuse à pH physiologique.

Ces PNA sont fonctionnalisés respectivement à leur partie N- et C-terminale par l'acide 2-((E)-2-(formylméthylène)-3,3-diméthylindolin-1-yl) acétique (**Ald**) et par l'acide 2-(3,3-diméthyl-2-méthylèneindolin-1-yl) acétique (**Ind**).

Le couplage du groupement **Ind** sur le PNA est réalisé grâce à l'insertion d'un monomère N-Fmoc-[2-(N-Alloc)aminoéthyl]-glycine en partie C-terminale. Dans ce cas, le PNA est traité, en fin de synthèse et avant le clivage de la résine, par un complexe de Palladium [Pd(PPh₃)₄] en présence de diméthylamine-borane et en condition anhydre afin de déprotéger sélectivement le groupement N-allyloxycarbonyl (N-Alloc). Le groupement **Ind** est ensuite couplé au PNA par la méthode de couplage décrite ci-dessus (**2.6.1 (iii)**). Après synthèse, les PNA fonctionnalisés sont clivés de leur support par l'ajout d'une solution de TFA/TIPS/H₂O (95 : 2,5 : 2,5), purifiés par HPLC et caractérisés par spectroscopie de masse (MALDI-TOF). : PNA-Ind₁₇ m/z : [M + H]⁺ calculé pour C₁₁₁H₁₅₀N₅₂O₂₄⁺ 2596,7 ; trouvé 2596,2. PNA-Ald₁₇ m/z : [M + H]⁺ calculé pour C₁₀₄H₁₄₁N₄₃O₂₆⁺ 2409,5 ; trouvé 2409,1. PNA-Ind₉₂ m/z : [M + H]⁺ calculé pour C₁₁₀H₁₄₉N₅₃O₂₅⁺ 2613,8 ; trouvé 2614,5. PNA-Ald₉₂ m/z : [M + H]⁺ calculé pour C₁₀₆H₁₄₀N₅₀O₂₃⁺ 2482,6 ; trouvé 2483,5.

2.6.3. Synthèse des sondes PNA-Coumarine-Thiol

Un premier PNA est synthétisé sur une résine (Rink Amide MBHA) en utilisant la synthèse peptidique supportée en série Fmoc et contient deux monomères ε-N,N-diméthyl-lysine à sa partie C-terminale et un groupement Coumarine 334 "désactivée" (**Coum**) à sa partie N-terminale. Un second PNA est synthétisé sur une résine 4-aminobutanethiol-4-méthoxytrityl en utilisant également la synthèse peptidique supportée en série Fmoc et contient deux monomères ε-N,N-diméthyl-lysine à sa partie N-terminale. Après synthèse, les PNA sont clivés de leur support par l'ajout d'une solution de TFA/TIPS/H₂O (95 : 2,5 : 2,5), libérant, pour le second, une fonction butane-thiol libre (**Thiol**), puis purifiés par HPLC et caractérisés par spectroscopie de masse (MALDI-TOF) : PNA-Coum₁₃₂ m/z : [M + H]⁺ calculé pour C₁₁₆H₁₄₆N₄₈O₂₆⁺ 2628,8 ; trouvé 2630,9. PNA-Thiol₁₃₂ m/z : [M + H]⁺ calculé pour C₉₅H₁₃₅N₄₇O₂₁S⁺ 2303,5 ; trouvé 2306,4. PNA-Coum_{T790M} m/z : [M + H]⁺ calculé pour C₁₁₁H₁₃₈N₄₆O₂₇⁺ 2548,62 ; trouvé 2549,0. PNA-Thiol_{T790M} m/z : [M + H]⁺ calculé pour C₉₂H₁₂₈N₄₆O₂₃S⁺ 2278,4 ; trouvé 2278,0.

2.7. Procédure expérimentale pour l'étude des sondes PNA-Cy3

Pour cette étude, des solutions mères de miR-17* et miR-92 synthétiques (100 μM), sont préparées dans de l'eau "DNase- et RNase-free". Des solutions mères de PNA-**Ind**₁₇ et PNA-**Ind**₉₂ (1 mM) ainsi que de PNA-**Ald**₁₇ et PNA-**Ald**₉₂ (1 mM) sont préparées dans de l'eau "DNase- et RNase-free". Les

expériences sont systématiquement réalisées dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 7,4), pour un volume final de 200 μ L. Pour chaque expérience, la solution est chauffée à 95°C pendant 45 min avant d'être refroidie à 4°C puis transférée dans une cellule en quartz (200 μ L) et analysée dans un spectrofluorimètre (Jobin Yvon Fluorolog 3.22, Horiba) à température ambiante. L'étude de la fluorescence dans le milieu a été réalisée aux longueurs d'onde d'excitation λ_{ex} = 540 nm et d'émission λ_{em} = 573 nm. Les conditions décrites ont été déterminées et optimisées de façon expérimentale. Les données obtenues sont ensuite analysées en utilisant un logiciel de traitement de données (Excel, Microsoft).

2.8. Procédure expérimentale pour l'étude des sondes PNA-Coum-Thiol

Pour cette étude, des solutions mères de *miR-132*, de *EGFR-T790M* et de *EGFR-WT* synthétiques (100 μ M), sont préparées dans de l'eau "DNase- et RNase-free". Des solutions mères de PNA-Coum₁₃₂ et PNA-Coum_{T790M} (1 mM) ainsi que de PNA-Thiol₁₃₂ et PNA-Thiol_{T790M} (1 mM) sont préparées dans de l'eau "DNase- et RNase-free". Les expériences sont systématiquement réalisées dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 7,4).

Pour l'étude des sondes PNA-Coum-Thiol₁₃₂, une étude cinétique est réalisée en microplaque 384 puits (volume final 100 μ L) dans un lecteur de plaque (SpectroMax M5, Molecular Devices) à température ambiante sur une durée de 60 min (point de mesure toutes les 2 secondes).

Pour l'étude des sondes PNA-Coum-Thiol_{T790M}, une étude cinétique est réalisée en microplaque 384 puits (volume final 25 μ L) dans un lecteur de microplaque (Enspire® Multimode Plate Reader, Perkin Elmer) à 37°C sur une durée de 180 min (point de mesure toutes les minutes).

L'étude de la fluorescence dans le milieu a été réalisée aux longueurs d'onde d'excitation λ_{ex} = 480 nm et d'émission λ_{em} = 520 nm. Les conditions décrites ont été déterminées et optimisées de façon expérimentale. Les données obtenues sont ensuite analysées en utilisant un logiciel de traitement de données (Excel, Microsoft).

2.9. Production et réinjection de microémulsions

Les microémulsions ont été produites dans une puce microfluidique contenant deux modules de production simultanée utilisant la focalisation hydrodynamique (**Figure 51**). La phase continue est composée d'une huile perfluorée (HFE-7500) dans laquelle est solubilisé un tensioactif en concentration variable. Les phases dispersées sont constituées d'un milieu aqueux contenant les sondes PNA en présence ou en l'absence d'une séquence nucléotidique ciblée à des concentrations

variables. Chaque phase est introduite dans le module à travers un tubing en PTFE ($\varnothing = 0,56$ mm) connecté à une seringue plastique (1mL, Omnifix-F, BBRAUN) à l'aide de pousse-seringues (PHD 22/2000, Harvard Apparatus). Les débits d'injection en production sont de $400 \mu\text{L.h}^{-1}$ pour la phase continue et de $100 \mu\text{L.h}^{-1}$ pour chaque phase dispersée. La section des canaux au niveau de la focalisation hydrodynamique ($l = 15 \mu\text{m}$, $z = 25 \mu\text{m}$) associée aux débits des fluides aboutit à la production de microgouttelettes d'environ $15 \mu\text{L}$ de volume ($\varnothing \approx 30 \mu\text{m}$). Les débits des fluides en réinjection sont de $150 \mu\text{L.h}^{-1}$ pour la phase continue et de $75 \mu\text{L.h}^{-1}$ pour l'injection de l'émulsion.

3. Résultats et discussion

Pour ces travaux, deux systèmes de sondes différents ont été synthétisés, correspondant à deux stratégies utilisant des sondes fluorogéniques : (i) un premier utilisant des sondes PNA fonctionnalisées par des précurseurs non-fluorescents de Cyanine (PNA-Cy3), dessinées pour la détection des séquences miR-17 et miR-92 ; (ii) un second utilisant des sondes PNA fonctionnalisées par une Coumarine "désactivée" et un activateur (groupement thiol), dessinées pour la détection des séquences miR-132 ainsi qu'un allèle muté du gène codant pour l'EGFR (p.T790M).

<i>Séquences des PNA, ARN et ADN</i>	
Noms	Séquences
PNA-Ald¹⁷	C ^{term} -Lys(NMe ₂)-Lys(NMe ₂)- CGTCACT -Ald-N ^{term}
PNA-Ind¹⁷	C ^{term} -Ind- CGTCACT -Lys(NMe ₂)-Lys(NMe ₂)-N ^{term}
PNA-Ald⁹²	C ^{term} -Lys(NMe ₂)-Lys(NMe ₂)- ACGTGAA -Ald-N ^{term}
PNA-Ind⁹²	C ^{term} -Ind- GGCCGGA -Lys(NMe ₂)-Lys(NMe ₂)-N ^{term}
PNA-Coum¹³²	C ^{term} -Lys(NMe ₂)-Lys(NMe ₂)- GTACCGA -Coum-N ^{term}
PNA-Thiol¹³²	C ^{term} -SH- CTGACAA -Lys(NMe ₂)-Lys(NMe ₂)-N ^{term}
PNA-Coum^{T790}	C ^{term} -Lys(NMe ₂)-Lys(NMe ₂)- CACGTCG -Coum-N ^{term}
PNA-Thiol^{T790}	C ^{term} -SH- AGTACGT -Lys(NMe ₂)-Lys(NMe ₂)-N ^{term}
miR-17	5'- ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG -3'
miR-92	5'- UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU -3'
miR-132	5'- ACCAUGGCCUGUAGACUGUUA -3'
miR-13 (ADN)	5'- ACCATGGCTGTAGACTGTTA -3'
miR-132 HP1	5'- ACTATGGCTGTAGACTGTTA -3'
miR-132 HP2	5'- ACCATAGCTGTAGACTGTTA -3'
miR-132 HP3	5'- ACCATGGCCGTAGACTGTTA -3'
miR-132 HP7	5'- ACCATGGCAGTAGACTGTTA -3'
miR-132 HP9	5'- ACCATTGCTGTAGACTGTTA -3'
EGFR-T790	5'-... CCGTGCAGCTCATCATGCAGC ...-3'
EGFR-WT	5'-... CCGTGCAGCTCATCATGCAGC ...-3'

Tableau 7 : Séquences des différents PNA synthétisés, et ARN et ADN synthétiques.

Chaque sonde comporte 7 bases complémentaires de la séquence ciblée et chaque système respecte un espacement de 3 bases nucléotidiques entre les sondes lors de leur hybridation sur la cible. Les différentes séquences de PNA, ARN et ADN sont données dans le **Tableau 7**.

3.1. Etude des sondes PNA-Cy3

Pour cette étude, inspirée des travaux de Ladame *et al.* (Meguellati *et al.* 2010), deux couples de sondes ont été synthétisés, ciblant les séquences des miARN miR-17 et miR-92. Chaque couple est composé de deux sondes PNA fonctionnalisées par des précurseurs non-fluorescents d'une molécule de Cyanine (Cy3) à leurs extrémités N-terminales (**Ald**) et C-terminales (**Ind**). La reconnaissance de la séquence cible va provoquer le rapprochement des deux précurseurs de telle sorte à former le fluorophore par une réaction d'aldolisation-élimination (**Figure 45**). La formation du produit est suivie par l'observation de la fluorescence dans le milieu ($\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 573 \text{ nm}$). Les sondes ont été testées pour leur sensibilité et leur spécificité vis-à-vis de séquences ciblées.

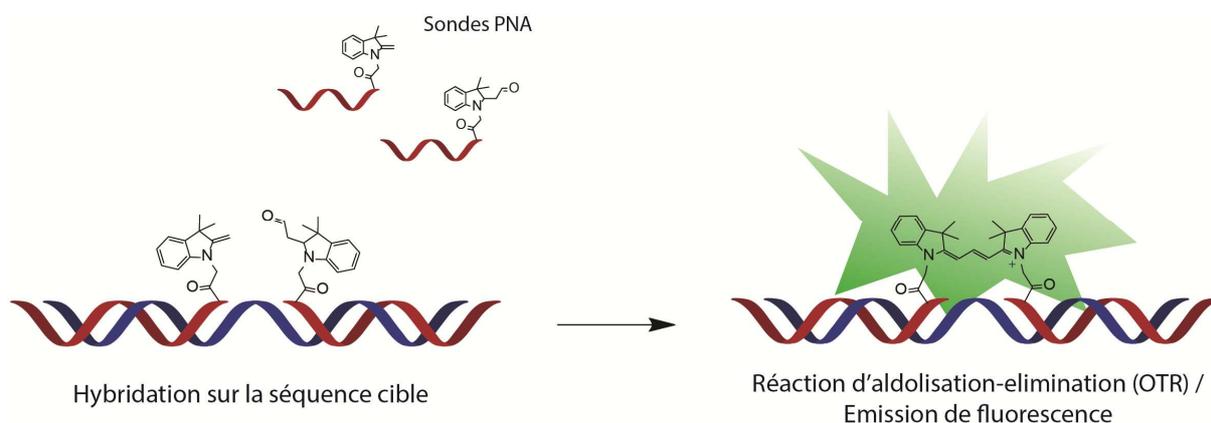


Figure 45 : Formation du fluorophore Cy3 par réaction assistée par hybridation nucléotidique (OTR) : l'hybridation des deux sondes PNA fonctionnalisées par deux précurseurs de Cyanine (Cy3) va favoriser une réaction d'aldolisation-élimination entraînant la formation du fluorophore et l'émission d'un signal de fluorescence dans le milieu.

3.1.1. Sensibilité des sondes PNA-Cy3

Pour cette étude, une première expérience a été réalisée en plaçant les sondes en solution tamponnée en présence du miARN ciblé à différentes concentrations (2 ; 5 et 10 μM) dans un rapport stœchiométrique (1:1:1) (**Figure 46 a**) et **b**). Une seconde expérience a été réalisée en plaçant les sondes en concentration fixe (10 μM) en solution tamponnée en présence du miARN ciblé

à des concentrations variant de 2 à 40 μM (**Figure 46 c**). Un contrôle négatif est réalisé à différentes concentrations de sondes (2 ; 5 et 10 μM), en l'absence du miARN ciblé (NTC) (**Figure 46 b**). Pour chaque expérience, la solution est chauffée à 95°C pendant 45 min et analysée à température ambiante. Les conditions décrites ont été déterminées et optimisées de façon expérimentale (des tests préliminaires ont été réalisés à des températures de réaction inférieures sans grande efficacité pour ce système). Les données obtenues sont ensuite analysées en utilisant un logiciel de traitement de données.

De façon inexplicable, l'étude du miARN miR-17 n'a pas permis d'obtenir de résultats exploitables, les différentes études réalisées sur ces sondes n'ayant pas permis de visualiser un signal de fluorescence dans des conditions de concentration adaptée (de l'ordre du μg).

Les résultats obtenus par l'étude de miR-92 ont permis de mettre en évidence une augmentation du signal de fluorescence correspondant à l'augmentation de la concentration en sonde dans le milieu. L'étude comparée de l'intensité des signaux en présence ($[\text{miR-92}] = 10 \mu\text{M}$) ou en l'absence de séquence ciblée (NTC) dans des conditions stœchiométriques de concentration en sondes (10 μM) dans le milieu montre un rapport de signal de fluorescence supérieur à 7.

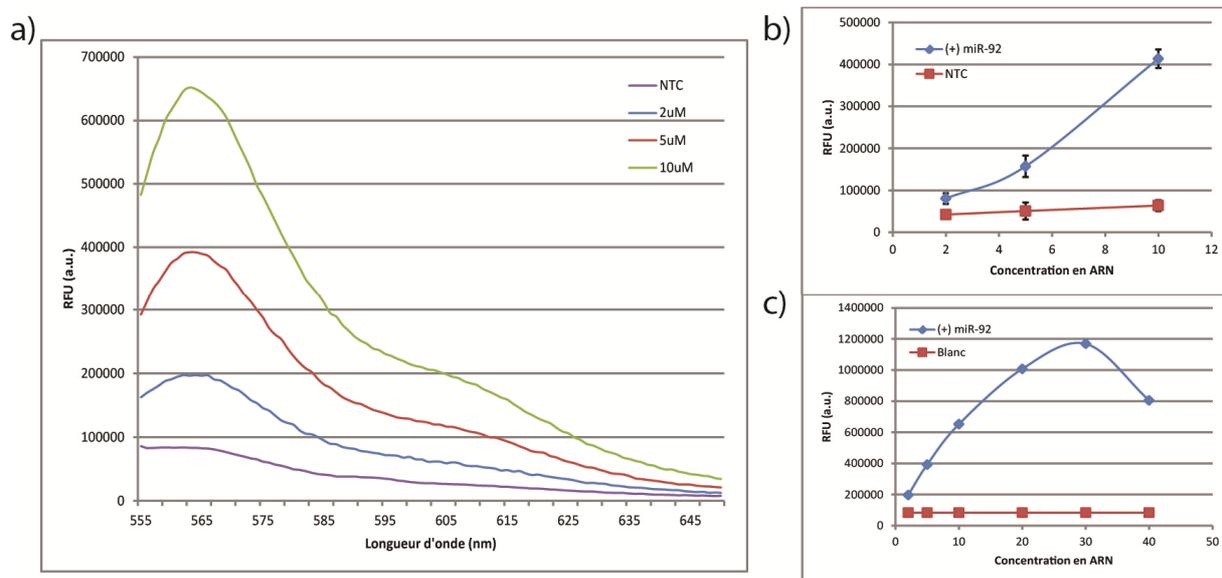


Figure 46 : Etude de sensibilité des sondes PNA-Cy3 : a) spectres d'émission de fluorescence du système PNA-Cy3 à différentes concentrations (2, 5 et 10 μM) en présence du microARN miR-92 en quantité stœchiométrique ; b) courbe d'évolution de fluorescence comparée en fonction de la concentration du système PNA-Cy3 en présence (+) ou en l'absence d'une quantité stœchiométrique du microARN miR-92 (NTC) ; c) courbe d'évolution de fluorescence en fonction de la concentration en microARN miR-92 à concentration fixe de PNA (10 μM).

3.1.2. Spécificité des sondes PNA-Cy3

Dans cette étude, les sondes sont mises en solution avec le miARN miR-92 à une concentration fixe (10 μM) dans un rapport stœchiométrique (1:1:1). Une première expérience consiste à évaluer l'effet produit par l'ajout dans le milieu d'un mélange d'ADN simple brin (ADNsb) commercial, extrait de thymus de veau, à différentes concentrations (0,15 ; 0,5 ; 1 et 2 équivalents, où 1 éq. correspond à 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (**Figure 47 a**) et **b**).

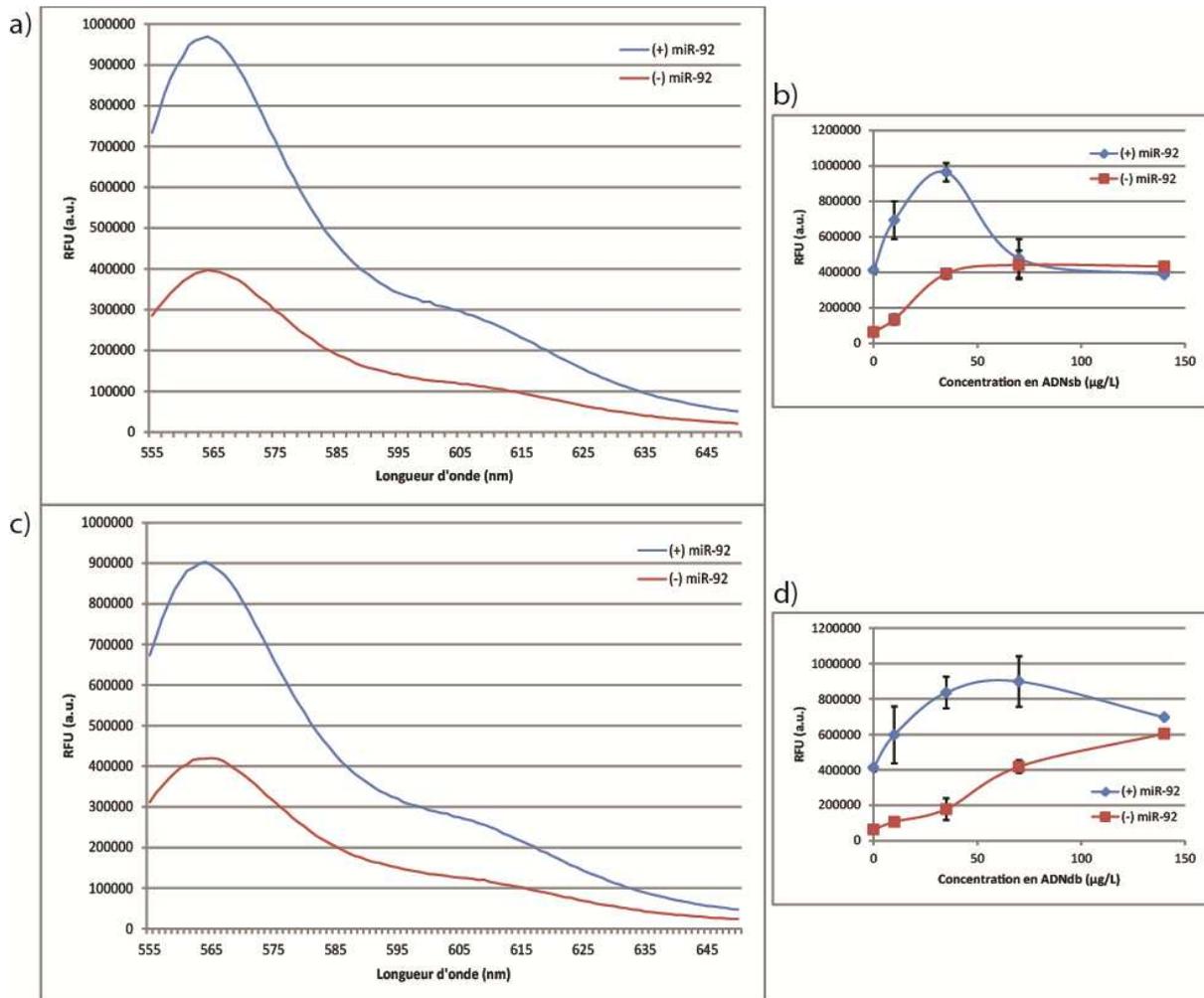


Figure 47 : Etude de spécificité des sondes PNA-Cy3 : a) spectres d'émission de fluorescence comparés avec l'ajout d'une quantité d'ADNsb (35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,5 éq.), en présence (+) et en l'absence (-) de miR-92 ; b) étude comparative des pics d'émission de fluorescence en présence (+) et en l'absence (-) de miR-92, à des concentrations variables en ADNsb ; c) spectre d'émission de fluorescence comparé avec l'ajout d'une quantité d'ADNdb (70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,5 éq.), en présence (+) et en l'absence (-) de miR-92 ; d) étude comparative des pics d'émission de fluorescence en présence (+) et en l'absence (-) de miR-92, à des concentrations variables en ADNdb.

Une deuxième expérience consiste à évaluer l'effet produit par l'ajout dans le milieu d'un mélange d'ADN double brin (ADNdb) commercial, extrait de thymus de veau, à différentes concentrations (0,07 ; 0,25 ; 0,5 et 1 équivalent, où 1 éq. correspond à $140 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (**Figure 47 c**) et **d**)).

Pour chaque expérience, la solution est chauffée à 95°C pendant 45 min et analysée à température ambiante. Les conditions décrites ont été déterminées et optimisées de façon expérimentale. Un contrôle négatif est systématiquement réalisé en l'absence de miARN ciblé ((-) miR-92). Les données obtenues sont ensuite analysées en utilisant un logiciel de traitement de données (Excel, Microsoft).

On constate que l'addition d'un mélange d'ADNsb dans le milieu, sans miARN ciblé, a pour effet d'augmenter le signal de base de fluorescence jusqu'à un plateau observé à partir de $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (1 éq.). En présence de miR-92, l'addition d'ADNsb à des concentrations inférieures à $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (0,5 éq.) conduit à l'augmentation du signal de fluorescence dans le milieu comparable à celle observée en présence unique de l'ADNsb. Au-delà de cette concentration, on note une diminution de l'intensité de fluorescence jusqu'à se confondre avec celle observée en l'absence du miARN ciblé ($[\text{ADNsb}] > 70 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Ce phénomène peut notamment s'expliquer par une compétitivité d'hybridation des sondes entre le microARN ciblé et l'ADNsb. Les sondes n'étant pas disposées de manière à favoriser la réaction fluorogénique, le signal observé diminue jusqu'à disparaître dans le bruit de fond. L'effet observé par l'addition d'ADNdb est relativement similaire, puisqu'on observe à nouveau une diminution de l'intensité de fluorescence en présence du miARN miR-92 à des concentrations en ADNdb supérieures à $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (0,5 équivalent), jusqu'à se confondre avec le bruit de fond pour des concentrations supérieures à $140 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (1 équivalent).

Avec ce système, la stratégie était de supprimer la présence de bruit de fond durant l'analyse, observé lors de l'utilisation de sondes basées sur la désactivation d'un fluorophore (e.g. TaqMan®), par l'utilisation de précurseurs non-fluorescents. La possibilité offerte par les Cyanines de travailler avec une grande variété de fluorophores observables sur une large gamme de longueur d'ondes permettait également d'envisager l'utilisation de ces sondes pour la détection de plusieurs cibles simultanément dans un même échantillon. Cependant, la nécessité de chauffer le milieu à une température de 95°C , ainsi que la faible spécificité observée pour ce système nous ont conduit à nous tourner vers une seconde stratégie.

3.2. Etude des sondes PNA-Coum-Thiol

Pour cette étude, deux couples de sondes ont été synthétisés, ciblant la séquence du miARN miR-132 ou la séquence codant pour l'allèle muté du gène codant pour l'EGFR (p.T790M).

Chaque couple est composé de deux sondes PNA fonctionnalisées, soit par une molécule de Coumarine 334 "désactivée" à leur extrémité N-terminale (Coum), soit par une fonction thiol à leur

extrémité C-terminale (Thiol). La reconnaissance de la séquence cible va provoquer le rapprochement de la Coumarine désactivée (par un mécanisme de transfert d'électron photoinduit (PET)), et de la fonction thiol nucléophile de telle sorte à restaurer un signal de fluorescence après une réaction d'addition de Michael (**Figure 48**). La formation du produit est suivie par l'observation de la fluorescence dans le milieu ($\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$). Les sondes ont été testées pour leur sensibilité à différentes concentrations en miARN miR-132, ainsi que pour leur spécificité vis-à-vis de mélanges d'ADN ou de groupements thiols compétiteurs.

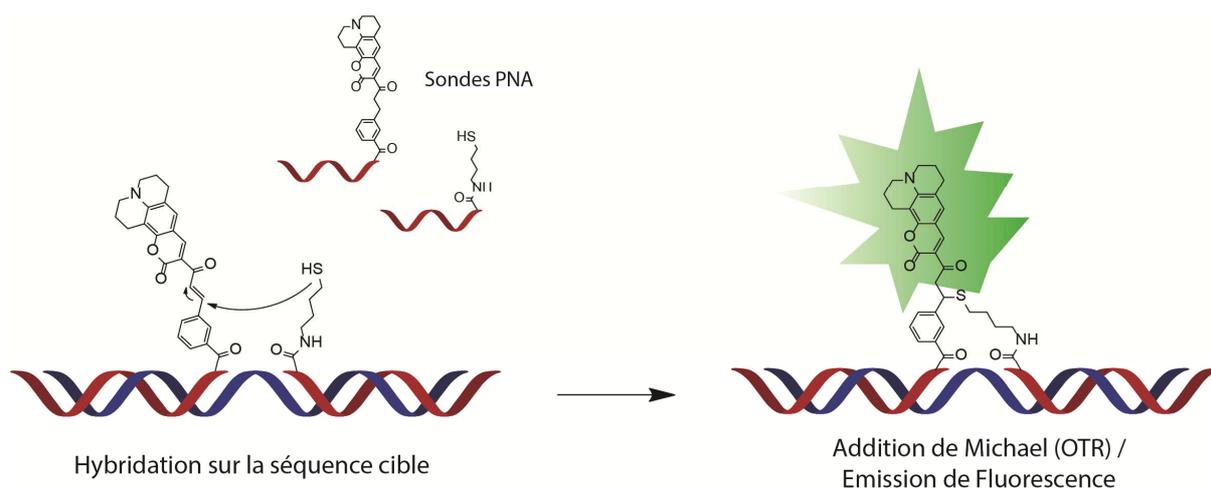


Figure 48 : Restauration du signal de fluorescence de la Coumarine 334 par réaction assistée par hybridation nucléotidique (OTR) : l'hybridation des deux sondes PNA fonctionnalisées respectivement par une Coumarine 334 et un groupement thiol va favoriser une réaction d'addition de Michael entraînant la réactivation du fluorophore et l'émission d'un signal de fluorescence dans le milieu.

3.2.1. Sensibilité des sondes PNA-Coum-Thiol pour la détection de miR-132

Pour cette étude, une première expérience a été réalisée en plaçant les sondes à différentes concentrations (0,1 à 1 μM) dans un rapport stœchiométrique (1:1:1) en solution tamponnée en présence (+) ou en l'absence (-) du miARN miR-132 (**Figure 49 a**). Une seconde expérience a été réalisée en plaçant les sondes en concentration fixe (1 μM) en solution tamponnée en présence du miARN ciblé à des concentrations variant de 0,1 à 10 μM (**Figure 49 b**).

Pour chaque expérience, une étude cinétique est réalisée en microplaque 384 puits (volume final 100 μL) à température ambiante sur une durée de 60 min. Les conditions décrites ont été déterminées et optimisées de façon expérimentale. Les données obtenues sont ensuite analysées en utilisant un logiciel de traitement de données.

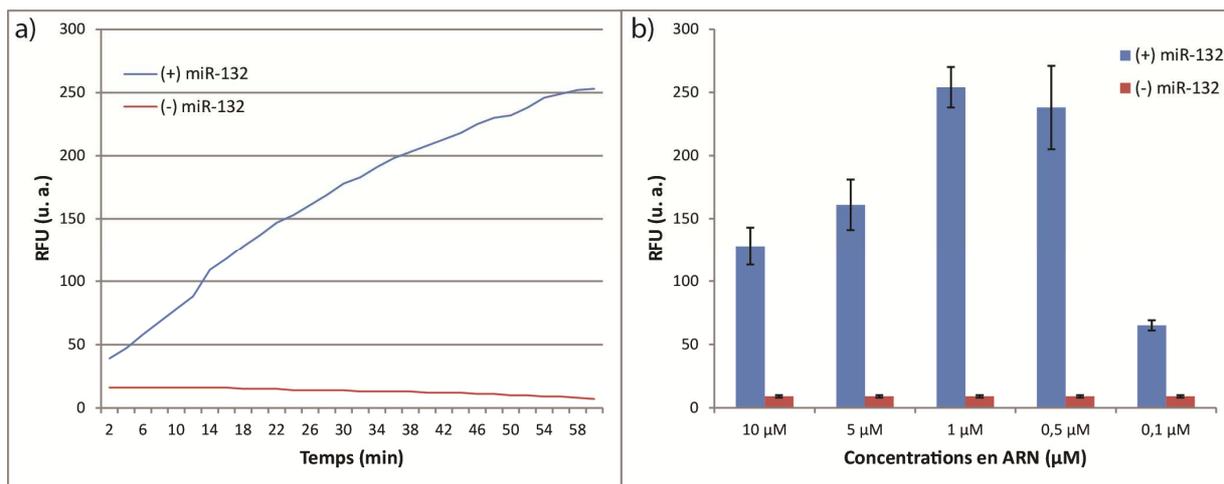


Figure 49 : Etude de sensibilité des sondes PNA-Coum-Thiol pour la détection du microARN miR-132 : a) courbe d'évolution cinétique de la fluorescence du système PNA-Coum-Thiol en concentration de 1 μM en présence (+) et en l'absence du microARN miR-132 (-) ; b) étude comparée des intensités de fluorescence après incubation d'une heure à température ambiante à concentration fixe de sondes, en présence (+) ou en l'absence (-) d'une concentration variable du microARN miR-132 (0,1 à 10 μM).

Les résultats obtenus par l'étude de miR-132 ont permis de mettre en évidence une augmentation du signal de fluorescence correspondant à l'augmentation de la concentration en sonde dans le milieu. L'étude comparée de l'intensité des signaux après 60 min d'incubation en présence ([miR-132] = 1 μM) et en l'absence de la séquence ciblée (-) dans des conditions stœchiométriques de concentrations en sonde (1 μM) dans le milieu permet d'obtenir un rapport de signal de fluorescence supérieur à 32. En comparaison, le rapport de signal de fluorescence observé dans l'étude précédente (7) à des concentrations en sondes PNA-Cy3 et miARN de 10 μM, est obtenu à des concentrations 20x inférieures (0,5 μM) avec les sondes PNA-Coum-Thiol, témoignant d'une meilleure sensibilité de ce système.

3.2.2. Spécificité des sondes PNA-Coum-Thiol pour la détection de miR-132

Dans cette étude, les sondes sont mises en solution tamponnée avec le miARN miR-132 à une concentration fixe (1 μM) dans un rapport stœchiométrique (1:1:1). Une première expérience consiste à évaluer l'effet produit par l'ajout dans le milieu d'un mélange d'ADN simple brin (ADNsb) commercial, extrait de thymus de veau, à différentes concentrations (0,5 ; 1 et 2 équivalents, où 1 éq. correspond à 6 μg.mL⁻¹). Une deuxième expérience consiste à évaluer l'effet produit par l'ajout dans le milieu d'un mélange d'ADN double brin (ADNdb) commercial, extrait de thymus de veau, à différentes concentrations (0,25 ; 0,5 et 1 équivalent, où 1 éq. correspond à 12 μg.mL⁻¹). Enfin, une

troisième expérience consiste à évaluer l'effet produit par l'ajout dans le milieu d'un groupement thiol compétiteur (sous forme de L-Cystéine) à différentes concentrations (1, 10 et 50 μM). Pour chaque expérience, une étude cinétique est réalisée à température ambiante sur une durée de 60 min. Les conditions décrites ont été déterminées et optimisées de façon expérimentale. Un contrôle négatif est systématiquement réalisé en l'absence de miARN ciblé ((-) miR-132).

On constate que l'ajout de mélange d'ADN dans le milieu provoque une légère augmentation du signal de base de fluorescence en l'absence de miR-132 (-) (**Figure 50**). Cependant, aucune évolution du signal n'est observée pendant l'étude cinétique de cette expérience, témoignant d'une spécificité des sondes pour la séquence ciblée. Parallèlement, en présence du miARN ciblé (+), on observe une diminution du signal de fluorescence, pouvant s'expliquer par une hybridation compétitive partielle des sondes sur des fragments d'ADN ajoutés au milieu réactionnel, diminuant ainsi le rendement de la réaction.

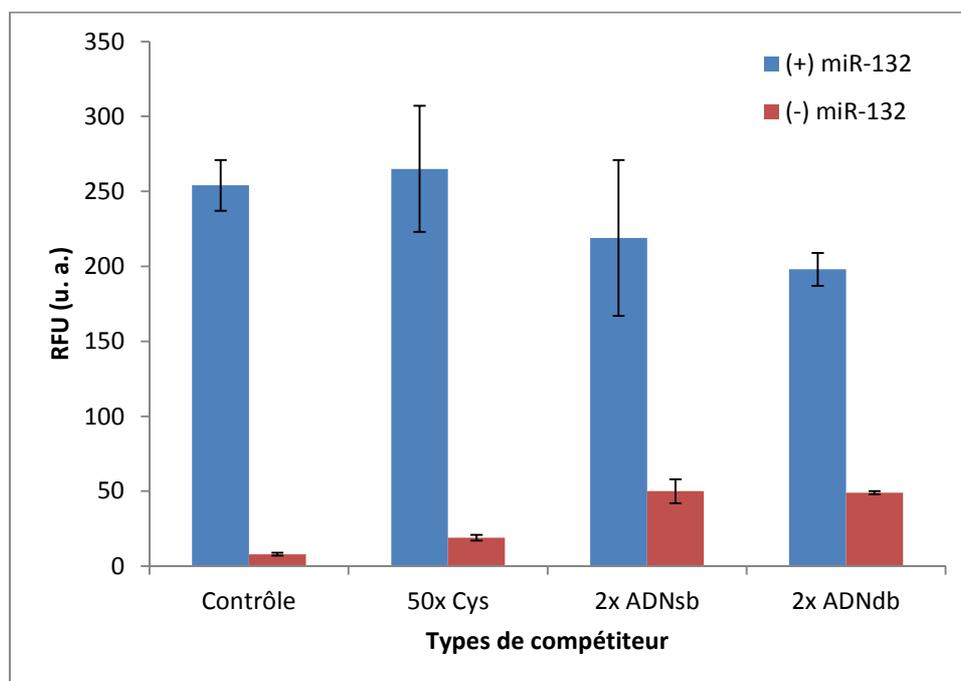


Figure 50 : Etude de spécificité des sondes PNA-Coum-Thiol₁₃₂ : étude comparative de l'intensité des signaux de fluorescence après incubation d'une heure à température ambiante, en présence d'une concentration fixe de sondes (1 μM). Chaque expérience est réalisée en présence (+) ou en l'absence (-) du microARN *miR-132* (1 μM), avec l'ajout de différents compétiteurs dans le milieu (50x Cys, 2x ADNs ou 1x ADNdb).

On constate également que l'ajout de groupements thiols compétiteurs en quantité importante (jusqu'à 50 μM) dans le milieu, sous forme d'acide aminé L-Cystéine, n'influence que très peu le

système. On n'observe dans ce cas qu'une légère augmentation du signal de fluorescence en présence (+) ou en l'absence (-) de miR-132.

3.2.3. Spécificité des sondes PNA-Coum-Thiol pour la détection de mutations ponctuelles

L'objectif de cette étude était de déterminer l'aptitude des sondes PNA-Coum-Thiol à discriminer entre différentes séquences comportant un polymorphisme nucléotidique (SNP). Pour cela, la spécificité de ces sondes a été étudiée pour différentes séquences, issues du miARN miR-132, dans lesquelles a été introduit un polymorphisme nucléotidique dans la séquence complémentaire des sondes PNA-Coum (**Tableau 7** - miR-132 HP2, miR-132 HP1, miR-132 HP2, miR-132 HP7 et miR-132 HP9). Les séquences miR-132 HP1, miR-132 HP2 et miR-132 HP3 correspondent à la substitution d'une base (purique ou pyrimidique) par une base de même nature (purique ou pyrimidique), respectivement en partie 5'-terminale, au centre et en partie 3'-terminale de la séquence complémentaire de la sonde PNA-Coum132. Les séquences miR-132 HP7 et miR-132 HP9 correspondent à la substitution d'une base (purique ou pyrimidique) par une base (purique ou pyrimidique) de nature différente, respectivement en partie 3'-terminale et au centre de la séquence complémentaire de la sonde PNA-Coum132. Durant cette étude, les différents oligonucléotides synthétiques utilisés correspondent à la forme désoxyribonucléotidique (ADN) des séquences décrites précédemment.

Afin de comparer la spécificité des sondes pour ces séquences, différentes solutions tamponnées sont préparées, contenant chacune une quantité stœchiométrique fixe en sondes et en séquences ciblées (1 μ M). Pour chaque expérience, une étude cinétique est réalisée en microplaque 384 puits (volume final 100 μ L) à température ambiante sur une durée de 2 heures. Un contrôle positif est réalisé en présence de la séquence ADN du miARN miR-132 (+). Un contrôle négatif a été réalisé en l'absence de toute séquence nucléotidique (NTC).

Les résultats obtenus démontrent une diminution de la spécificité des sondes pour les séquences contenant un polymorphisme nucléotidique au centre de la séquence ciblée (HP2 et HP9) par les sondes PNA-Coum132 (rapport de fluorescence d'environ 1/4 avec le contrôle positif) (**Figure 51**). Cependant, et de façon inexplicable, on observe une augmentation du signal de fluorescence en présence des séquences comportant un polymorphisme en extrémité de la séquence complémentaire de la sonde (HP1, HP3 et HP7).

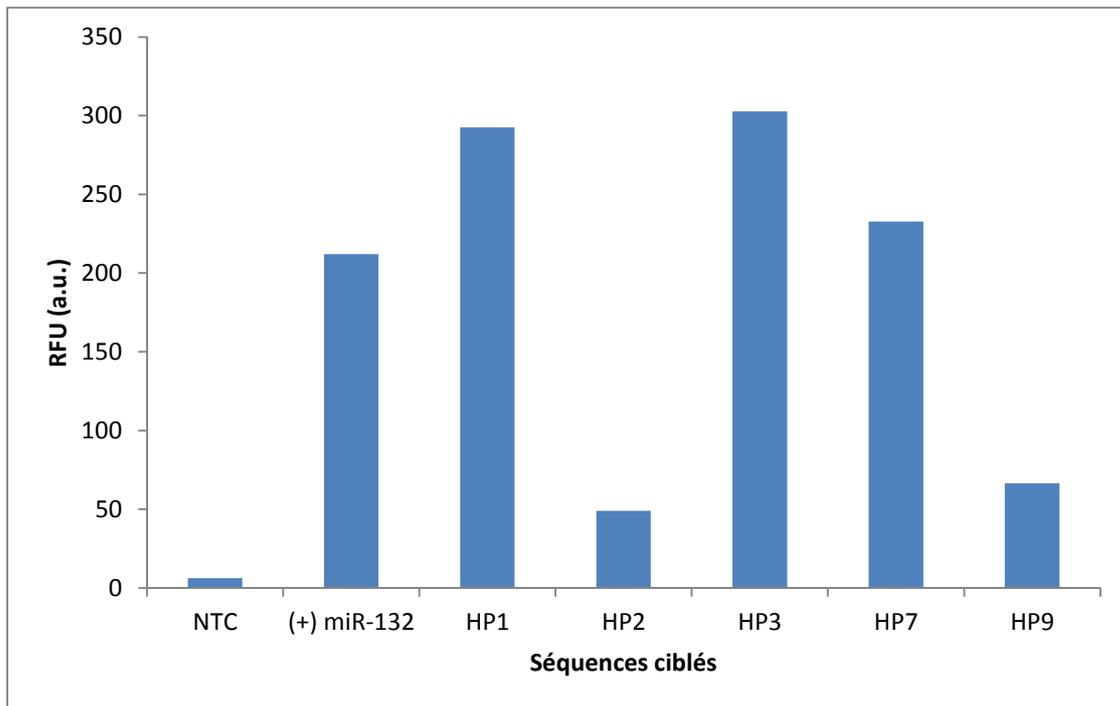


Figure 51 : Etude de spécificité des sondes PNA-Coum-Thiol : étude comparative de l'intensité des signaux de fluorescence après incubation de deux heures à température ambiante, en présence d'une quantité stœchiométrique de sondes et de séquence ciblée (HP1 – HP9) (1 μ M). Un contrôle positif est réalisé en présence de (+) de la séquence correspondante au microARN miR-132. Un contrôle négatif (NTC) est réalisé en l'absence d'ADN dans le milieu.

3.2.4. Sensibilité et spécificité des sondes PNA-Coum-Thiol pour la détection de l'allèle muté de gènes de l'EGFR (p.T790M)

Dans cette expérience, les sondes sont mises en solution tamponnée à une concentration fixe de 1 μ M. Deux études sont ensuite réalisées parallèlement sur chaque solution, (i) par l'ajout d'un fragment (48-mer) de la séquence de l'allèle muté de gène de l'EGFR (p.T790M) (Mut) à des concentrations variant de 0,1 à 5 μ M ; (ii) par l'ajout d'un fragment (48-mer) de la séquence sauvage du gène de l'EGFR (WT) à des concentrations variant de 0,1 à 5 μ M. Pour chaque expérience, une étude cinétique est réalisée en microplaque 384 puits (volume final 40 μ L) à une température de 37°C sur une durée de 1 h. Un contrôle négatif (NTC) est systématiquement réalisé en l'absence d'ADN. Les données obtenues sont ensuite analysées par un logiciel de traitement de données.

Les résultats obtenus démontrent une sensibilité optimale pour ce système à une concentration en sondes trois fois supérieure à la concentration en ADN ciblé (**Figure 52**). On constate, de façon prévisible, que l'augmentation de la concentration d'ADN entraîne une diminution du rendement de la réaction, dûe à l'hybridation des sondes sur des fragments distincts d'ADN. Au contraire, la diminution de la concentration en ADN n'entraîne qu'une faible diminution de signal de

fluorescence, et on observe un rapport signal sur bruit équivalent à 6 à une concentration en ADN de 0,1 μM .

L'étude comparée des intensités de fluorescence en présence de la séquence mutée cible (T790M) ou en présence de la séquence sauvage, ne variant que par la substitution d'un seul nucléotide, démontre une importante compétitivité d'hybridation pour ces sondes. Le rapport d'intensité de fluorescence entre ces deux expériences est au maximum équivalent à 2 (pour $[\text{ADN}] = 0,5 \mu\text{M}$).

Si la spécificité des sondes dans ce système semble limitée pour la détection d'une faible quantité de séquence mutée dans un échantillon contenant une proportion importante de séquence sauvage, de récents travaux ont démontré l'intérêt de bloquer, à l'aide d'une sonde PNA, le site complémentaire de la séquence sauvage dans le but d'amplifier sélectivement la séquence mutée par une réaction de PCR (Guha *et al.* 2013). Sur ce modèle, il apparaît envisageable d'utiliser un système à trois sondes dont le but serait de bloquer le site complémentaire de la séquence d'ADN sauvage afin d'augmenter la sensibilité de notre système.

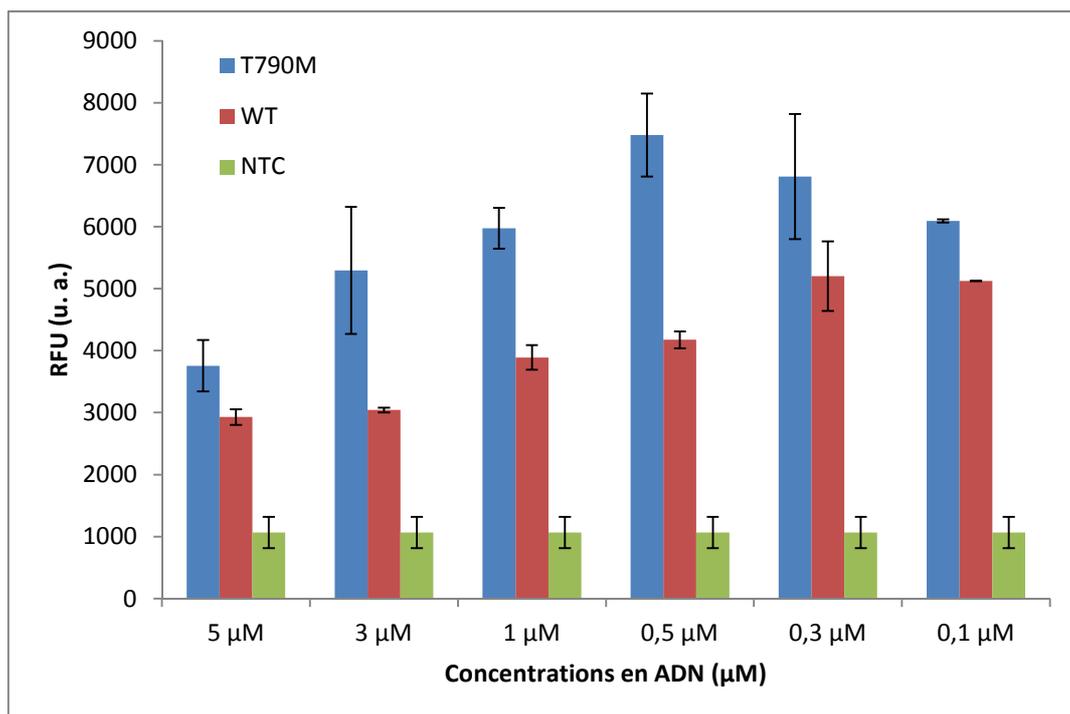


Figure 52 : Etude de sensibilité et de spécificité des sondes PNA-Coum-Thiol_{T790M} : étude comparée des intensités de fluorescence après incubation d'une heure à 37°C à concentration fixe de sondes (1 μM), en présence de la séquence ciblée (T790M) ou de la séquence sauvage (WT) à des concentrations variables (0,1 à 5 μM). Un contrôle négatif (NTC) est réalisé en l'absence d'ADN dans le milieu.

3.3. Intégration des sondes à l'outil microfluidique

Une fois l'efficacité des sondes démontrée en solution, notre objectif a été de les intégrer à la microfluidique digitale. Pour cela, nous avons réalisé plusieurs types d'expériences focalisées sur l'utilisation des sondes PNA-Coum-Thiol pour la détection du miARN miR-132.

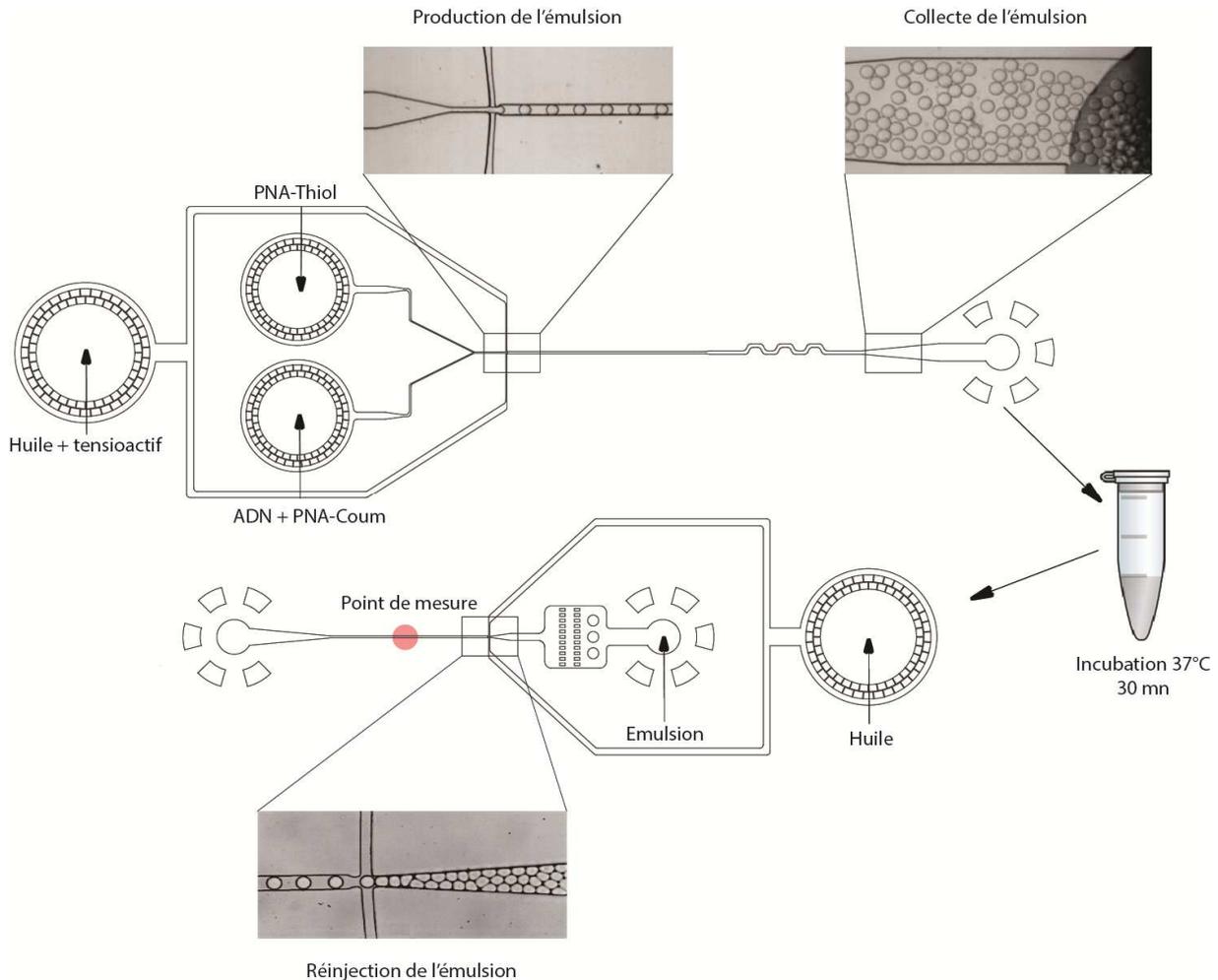


Figure 53 : Etude des sondes PNA-Coum-Thiol en microfluidique digitale : des microgouttelettes d'eau-dans-l'huile sont produites par focalisation hydrodynamique dans un module de production à double entrée de phases aqueuses, collectées et incubées à 37°C pendant 30 minutes avant d'être réinjectées dans un module de réinjection. Les deux sondes sont volontairement séparées lors de la production afin que la réaction soit initiée au sein même de l'émulsion. Une mesure de l'intensité de fluorescence est réalisée lors de la réinjection afin d'observer l'efficacité de la réaction.

Toutes les expériences sont réalisées dans un module de production d'émulsions par focalisation hydrodynamique comportant deux entrées de phases aqueuses (co-flow). Les émulsions sont collectées en dehors de la puce, puis incubées à 37°C pendant 30 min avant d'être réintroduites dans

un module de réinjection pour analyse (**Figure 53**). Les données sont collectées et analysées systématiquement sur 200 000 microgouttelettes avec un logiciel de traitement de données.

3.3.1. Sensibilité des sondes PNA-Coum-Thiol en microfluidique digitale

Pour cette étude, différentes émulsions d'eau-dans-l'huile ont été produites dans un module microfluidique disposant de deux entrées distinctes de phase aqueuse comportant : (i) pour la première, une solution de tampon phosphate 10 mM (pH = 7,4) contenant une concentration fixe de PNA-Thiol₁₃₂ (5 μ M), (ii) pour la seconde, une solution de tampon phosphate 10 mM (pH = 7,4) contenant une concentration fixe de PNA-Coum₁₃₂ (5 μ M) et une concentration variable (0,2 ; 0,5 et 1 μ M) de la séquence synthétique de miR-132 sous la forme désoxyribonucléotidique (ADN).

La phase continue est composée d'une huile fluorée (HFE-7500) contenant 2% (m/m) de tensioactif Kry-jeffa₁₀₀₀. Les émulsions sont collectées dans un tube (1,5 mL) puis réinjectées dans un module de réinjection afin d'observer l'évolution de la fluorescence dans les microgouttelettes (**Figure 53** (le système de détection de fluorescence sur puce est expliqué au **Chapitre 1 – Figure 32**). Un contrôle négatif a également été réalisé en l'absence de séquence ciblée (NTC).

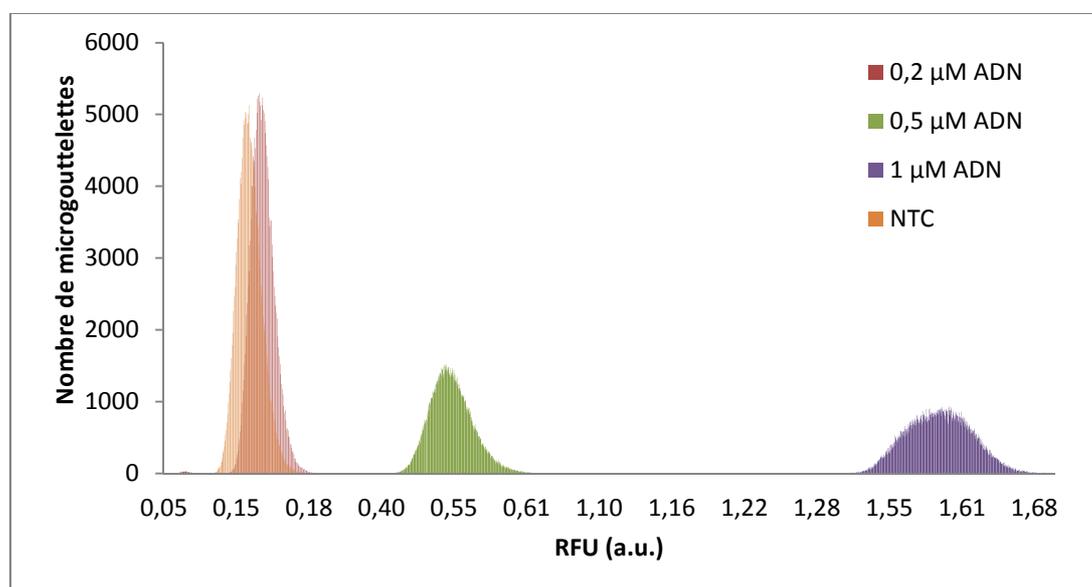


Figure 54 : Etude de sensibilité des sondes PNA-Coum-Thiol en microfluidique digitale : étude comparée de la distribution de fluorescence au sein des microgouttelettes en concentration fixe de sondes et en présence ou en l'absence (NTC) d'une concentration variable de séquences ciblées dans le milieu (0,2 ; 0,5 ou 1 μ M).

Cette étude a permis de mettre en évidence la limite de sensibilité de ce système en microfluidique digitale. On observe, à une concentration de séquence ciblée de 0,2 μ M, une superposition du pic de

fluorescence dans l'émulsion avec le signal de base (NTC) (**Figure 54**). A une concentration en séquence ciblée de 0,5 μM , on distingue totalement le pic de fluorescence de l'émulsion avec le signal de base, avec un rapport d'intensité supérieur à 3. Enfin, on observe également un maximum du rapport d'intensité de fluorescence avec le signal de base (> 10) à une concentration en ADN équivalent à 1 μM , permettant parfaitement de discriminer les microgouttelettes contenant la séquence ciblée.

3.3.2. Spécificité des sondes PNA-Coum-Thiol en microfluidique digitale

Pour cette étude, différentes émulsions d'eau-dans-l'huile ont été produites dans un module microfluidique disposant de deux entrées distinctes de phase aqueuse comportant, (i) pour la première, une solution de tampon phosphate 10 mM (pH = 7,4) contenant une concentration fixe de PNA-Thiol₁₃₂ (2 μM), (ii) pour la seconde, une solution de tampon phosphate 10 mM (pH = 7,4) contenant une concentration fixe de PNA-Coum₁₃₂ (2 μM) et alternativement, une concentration variable (1 et 2 μM) d'une séquence synthétique comportant un polymorphisme d'un seul nucléotide de *miR-132* sous la forme désoxyribonucléotidique (ADNmut). La phase continue est composée d'une huile fluorée (HFE-7500) contenant 2% (m/m) de tensioactif Kry-jeffa₁₀₀₀.

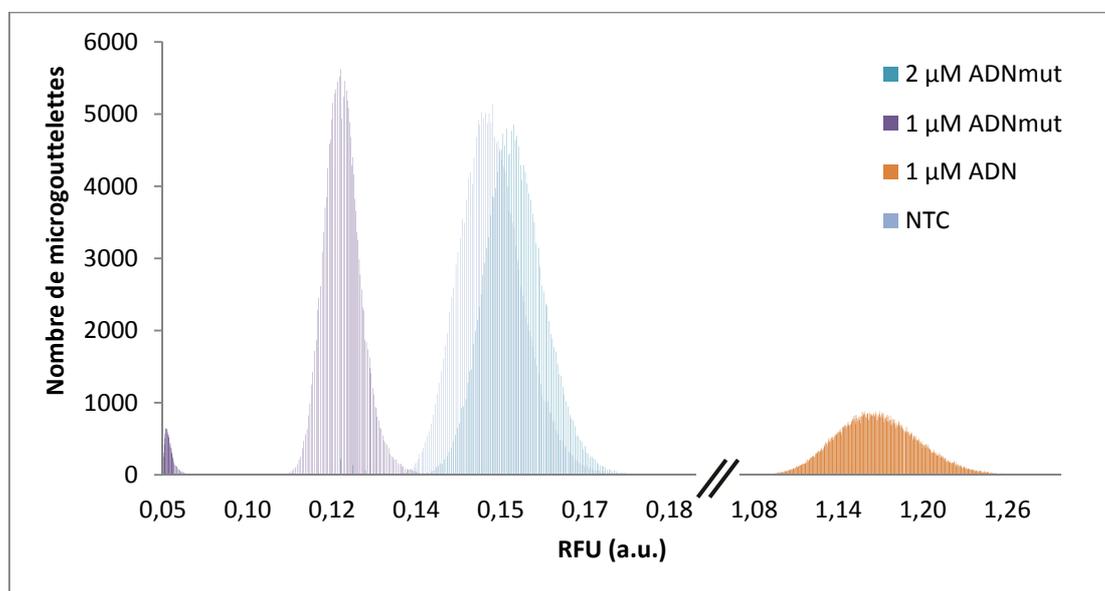


Figure 55 : Etude de spécificité des sondes PNA-Coum-Thiol en microfluidique digitale : étude comparée de la distribution de fluorescence au sein des microgouttelettes en concentration fixe de sondes en présence ou en l'absence (NTC) d'une concentration variable du microARN *miR-132* sauvage (ADN) ou contenant un polymorphisme nucléotidique (ADNmut).

Les émulsions sont collectées dans un tube (1,5 mL, Eppendorf) puis réinjectées dans un module de réinjection afin d'observer l'évolution de la fluorescence dans les microgouttelettes. Un contrôle positif a été réalisé en présence de la séquence désoxyribonucléotidique du microARN ciblé (ADN). Un contrôle négatif a également été réalisé en l'absence de séquence ciblée (NTC).

Cette étude a permis de mettre en évidence une parfaite spécificité des sondes pour leur cible. La mise en solution des sondes avec une quantité identique ou supérieure d'ADN comportant une modification d'un nucléotide dans la séquence n'entraîne pas d'augmentation du signal de base (**Figure 55**). L'étude comparative à concentration équivalente d'ADN mut et d'ADN témoin d'un rapport d'intensité de fluorescence équivalent à 10.

4. Conclusions

Ces travaux ont permis de développer deux nouveaux systèmes de sondes fluorogéniques adaptés à la détection de séquences oligonucléotidiques spécifiques. Un premier système basé sur l'utilisation de précurseurs de Cyanine a démontré une faible sensibilité, mais une bonne spécificité de séquence permettant leur potentielle utilisation pour la détection de biomarqueurs spécifiques (miARN) en présence de compétiteurs biologiques. Cependant la nécessité de chauffer le milieu à 95°C ainsi que leur sensibilité limite leur utilisation pour la détection de séquences rares, notamment en microfluidique digitale. Un second système basé sur l'utilisation d'une Coumarine "désactivée", offre de bien meilleurs résultats en sensibilité ainsi qu'une meilleure spécificité d'appariement, due notamment aux conditions d'utilisations plus douces (réaction à température ambiante ou incubation à 37°C). De plus, les travaux réalisés en microfluidique digitale ont démontré une bonne intégration de ces systèmes. Cependant, la sensibilité ne permet pas la détection de molécules uniques en émulsion avec les techniques d'analyse utilisées dans cette étude (système optique).

Dans les conditions actuelles de détection, l'observation de molécules ciblées uniques au sein de microgouttelettes nécessitera une étape préliminaire d'amplification de la séquence. Pour cela, différentes perspectives s'offrent à nous, et si la perspective d'introduire les sondes (en solution ou au sein même des microgouttelettes dans le cas d'une application en microfluidique digitale) dans le milieu après une réaction de PCR visant à amplifier la séquence ciblée est envisageable, différents travaux sont également en cours afin d'intégrer directement ces sondes dans une réaction de PCR en temps réel. D'autres perspectives sont également à l'étude afin d'augmenter le signal de fluorescence induit par les sondes PNA en intégrant d'autres type de fluorophore possédant un rendement quantique supérieur (notamment par l'utilisation de "boîtes quantiques").

Des travaux ultérieurs devront également être réalisés afin d'appliquer ces sondes à la détection de biomarqueurs sur des échantillons biologiques.

Chapitre 3 : Développement d'une méthode de détection de microARN en PCR digitale en gouttelettes

Scientifiques impliqués dans ce travail : Sonia Garrigou et Philippe Nizard

Collaborateur : Raindance Technologies

1. Introduction

Il est aujourd'hui établi que les microARN (miARN) jouent un rôle important dans différents processus cellulaires tels que la différenciation cellulaire, la croissance cellulaire ou encore les processus de mort cellulaire. De plus le profil d'expression de ces miARN peut être corrélé avec différents types de pathologies, et notamment diverses formes de cancers (Hayes *et al.* 2014). En effet, l'altération de l'expression de miARN dans le cas de certains cancers a déjà fait l'objet de nombreuses études et apparaît aujourd'hui comme un potentiel biomarqueur d'intérêt pour leur classification (Ambros, 2011). L'observation d'une surexpression ou d'une sous-expression de ces marqueurs dans le sang ou d'autres fluides corporels permet d'envisager leur utilisation dans des méthodes non-invasives de diagnostic précoce (Wark *et al.* 2008, Lu *et al.* 2009). De plus, différentes études ont pu démontrer une parfaite stabilité des miARN circulant présents dans le sérum ou le plasma, et ce, dans des conditions drastiques de pH (de 1 à 13) ou de températures ($< 0^{\circ}\text{C}$; $> 100^{\circ}\text{C}$), ainsi qu'une bien meilleure résistance aux ribonucléases en comparaison des miARN extraits de tissus ou de cellules (Mitchell *et al.* 2008). Cependant, le développement de méthodes de détection efficaces et quantitatives est rendu difficile par la faible taille de ces composés (entre 19 et 24 nucléotides) ainsi que la grande similarité de séquence qui les caractérise (Wang *et al.* 2007).

L'intérêt grandissant pour les miARN a conduit à l'émergence de nouvelles techniques de détection à haut-débit, incluant les micro-puces à miARN ou encore les techniques basées sur des billes-support ("bead-based assay") (Wang *et al.* 2010) (voir le paragraphe **1.2.4.2.** de l'introduction pour une description de ces méthodes). Si ces récentes techniques ont grandement facilité l'étude de l'expression de miARN circulant, elles nécessitent généralement une quantité importante d'échantillon biologique et sont, par conséquent, utilisées essentiellement dans d'éventuelles procédures de séquençage préliminaire. Les méthodes de RT-PCR quantitatives (RT-qPCR) ont également été utilisées pour l'étude de l'expression des miARN, notamment pour la détection de faibles quantités dans des échantillons de sérum (Moltzahn *et al.* 2011, Ng *et al.* 2009).

Au début des années 2000, différents travaux ont démontré la possibilité de compartimenter les réactions de PCR dans des microgouttelles (Ghadessy *et al.* 2001, Nakano *et al.* 2003, Williams *et al.* 2006). Cette technique, dénommée "PCR en émulsion" (ePCR), est basée sur la division d'une solution contenant les réactifs nécessaires à la réaction de PCR dans une émulsion d'eau-dans-l'huile thermostable. Dans ces expériences, la solution est compartimentée de sorte à ce que chaque gouttelette contienne moins d'une molécule d'ADN cible et permet de réaliser jusqu'à plusieurs millions de réactions simultanément. La première application de cette méthode a servi à l'évolution dirigée d'enzymes ADN polymérase thermostables (Ghadessy *et al.* 2001). Par la suite, l'ePCR a été adaptée à différentes applications, notamment pour la détection et la quantification de séquences spécifiques d'ADN (Diehl *et al.* 2005, Beer *et al.* 2007, Pekin *et al.* 2011).

En 2007, Beer *et al.* ont décrit les premiers travaux utilisant la microfluidique digitale pour la compartimentation de réactions de PCR en temps réel dans des microgouttelettes (10 pL) d'eau dans une huile minérale (M8662). La présence de sondes TaqMan® dans le milieu permet la détection de séquence ciblée par l'observation des microgouttelettes à l'aide d'un microscope à fluorescence (Beer *et al.* 2007).

Pekin *et al.* ont décrit, en 2011, une technique de détection quantitative à haut-débit de mutations rares sur l'ADN génomique utilisant la microfluidique digitale pour la production d'émulsion et l'analyse de réactions de PCR en émulsion. Cette technique permet de détecter 1 séquence d'ADN mutée (mutation sur le gène *KRAS*) dans un échantillon contenant jusqu'à 200 000 fois la séquence d'ADN sauvage (non muté) analogue (Pekin *et al.* 2011). Pour cela, une émulsion d'eau dans une huile fluorée (HFE-7500), contenant le matériel nécessaire à la réaction de PCR, est produite par focalisation hydrodynamique dans un module de production en matière polymère (Polydiméthylsiloxane – PDMS). L'émulsion est ensuite collectée dans un tube PCR (0,5 mL), puis thermocyclée avant d'être réintroduite dans un module de réinjection pour être analysée (**Figure 56**). Un système de deux sondes TaqMan® (vert – 6-FAM et rouge – NED) permet de discriminer la séquence mutée de la séquence sauvage lors de l'analyse.

Afin d'obtenir une méthode de détection hautement sensible et spécifique, nécessitant de faibles quantités d'échantillons biologiques, notre étude s'est donc portée sur l'utilisation de la méthode de PCR en gouttelettes à travers l'utilisation d'une plateforme commerciale pour la production et l'analyse de microémulsions. Cette plateforme a été développée et validée par la société Raindance Technologies en collaboration avec notre équipe (Raindrop® Digital PCR System, Raindance Technologies).

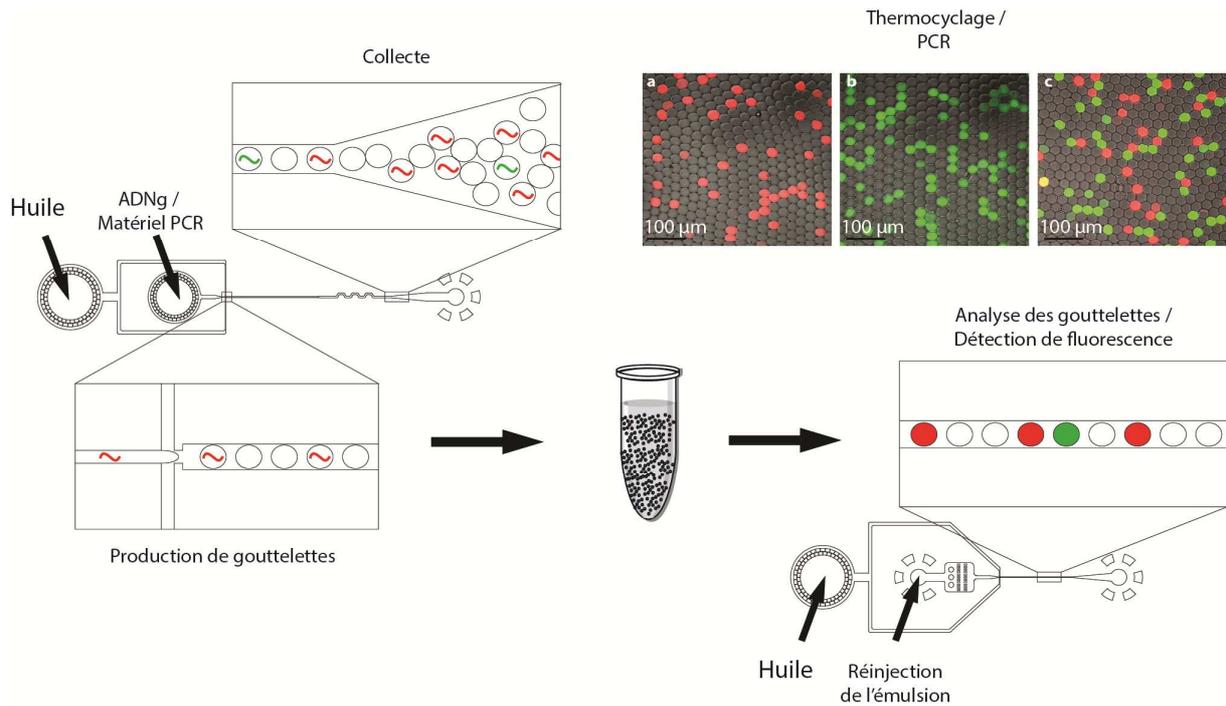


Figure 56 : Procédure d'analyse d'un échantillon biologique pour la détection de mutation spécifique sur l'ADN

génomique : L'échantillon biologique est introduit dans un module microfluidique et fractionné dans des microcompartiments d'eau-dans-l'huile (microgouttelettes) en présence de l'ensemble des réactifs nécessaires à la détection des séquences ciblées. Dans l'exemple présent ici, deux sondes TaqMan® portant deux fluorophores différents (6-FAM (vert) et NED (rouge)) sont utilisés pour détecter deux séquences cibles. L'émulsion produite est ensuite collectée et thermocyclée. Pendant le thermocyclage, en présence de séquence cible, les fluorophores portés par les sondes TaqMan® sont libérés au sein des microgouttelettes (photographie, en haut à droite), générant ainsi des gouttelettes vertes, rouges ou jaunes (correspondant à la présence des deux séquences cibles au sein d'une même gouttelette). Les gouttelettes peuvent également être réintroduites dans un second module microfluidique pour analyse de leurs fluorescences (inspirée de Pekin *et al.* 2011).

Plusieurs miARN ont été ciblés lors de ces expériences, présentant une surexpression avérée dans le cas de cancers, notamment les miARN miR-17* et miR-92, ayant déjà fait l'objet de nombreuses études (Mogilyansky *et al.* 2013), ainsi que le miARN mir-21, jouant un rôle dans la prolifération de cellules tumorales (Boele *et al.* 2014). Deux ARN de référence, le miARN miR-16 et le petit ARN RNU 48, ont été choisis comme contrôles endogènes (Torres *et al.* 2013). Le profil d'expression de ces miARN a d'abord été analysé sur des échantillons d'ARN totaux extraits de lignées cellulaires tumorales de cancer colorectal HCT 116.

Pour chaque expérience, une étude préliminaire de RT-qPCR en microplaque 384 puits est réalisée pour les différents échantillons afin de valider les conditions expérimentales et d'évaluer la concentration relative de chaque miARN ciblé ainsi que celle des différents ARN de référence.

2. Matériels et méthodes

2.1. Réactifs

Les sondes TaqMan®, les kits TaqMan® MicroRNA Reverse Transcriptase, le Genotyping Master Mix, les kits de RT-PCR TaqMan® One-Step RT-PCR et AgPath-ID™ One-Step RT-PCR ont été achetés chez Life Technologies. Les kits RNeasy® mini et OneStep RT-PCR ont été achetés chez Qiagen.

2.2. Extraction des miARN

Des ARN totaux ont été extraits à partir de lignées cellulaires de cancer colorectal HCT 116 (HTCC-CCL-247) à l'aide d'un kit d'extraction commercial (RNeasy® mini, Qiagen) en suivant les instructions du fabricant, et conservés à -80°C sous forme d'aliquots avec une concentration en ARN total mesurée (Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Technologies) à 360 µg.L⁻¹ (échantillons d'ARN HCT 116).

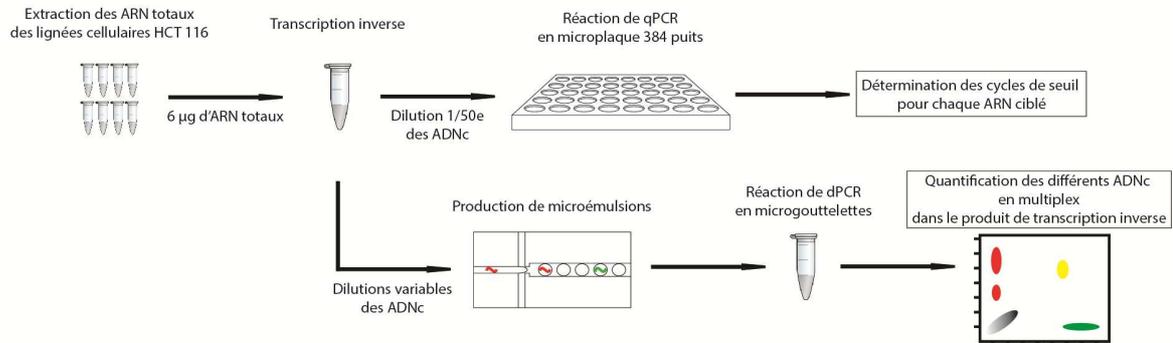
2.3. Amplification des séquences ciblées de miARN par RT-qPCR

L'étude de l'expression des miARN ciblés dans les échantillons d'ARN HCT 116, a tout d'abord été réalisée de façon classique (**Figure 57 a**). Dans cette expérience, les réactions de transcription inverse et de qPCR sont réalisées indépendamment (réaction dite "en deux étapes"). Les réactions de transcription inverse (RT) ont été réalisées, en tube PCR (0,5 mL, Eppendorf), séparément pour chaque miARN ciblé à partir d'une quantité initiale de 6 µg d'ARN totaux et ont abouti à la formation d'ADN complémentaire (ADNc) de la séquence ciblée (kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcriptase, Life Technologies). Une réaction d'amplification par PCR a été réalisée et suivie en temps réel (qPCR) pour chaque ARN ciblé, à partir de quantités variables d'ADNc, par une enzyme ADN polymérase AmpliTaq Gold® (TaqMan® Genotyping Master Mix, Life Technologies) et selon les recommandations du fabricant.

Une seconde étude des miARN ciblé présent dans les ARN HCT 116 a été réalisée en combinant les réactions de transcription inverse et de qPCR en une réaction (**Figure 57 b**). Pour cela, différents kits commerciaux, préconisés pour la détection d'ARN messenger (ARNm), ont été utilisés afin d'évaluer l'efficacité pour nos applications : kit TaqMan® One-Step RT-PCR (Life Technologies) ; kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Life Technologies) ; OneStep RT-PCR (Qiagen) en suivant les protocoles fournis par les fabricants. Les conditions de RT-PCR et de qPCR ont été adaptées à la détection des MicroARN miR-17*, miR-92a et miR-21, ainsi qu'aux références miR-16 et RNU 48.

Toutes les conditions expérimentales utilisées lors de ce chapitre sont décrites et répertoriées en annexe.

a) Stratégie de détection de microARN en RT-PCR "deux étapes"



b) Stratégie de détection de microARN en RT-PCR "une étape"

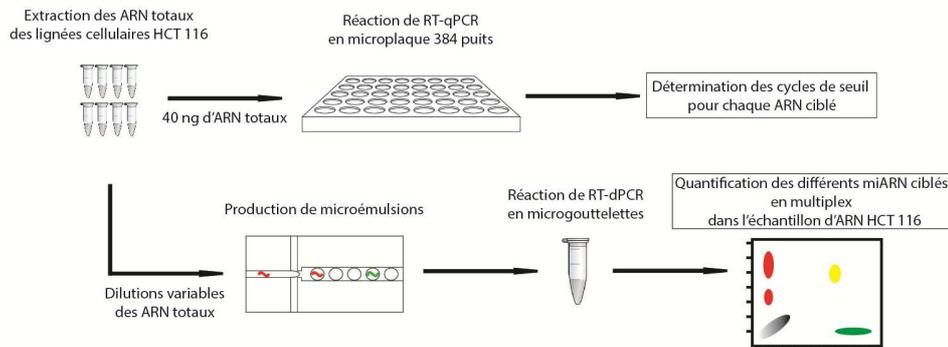


Figure 57 : Descriptions des différentes stratégies de détection de microARN en RT-qPCR et RT-dPCR en microgouttelettes : a) stratégie de détection des microARN par RT-PCR "deux étapes" : après extraction des ARN totaux de lignées cellulaires HCT 116, une réaction de transcription inverse permet la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de différents ARN ciblés. Le produit de transcription inverse est ensuite analysé en qPCR en microplaque 384 puits afin de déterminer les cycles de seuil de chaque ADNc ciblé, avant d'être analysé en dPCR en microgouttelettes ; b) stratégie de détection des microARN par RT-PCR "une étape" : après extraction des ARN totaux de lignées cellulaires HCT 116, l'échantillon est analysé en qPCR en microplaque 384 puits afin de déterminer les cycles de seuil de chaque ARN ciblé, avant d'être analysé en dPCR en microgouttelettes.

Les réactions de qPCR et RT-qPCR en une étape sont réalisées hors gouttes à l'aide d'un appareil d'analyse de PCR en temps réel (ABI PRISM® 7900HT, Life Technologies). Les valeurs de cycle de seuil (Ct) des différentes séquences ciblées (ARN ou ADNc) sont déterminées à l'aide d'un logiciel de traitement de données (SDS software, Life Technologies)

2.4. Les sondes PCR

Les différentes réactions de RT-qPCR ont été réalisées en utilisant des sondes TaqMan® commerciales conjuguées aux fluorophores 6-carboxyfluoresceine (6-FAM, λ_{ex} = 494 nm, λ_{em} = 522 nm) et VIC (λ_{ex} = 528 nm, λ_{em} = 554 nm). Les séquences des différentes cibles sont décrites dans le **Tableau 8**.

Noms	Séquences
<i>miR-17*</i>	5'-ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG-3'
<i>miR-92a</i>	5'-UAUUGCACUUGUCCCCGCCUGU-3'
<i>miR-21</i>	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'
<i>miR-16</i>	5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3'
<i>RNU 48</i>	5'-GATGACCCCAGGTAAGTCTGAGTGTGTGCTGATGCCATCACCGCAGCGCTCTGACC-3'

Tableau 8 : Liste et séquences des miARN et références ciblés

2.5. Utilisation des stations Raindrop®

Le système Raindrop® est composé de deux stations microfluidiques distinctes (**Figure 58**) permettant la production de 8 émulsions en parallèle contenant de 5 à 10 millions de microgouttelettes de 5 pL (25-50 μ L de mélange réactionnel) d'eau dans une huile fluorée stabilisée par l'ajout préalable de tensioactif (de composition inconnue). Les émulsions contenant le matériel nécessaire aux réactions de qPCR (ou RT-PCR/qPCR) sont produites dans la station "Raindrop® source" et collectées dans des tubes PCR (0,2 mL, Eppendorf) avant d'être placées dans un thermocycleur (MJ mini®, BioRad). Les cycles de qPCR (ou RT-PCR/qPCR) varient en fonction des différents kits commerciaux employés. Les émulsions sont ensuite réintroduites dans la station "Raindrop® sense" afin d'être analysées par l'analyse de l'émission de fluorescence dans les microgouttelettes. Un système de sondes TaqMan® associées avec deux fluorophores différents (vert – 6-FAM et orange – VIC) a été utilisé pour la détection simultanée de différentes cibles dans une même expérience (multiplex). L'étude en multiplex des différents miARN a été réalisée en associant une fluorescence (signal "vert" ou "orange") à une séquence ciblée à des concentrations en sondes variables (de 1x à 2x) ou en associant deux fluorophores différents à la détection d'une même cible (signal "jaune") (Zhong *et al.* 2011, Didelot *et al.* 2013). Les résultats sont ensuite analysés et traités à l'aide d'un logiciel de traitement de données (Raindrop Analyst, FlowJo).

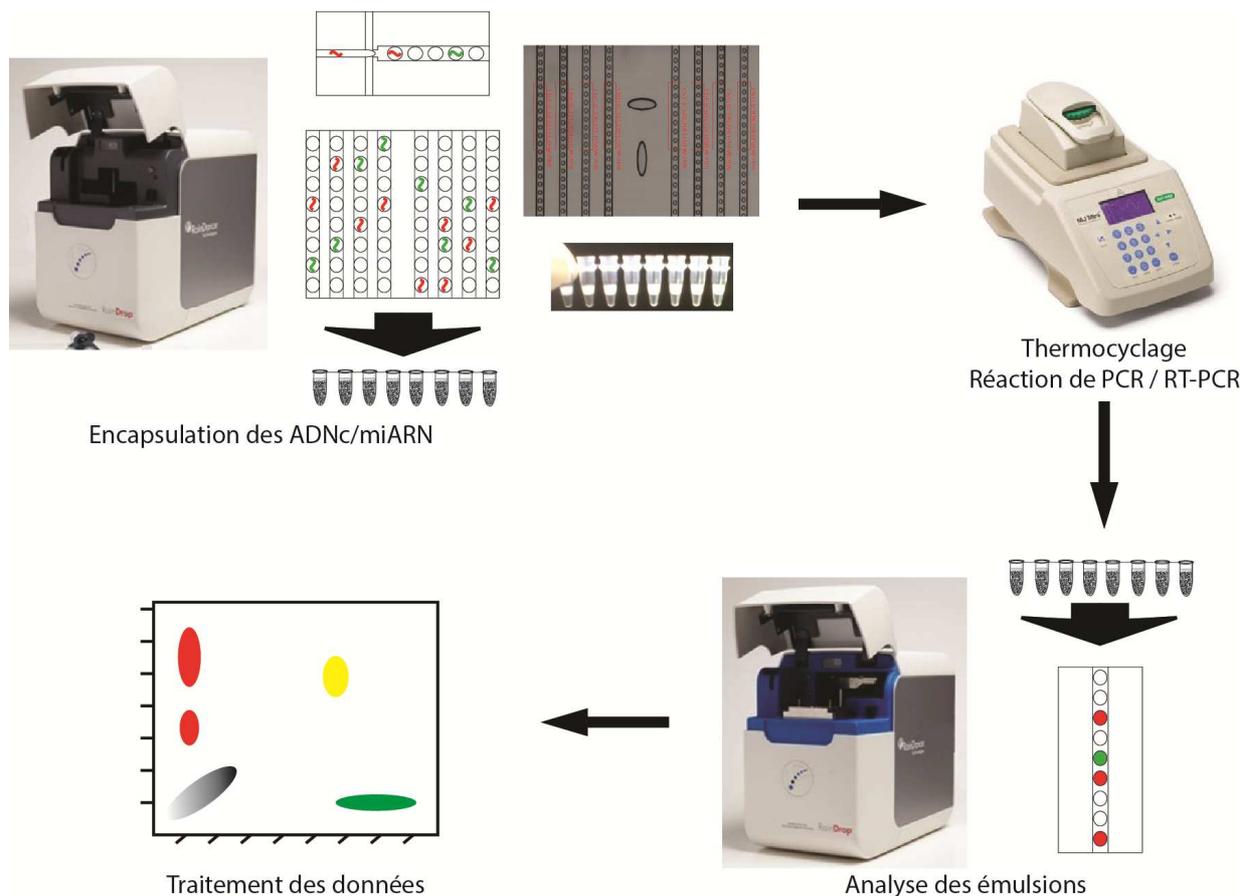


Figure 58 : Méthode de détection de miARN utilisant les stations Raindrop® : à partir du Raindrop® source, 8 microémulsions sont produites simultanément contenant les microARN ou les ADNc ciblés en présence du matériel nécessaire à la réaction de PCR ou de RT-PCR/PCR. Les émulsions sont thermocyclées et introduites dans le Raindrop® sense afin d'être analysées. Les résultats obtenus sont ensuite traités informatiquement.

3. Résultats et discussion

L'objectif de ces travaux était de mettre au point une méthode de détection efficace de miARN provenant d'échantillons biologiques. Une étude initiale, s'est portée sur la détection de différents miARN ciblés (miR-17*, miR-92a et miR-21) ainsi que deux références endogènes (miR-16 et RNU 48) dans un échantillon d'ARN totaux extrait de lignée cellulaire de cancer colorectal HCT 116. Pour cela, deux stratégies de détection des séquences par une réaction de RT-PCR ont été étudiées (**Figure 57**) : (i) une première dans laquelle les réactions de transcription inverse et de PCR sont réalisées séparément (RT-PCR "deux étapes"); (ii) une seconde dans laquelle les réactions de transcription inverse et de PCR sont réalisées dans un même milieu réactionnel (RT-PCR "une étape"). Pour chaque expérience, une étude préliminaire est réalisée en qPCR ou RT-PCR/PCR en microplaque 384 puits en

utilisant différents kits commerciaux à notre disposition, afin de déterminer les concentrations relatives de chaque séquence ciblée dans l'échantillon étudié. Les échantillons d'ARN HCT 116 sont ensuite analysés en multiplex dPCR en gouttelettes ou multiplex RT-PCR/dPCR en gouttelettes à l'aide des stations Raindrop®. Les volumes réactionnels initiaux étant de 25 µL, les décomptes des populations sont systématiquement normalisés sur 5 millions de microgouttelettes (volume des gouttelettes de 5 pL).

Dans le cas des expériences en multiplex, un système de différentes sondes TaqMan®, de fluorescences (6-FAM ou VIC) ou de concentrations différentes, a été mis au point afin de distinguer les populations des différents ARN encapsulés. Ces expériences ont été réalisées en s'inspirant des travaux décrits précédemment pour la détection de mutations (Zhong *et al.* 2011, Didelot *et al.* 2013). Les données obtenues sont analysées et traitées afin de dissocier les différents signaux obtenus en fonction de l'intensité de fluorescence verte (6-FAM, $\lambda_{em} = 522$ nm) et orange (VIC, $\lambda_{em} = 554$ nm), et de dénombrer les microgouttelettes positives (émettant un signal de fluorescence) pour chaque population de séquences ciblées.

3.1. Analyse des échantillons d'ARN HCT 116 en RT-PCR "deux étapes"

Dans cette étude, la réaction de RT-PCR/PCR est réalisée sur les échantillons ARN HCT 116 en deux étapes distinctes, séparant la réaction de transcription inverse et la réaction de détection par PCR. La transcription inverse est réalisée à partir de 6 µg d'ARN totaux en microtube (volume final 50 µL) séparément pour chacun des miARN ciblés (miR-17*, miR-92a et miR-21) ainsi que pour les ARN de référence miR-16 et RNU 48. Afin d'optimiser cette méthode, dans l'intégralité des expériences décrites, les différents multiplex (duplex, triplex ou quadruplex) correspondent à une analyse en dPCR en gouttelettes ou RT-PCR/dPCR en gouttelettes de plusieurs séquences ciblées simultanément, en présence systématique des différentes sondes TaqMan® ciblant les ADNc correspondant aux miARN miR-17*, miR-92a, miR-21 et à la référence RNU 48.

3.1.1. Analyse des échantillons en qPCR

L'ADNc est analysé par qPCR en microplaque 384 puits (25 µL par puits) à partir de 3 µL de produit de transcription inverse dilué au 1/50^e (correspondant à 7,2 ng d'ARN totaux de départ). La quantité relative des différents ARN ciblés est donnée à travers les valeurs de Ct pour les sondes TaqMan® FAM et VIC.

Les valeurs des différents Ct obtenus permettent de fournir une information sur les quantités relatives des différents miARN présent dans notre échantillon en comparaison des séquences ARN de

références. Une étude parallèle de qPCR en l'absence d'ADNc (ntc) a été réalisée et n'a fourni aucune valeur de détection des ARN ciblés. Ces travaux ont permis de confirmer la présence d'une quantité détectable de nos différentes cibles dans notre échantillon (**Figure 59**). Les valeurs de Ct étant relatives, dépendant notamment de l'efficacité des amorces et sondes employées, cette méthode ne fournit qu'une information relative sur la distribution des miARN dans l'échantillon d'ARN HCT 116.

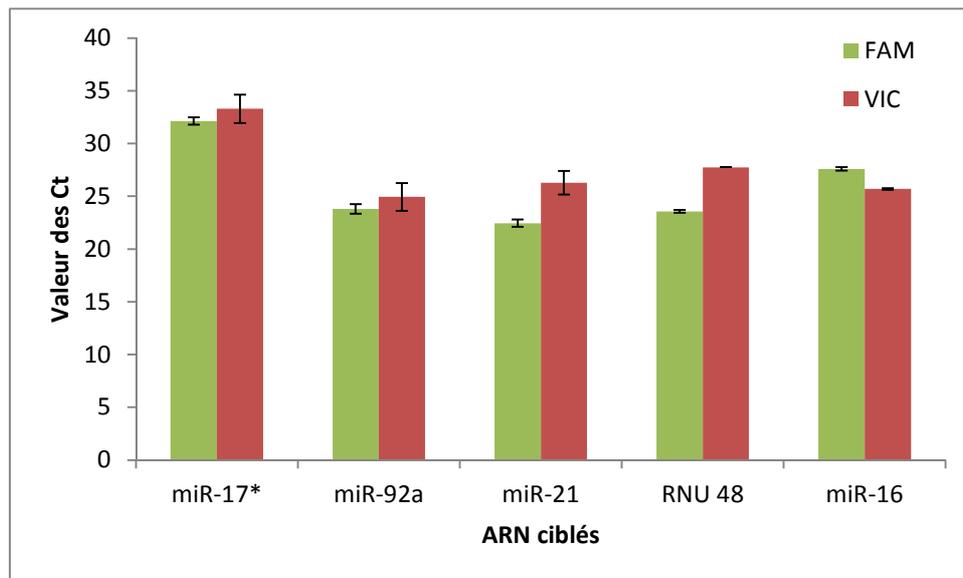


Figure 59 : Valeurs de cycles de seuil comparés des différents ARN ciblés et en RT-qPCR "deux étapes". Chaque expérience est répétée 2 fois, les données présentées correspondent à la moyenne de ces 2 valeurs.

3.1.2. Analyse des échantillons en duplex dPCR en gouttelettes

L'objectif de cette étude a été de démontrer la faisabilité d'une réaction de dPCR en gouttelettes ciblant les différents miARN sélectionnés, et d'évaluer, potentiellement, leur concentration dans cet échantillon. Une première série d'expériences a été réalisée, se focalisant sur la détection d'une cible unique, en présence d'une référence interne (duplex miR-17*/ RNU 48, miR-92a/ RNU 48 ou miR21/ RNU 48).

Les premiers travaux ont porté sur l'étude du miARN miR-17* à travers l'analyse du duplex miR-17*/ RNU 48. Pour cela, une solution contenant le matériel nécessaire à la réaction de PCR, les ADNc (3 µL de produit de transcription inverse spécifique du miR-17*, 3µL de produit de transcription inverse spécifique de RNU 48 dilué au 1/5^e) ainsi qu'un système de différentes sondes TaqMan® est encapsulée (volume total 25 µL) (données fournies dans le Tableau des conditions – **Figure 60**). Le

choix de diminuer la quantité de RNU 48 par rapport à miR-17* est justifié par la différence de Ct obtenue lors de l'étude des ADNc en qPCR. Les résultats obtenus (**Figure 60**) semblent démontrer une quantité importante d'ADNc correspondant à RNU 48 vis-à-vis des ADNc correspondant au miARN mir-17* (1400x supérieur).

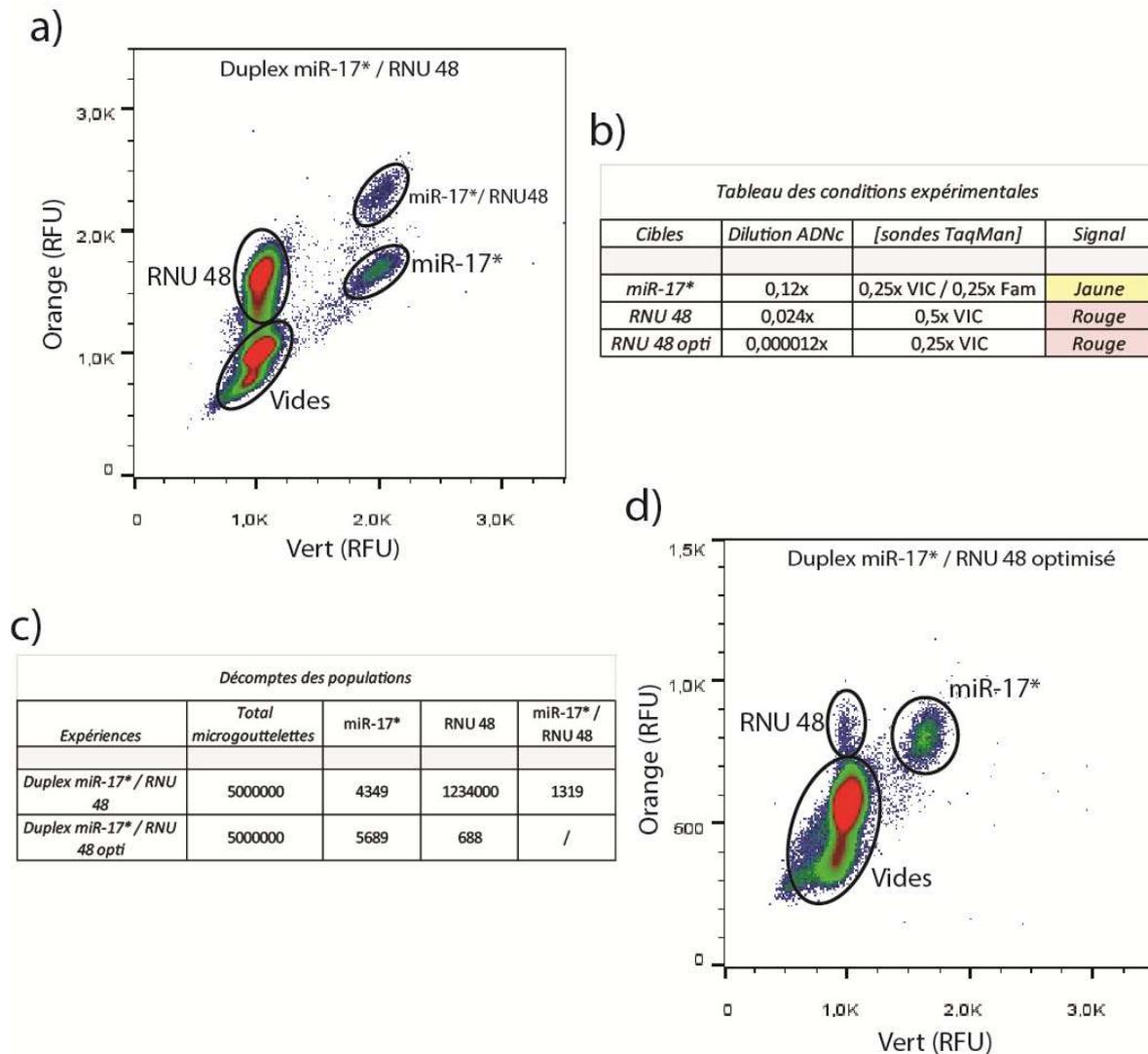


Figure 60 : Etude du microARN miR-17* dans l'échantillon d'ARN HCT 116 par dPCR en gouttelettes : a) et d) analyse de la distribution des populations des ADNc correspondant au microARN miR-17* et à la référence RNU 48 ; b) le tableau des conditions expérimentales informe sur les conditions de concentrations en ADNc et en sondes TaqMan® pour chaque expérience ; c) le décompte des populations, normalisé sur 5 millions de microgouttelettes, informe sur la répartition de chaque population pour les différentes expériences.

Ces résultats correspondent à ceux obtenus en qPCR témoignant d'une faible concentration du miARN miR-17* dans l'échantillon d'ARN HCT 116 étudié. La distribution des ADNc au sein des microgouttelettes étant régit par la loi de Poisson (Vogelstein *et al.* 1999, Pekin *et al.* 2011), on

constate également un certain nombre de co-encapsulation dû au taux d'occupation important des microgouttelettes, se traduisant par la formation d'une population intermédiaire contenant à la fois les ADNc correspondant aux microARN mir-17* et les ADNc correspondant à la référence RNU 48. Afin de limiter ce phénomène de co-encapsulation, nous avons optimisé notre expérience en diminuant la quantité d'ADNc correspondant à RNU 48 (dilution au 1/10000^e contre une dilution au 1/5^e dans l'expérience initiale). La quantité de sondes TaqMan® ciblant l'ADNc correspondant à RNU 48 a également été abaissée (0,25x contre 0,5x dans l'expérience initiale) afin de dissocier cette population de la population d'ADNc correspondant au miARN miR-21 (voir ci-après). On constate une concordance des résultats obtenus dans les deux expériences (≈5600 microgouttelettes contenant miR-17* dans chaque expérience (en prenant en compte les populations de co-encapsulation dans l'expérience non-optimisée) ainsi qu'un rapport 1/2000^e des populations de RNU 48 entre les deux expériences).

Une seconde étude a porté sur l'analyse du duplex miR-92a/ RNU 48. A nouveau, une solution est encapsulée (volume total 25 µL) contenant le matériel nécessaire à la réaction de PCR, le produit des RT (3 µL au 1/5^e de miR-92a, 3µL au 1/5^e de RNU 48) ainsi qu'un système de différentes sondes TaqMan® (données fournies dans le tableau des conditions – **Figure 61**). Les résultats obtenus (**Figure 61**) démontrent à nouveau une quantité plus importante d'ADNc correspondant à RNU 48 vis-à-vis du des ADNc correspondant au miARN mir-92a (15x supérieur). Ces résultats correspondent avec ceux obtenus en qPCR. Comme dans l'expérience précédente, on constate un certain nombre de co-encapsulation dû au taux d'occupation important des microgouttelettes (notamment plus de 50% d'occupation des microgouttelettes par l'ADNc correspondant à RNU 48), se traduisant par la formation d'une population intermédiaire contenant à la fois l'ADNc correspondant au miARN mir-92a et l'ADNc correspondant à la référence RNU 48.

Nous avons optimisé notre expérience en diminuant la quantité du produit de transcription inverse correspondant à RNU 48 (dilution au 1/10000^e) ainsi que la quantité de miR-92 (dilution au 1/50^e).

On constate à nouveau une concordance des résultats obtenus dans les deux expériences pour miR-92a (rapport d'environ 1/10^e des populations de microgouttelettes entre les deux expériences). L'étude comparée des populations de microgouttelettes contenant la référence RNU 48 témoigne de l'intérêt de travailler sur de faibles concentrations d'ADNc de départ. En effet, à trop forte concentration, on observe, en plus de l'apparition de population conjointes d'ADNc, un recouvrement des signaux de populations proches (en l'occurrence les populations de microgouttelettes vides et celles contenant RNU 48) aboutissant à la formation de faux positifs (on observe dans cette expérience une augmentation conséquente de la population mesurée d'ADNc correspondant à RNU 48). Ce phénomène est corrigé dans l'expérience optimisée, puisqu'on observe

à nouveaux une quantité de microgouttelettes occupées correspondant à celle attendue pour RNU 48 au regard de l'étude précédant (duplex miR-17*/ RNU 48).

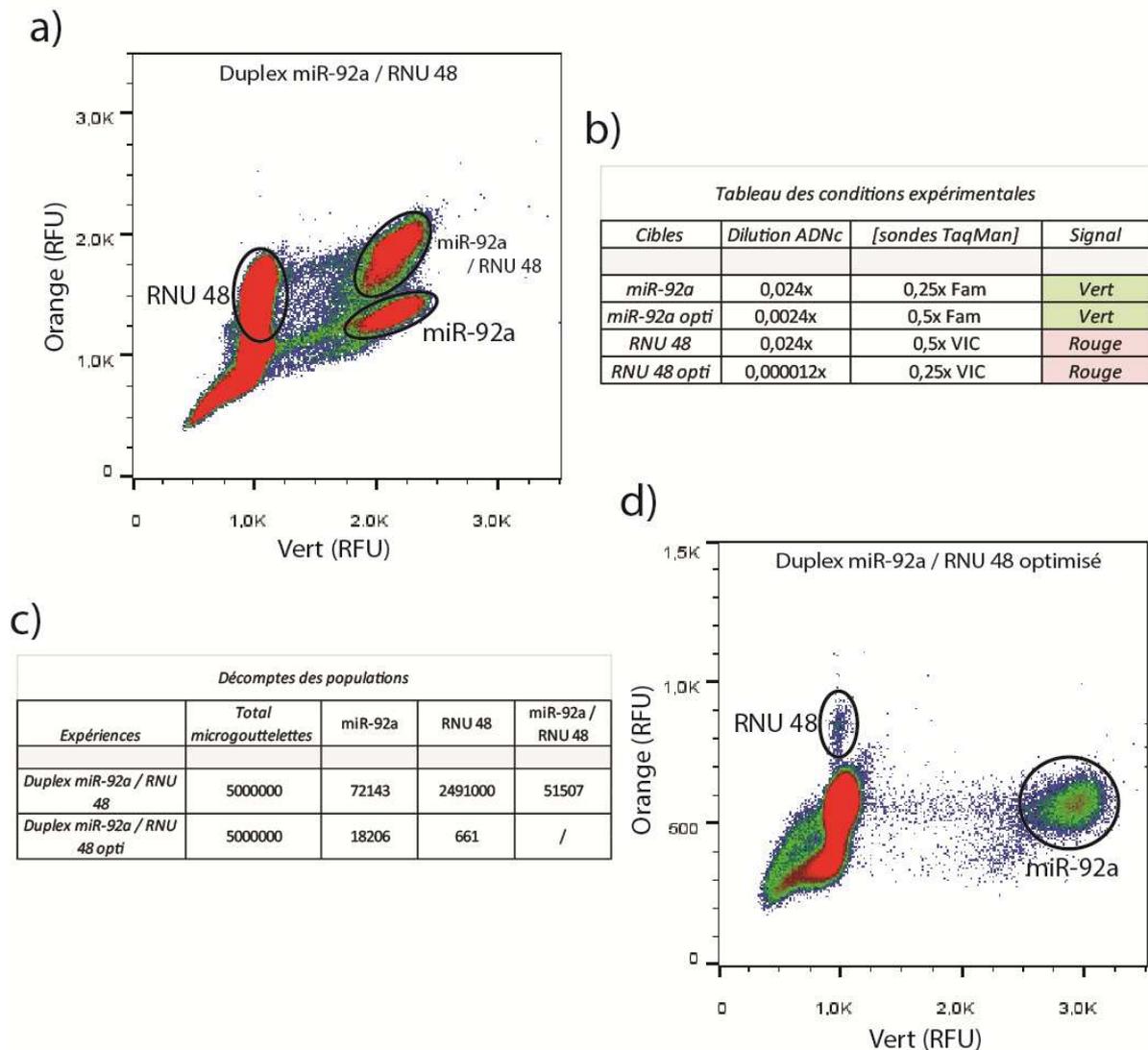


Figure 61 : Etude du microARN miR-92a dans l'échantillon d'ARN HCT 116 par dPCR en gouttelettes : a) et d) analyse de la distribution des populations des ADNc correspondant au microARN miR-92a et à la référence RNU 48 ; b) le tableau des conditions expérimentales informe sur les conditions de concentrations en ADNc et en sondes TaqMan® pour chaque expérience ; c) le décompte des populations, normalisé sur 5 millions de microgouttelettes, informe sur la répartition de chaque population pour les différentes expériences.

Enfin, une troisième étude a porté sur l'analyse du duplex miR-21/ RNU 48. Encore une fois, une solution contenant le matériel nécessaire à la réaction de PCR, le produit des RT (3 μ L au 1/5^e de miR-21, 3 μ L au 1/5^e de RNU 48) ainsi qu'un système de différentes sondes TaqMan® est encapsulée (volume total 25 μ L) (données fournies dans le tableau des conditions – **Figure 62 b**). Les résultats obtenus (**Figure 62 a**) dans l'expérience non-optimisée ne permettent pas de distinguer la référence

RNU 48 et le miARN mir-21, les signaux correspondant étant superposés. On constate néanmoins, de façon inexplicable, un taux d'occupation générale inférieurs aux deux études précédentes (duplex miR-17*/ RNU 48 et duplex miR-92a/ RNU 48), ainsi qu'une double encapsulation des cibles formant une population intermédiaire (**Figure 62 a**).

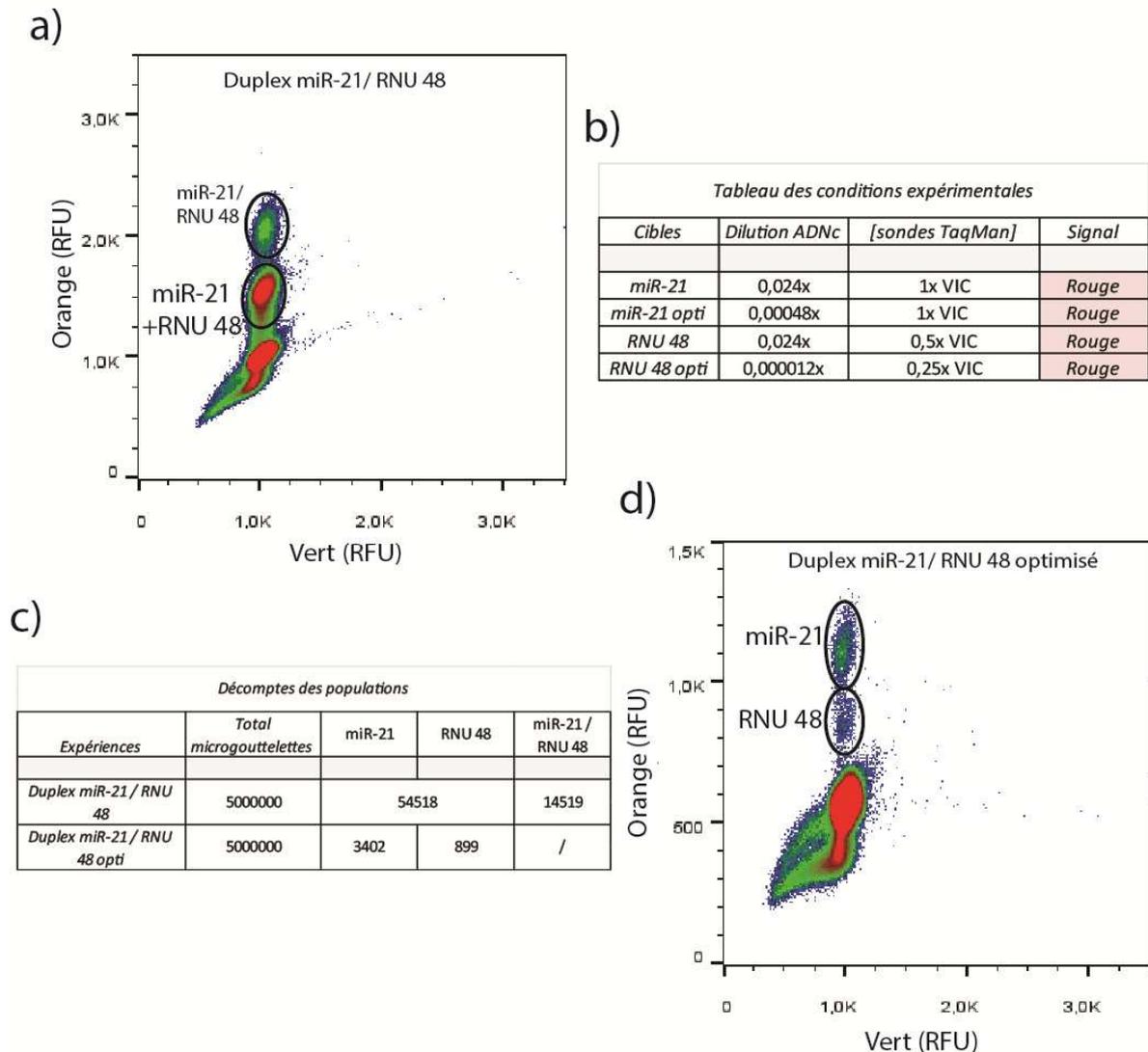


Figure 62 : Etude du microARN miR-21 dans l'échantillon d'ARN HCT 116 par dPCR en gouttelettes : a) et d) analyse de la distribution des populations des ADNc correspondant au microARN miR-21 et à la référence RNU 48 ; b) le tableau des conditions expérimentales informe sur les conditions de concentrations en ADNc et en sondes TaqMan® pour chaque expérience ; c) le décompte des populations, normalisé sur 5 millions de microgouttelettes, informe sur la répartition de chaque population pour les différentes expériences.

Afin de limiter ces phénomènes, nous avons optimisé notre expérience en diminuant la quantité du produit de transcription inverse correspondant à RNU 48 (dilution au 1/10000^e) et miR-21 (dilution au 1/250^e) ainsi qu'en augmentant le rapport des quantités de sonde pour les deux ARN ciblés (de 2x

à 4x plus de sondes TaqMan®-VIC ciblant miR-21) afin de dissocier les deux populations. Les résultats obtenus démontrent, cette fois-ci, une concordance des quantités de RNU 48 présent dans l'échantillon avec les données obtenues précédemment (**Figures 60 c) et 61 c)**).

3.1.3. Analyse des échantillons en triplex dPCR en gouttelettes

L'objectif de cette étude a été de démontrer la faisabilité d'une réaction de dPCR en gouttelettes ciblant simultanément plusieurs microARN, afin d'en évaluer leurs concentrations absolues dans cet échantillon ou un rapport de concentrations relatives.

Pour cela, une série d'expériences a été réalisée, se focalisant sur la détection de plusieurs cibles, en présence d'une référence interne (triplex miR-17*/ mir-92a/ RNU 48, miR-17*/ miR-21/ RNU 48 ou miR92a/ miR-21/ RNU 48) ou en l'absence de référence interne (triplex miR-17*/ mir-92a/ miR-21). Une fois encore, un système de différentes sondes TaqMan®, de fluorescences (6-FAM ou VIC) ou de concentrations différentes, a été établie afin de distinguer les populations des différents ADNc encapsulés lors de ces expériences. Les données obtenues sont analysées et traitées afin de dissocier les différents signaux obtenus en fonction de l'intensité de fluorescence verte (6-FAM, $\lambda_{em} = 522$ nm) et orange (VIC, $\lambda_{em} = 554$ nm), et de dénombrer les microgouttelettes correspondantes à chaque séquence ciblée.

Ces travaux ont porté, dans un premier temps, sur l'étude simultanée de deux miARN ciblés à travers l'analyse des triplex miR-17*/ miR-92a/ RNU 48, miR-17*/ miR-21/ RNU 48 et miR-92a/ miR-21/ RNU48 où la présence systématique de RNU 48 est utilisé comme référence interne à l'échantillon. Pour cela, trois solutions distinctes sont encapsulées (volume total 25 μ L) contenant le matériel nécessaire à la réaction de PCR, le produit des RT (de 0,6 à 3 μ L de chaque cible à des concentrations optimisées) ainsi qu'un système de différentes sondes TaqMan® (données fournies dans le tableau des conditions – **Figure 63**). Les résultats obtenus démontrent une continuité avec les travaux réalisés précédemment sur les différents duplex. Cependant, on constate tout de même une variation dans le décompte des différentes populations avec une augmentation systématique de la quantité de référence RNU 48 (+150%) ainsi qu'une diminution des ADNc correspondant aux microARN miR-17* (-25%), miR-92a (-33%) et miR-21 (-25%). Cette observation est probablement imputable à des biais induit par la présence des différentes amorces de transcriptions inverses qui peuvent diminuer l'efficacité de la réaction de PCR.

Une quatrième expérience a été réalisé parallèlement afin d'étudier nos trois cibles simultanément en l'absence de référence à travers l'analyse d'un triplex miR-17*/ miR-92a et miR-21 (**Figure 64**).

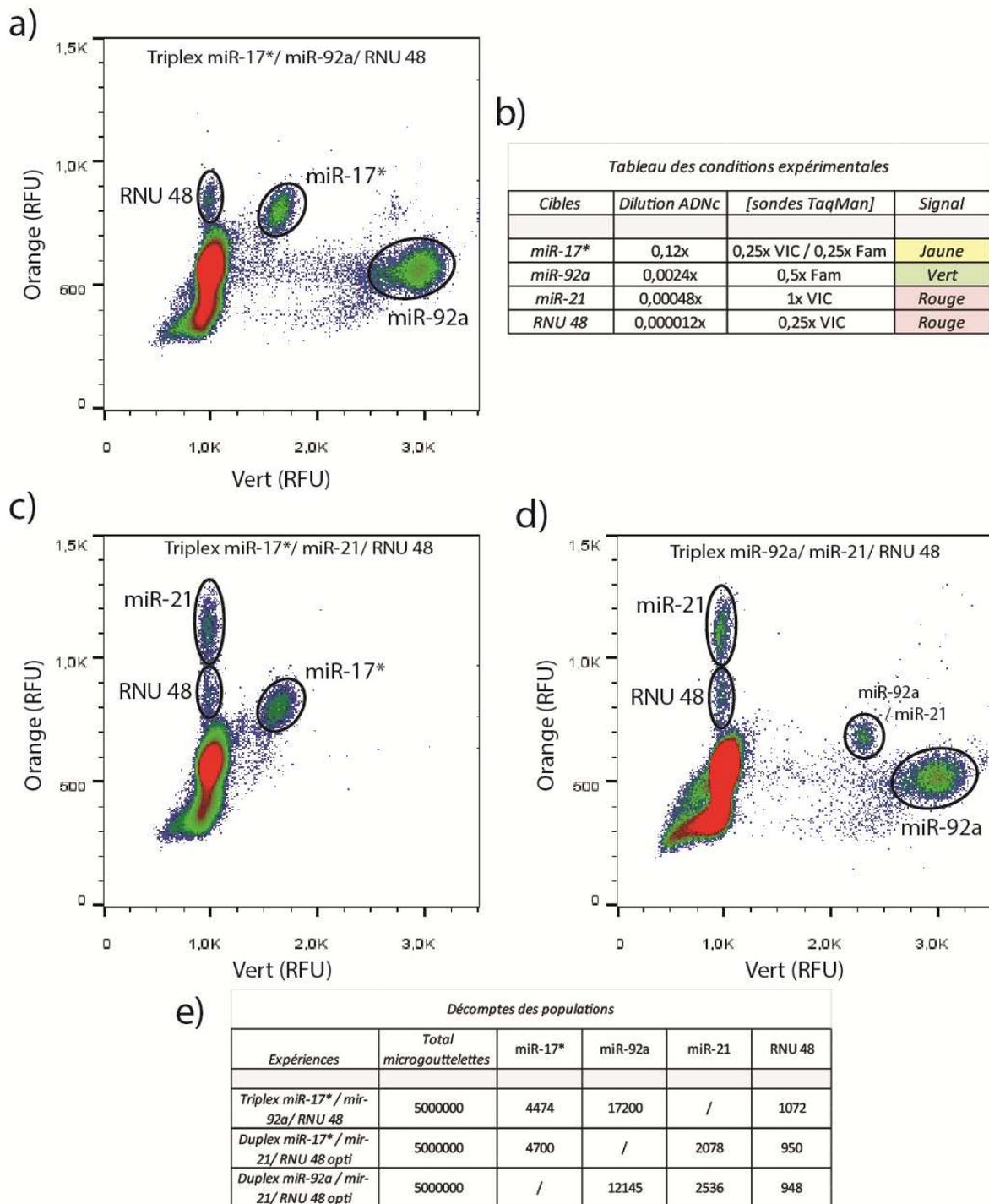


Figure 63 : Etude des microARN miR-17*, miR-92a et miR-21 dans l'échantillon d'ARN HCT 116 par dPCR en gouttelettes : a), c) et d) analyse comparée en triplex de la distribution des populations des ADNc correspondant aux microARN miR-17*, miR-92a et miR-21 en présence d'une référence RNU 48 ; b) le tableau des conditions expérimentales informe sur les conditions de concentrations en ADNc et en sondes TaqMan® pour chaque expérience ; e) le décompte des populations, normalisé sur 5 millions de microgouttelettes, informe sur la répartition de chaque population pour les différentes expériences.

Pour cela, une solution est préparée dans des conditions similaires aux expériences triplex précédentes. Encore une fois on constate une forte similarité dans le décompte des populations des trois cibles avec les expériences en triplex précédentes démontrant une parfaite reproductibilité de notre système.

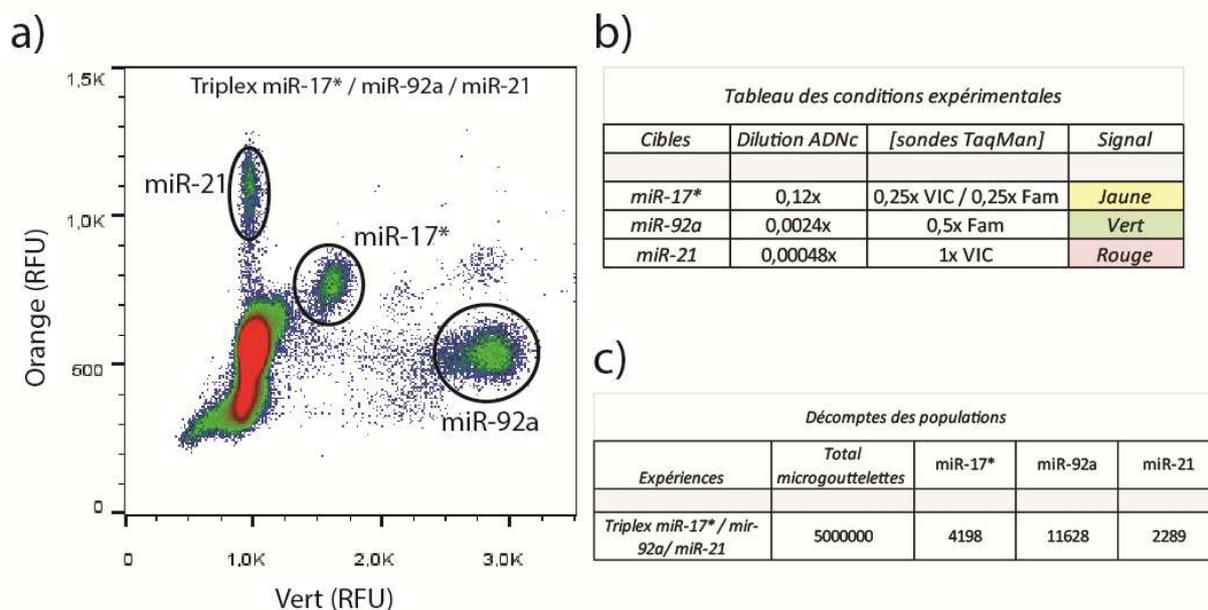


Figure 64 : Etude des microARN miR-17*, miR-92a et miR-21 dans l'échantillon d'ARN HCT 116 par dPCR en gouttelettes :

a) analyse comparée en triplex de la distribution des populations des ADNc correspondant aux microARN miR-17*, miR-92a et miR-21 ; b) le tableau des conditions expérimentales informe sur les conditions de concentrations en ADNc et en sondes TaqMan® pour chaque expérience ; c) le décompte des populations, normalisé sur 5 millions de microgouttelettes, informe sur la répartition de chaque population pour les différentes expériences.

3.1.4. Analyse des échantillons en quadruplex ePCR

Après avoir démontré la faisabilité de notre système pour la détection de trois cibles différentes à travers l'analyse de différents triplex, notre étude s'est portée sur la détection de quatre cibles simultanément dans une même solution. Pour cela, nos expériences ont été réalisées dans le but de détecter nos trois miARN ciblés en présence d'une référence interne à travers l'analyse du quadruplex miR-17*/ miR-92/ miR-21/ RNU 48.

Une première expérience a été réalisée dans des conditions de concentration en produit de transcription inverse optimisées afin de dissocier au mieux les différentes populations obtenues (**Figure 65**). Les résultats obtenus dans les conditions optimisées (les conditions non-optimisées ne sont pas présentées ici) démontrent à nouveau une continuité avec les travaux réalisés

précédemment sur les différents triplex (**Figure 65**). Cependant, on constate à nouveau une diminution des différents ADNc en comparaison des expériences précédentes. Une fois encore, ces variations s'expliquent probablement par des biais induit par la présence des différentes amorces de transcriptions inverses qui peuvent diminuer l'efficacité de la réaction de PCR.

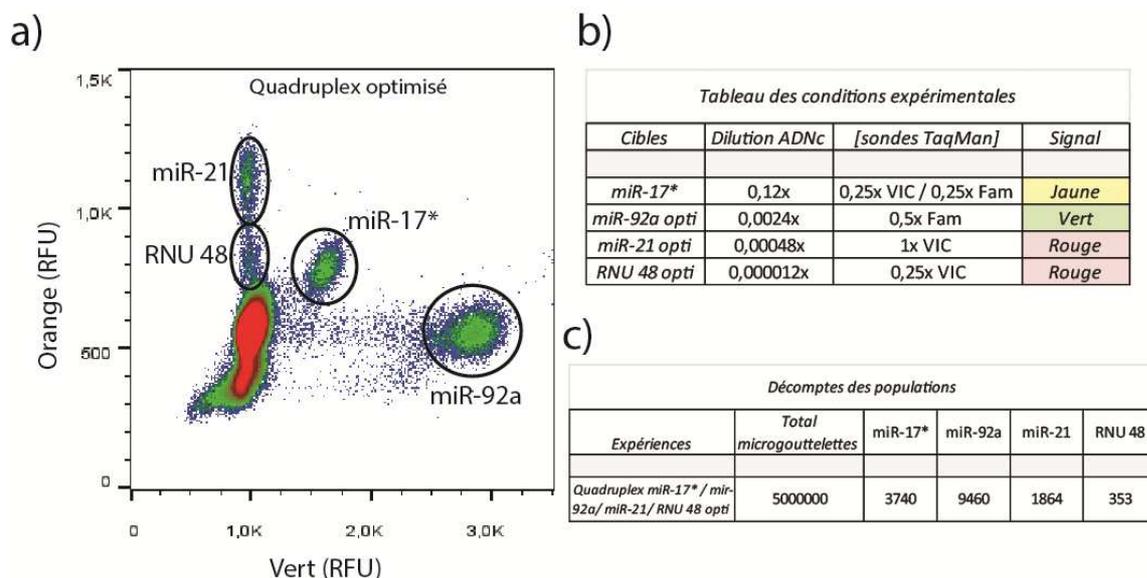


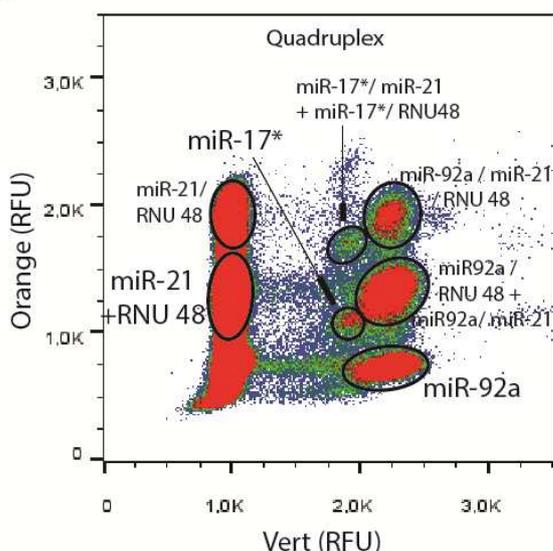
Figure 65 : Etude des microARN miR-17*, miR-92a et miR-21 dans l'échantillon d'ARN HCT 116 par dPCR en microgouttelettes : a) analyse en quadruplex de la distribution des populations des ADNc correspondant aux microARN miR-17*, miR-92a et miR-21 en présence de la référence RNU 48; b) le tableau des conditions expérimentales informe sur les conditions de concentrations en ADNc et en sondes TaqMan® pour chaque expérience ; c) le décompte des populations, normalisé sur 5 millions de microgouttelettes, informe sur la répartition de chaque population de microARN isolé en microgouttelettes pour les différentes expériences.

Une seconde expérience est réalisé à des concentrations identiques en produit de transcription inverse pour chaque ARN analysé (dilutions au 1/5^e pour chaque ARN ciblé à l'exception de miR-17*, non dilué) (**Figure 66**). Cette expérience permet de limiter les biais liés aux différentes dilutions successives des ADNc et de travailler en condition équivalente à l'utilisation d'un produit de RT unique en vue de réaliser une analyse par RT-ePCR "une étape". Les résultats obtenus témoignent d'une conservation des populations de miR-17* (≈ 4000 microgouttelettes occupées au total) et mir-92a (≈ 100000 microgouttelettes) en comparaison des expériences en duplex équivalentes. Cependant, l'utilisation de deux systèmes de sondes TaqMan®-VIC, à de fortes concentrations en ADNc ciblés, ne permet pas de différencier deux populations distinctes (observé pour miR-21 et RNU 48 dans le quadruplex non-optimisé).

Ces différentes expériences ont permis de mettre au point une méthode d'analyse quantitative de dPCR en gouttelettes permettant d'observer des concentrations de miARN de l'ordre du pico-molaire

dans un échantillon d'ARN totaux extraits de lignées cellulaires HCT 116. Cependant les biais apportés par l'efficacité de la réaction de transcriptase inverse pour les différents ARN ciblés apparaissent encore comme une limite à cette technique. Une solution évidente qui pourrait être apportée à ce problème serait d'encapsuler directement les miARN (ou ARN) ciblés avant la réaction de transcription inverse et de réaliser la réaction de RT-PCR/dPCR en gouttelettes en une seule étape.

a)



b)

Tableau des conditions expérimentales			
Cibles	Dilution ADNc	[sondes TaqMan]	Signal
miR-17*	0,12x	0,25x VIC / 0,25x Fam	Jaune
miR-92a	0,024x	0,25x Fam	Vert
miR-21	0,024x	1x VIC	Rouge
RNU 48	0,024x	0,5x VIC	Rouge

c)

Décomptes des populations										
Expériences	Total microgouttelettes	miR-17*	miR-92a	miR-21	RNU 48	miR-17*/miR-21 +	miR-92a/miR-21 /	miR-92a/miR-21	miR-92a / RNU 48	miR-21 / RNU 48
Quadruplex miR-17* / miR-92a / miR-21 / RNU 48	5000000	3578	72345	1965000		2250	12442	61471		375904

Figure 66 : Etude des microARN miR-17*, miR-92a et miR-21 dans l'échantillon d'ARN HCT 116 par dPCR en microgouttelettes (non-optimisé) : a) analyse en quadruplex de la distribution des populations des ADNc correspondant aux microARN miR-17*, miR-92a et miR-21 en présence de la référence RNU 48; b) le tableau des conditions expérimentales informe sur les conditions de concentrations en ADNc et en sondes TaqMan® pour chaque expérience ; c) le décompte des populations, normalisé sur 5 millions de microgouttelettes, informe sur la répartition de chaque population de microARN isolé en microgouttelettes pour les différentes expériences ainsi que les différentes populations de co-encapsulation observées.

3.2. Analyse des échantillons d'ARN HCT 116 en RT-PCR "une étape"

Dans cette étude, la réaction de RT-PCR est réalisée sur les échantillons HCT 116 en une seule étape, intégrant les réactions de transcription inverse et de PCR en une même solution. Pour cela, nous

avons testé trois différents kits commerciaux de RT-PCR "une étape", non-spécifique à l'amplification de petits ARN (kit TaqMan® One-Step RT-PCR, kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR, Qiagen OneStep RT-PCR). Dans l'intégralité des expériences décrites, les différents multiplex (duplex ou triplex) décrivent une analyse en RT-PCR/dPCR en gouttelettes de plusieurs séquences ciblées simultanément, en présence systématique des différentes sondes TaqMan® ciblant les ADNc correspondant au miARN miR-21, et des références miR-16 et RNU 48.

3.2.1. Analyse des échantillons en RT-qPCR

Afin d'évaluer l'efficacité des différents kits de RT-PCR "une étape" à notre disposition, une analyse en RT-qPCR est réalisée en microplaque 384 puits (25 µL par puit) à partir de 1,5 µL de l'échantillon d'ARN HCT 116 (correspondant à 0,54 µg d'ARN totaux).

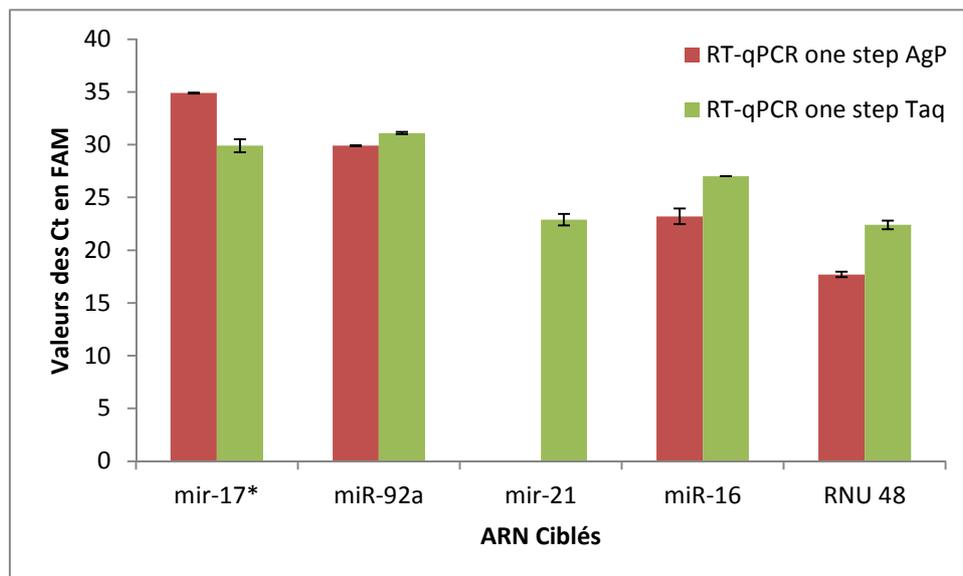


Figure 67 : Valeurs de cycles de seuil comparées des différents ARN ciblés en RT-PCR/qPCR "une étape" : Etude comparée des kits commerciaux AgPath-ID® One-Step RT-PCR (AgP) et TaqMan® One-Step RT-PCR (Taq) en RT-qPCR "une étape" pour les ARN ciblé mir-17*, miR-92a, miR-21, miR-16 et RNU 48.

La quantité relative des différents ARN ciblés est donnée à travers les valeurs de Ct pour les sondes TaqMan®-Fam. Une étude parallèle de RT-qPCR en l'absence d'échantillon HCT 116 (ntc) a été réalisée et n'a fourni aucun signal de détection des ARN ciblés. Les expériences réalisées avec le kit Qiagen n'ont pas permis d'obtenir une amplification des différents ARN ciblés. Ces travaux ont permis de démontrer la potentielle utilisation des kits de RT-PCR "une étape" TaqMan® One-Step RT-PCR et AgPath-ID® One-Step RT-PCR pour l'étude de l'expression de petits ARN. L'étude comparée

des valeurs de Ct obtenues avec la réaction de RT-PCR deux étapes utilisées préalablement permet de démontrer une concordance dans la distribution des différents ARN ciblés dans l'échantillon d'ARN HCT 116 (**Figure 67**). Le kit AgPath-ID® One-Step RT-PCR n'a pas permis de détecter le miARN miR-21.

3.2.2. Analyse des échantillons en RT-dPCR en gouttelettes (kit AgPath-ID® One-Step RT-PCR)

Après les travaux réalisés sur la réaction de RT-dPCR "deux étapes", notre objectif était de démontrer la faisabilité d'une réaction de RT-dPCR "une étape" en microgouttelettes ciblant différents miARN sélectionnés, et d'évaluer, potentiellement, leurs concentrations dans cet échantillon. Pour cela, une première série d'expériences a été réalisée, avec l'utilisation du kit AgPath-ID® One-Step RT-PCR, en se focalisant sur l'étude des miARN mir-21, miR-16 ainsi que sur l'ARN RNU 48 (dont les Ct apparaissent le plus précocement en qPCR). Le choix du kit est justifié par la précocité des Ct observés en comparaison des Ct observés avec l'utilisation du kit TaqMan® One-Step RT-PCR. Les premiers travaux ont porté sur l'étude des duplex miR-21/ miR-16, miR-21/ RNU 48 et miR-16/ RNU 48. Pour cela, une solution est encapsulée (volume total de 25 µL) contenant le matériel nécessaire à la réaction de RT-dPCR en gouttelettes, une quantité définie d'ARN totaux provenant des échantillons d'ARN HCT 116 (80 ng), ainsi qu'un système de différentes sondes TaqMan® (données fournies dans le tableau des conditions – **Figure 68**).

Les résultats obtenus lors de ces différentes expériences démontrent une répartition "étalée" systématique de la distribution en fluorescence au sein de l'émulsion (**Figure 68**). Ces résultats peuvent s'expliquer par une déstabilisation partielle des émulsions entraînant un phénomène de coalescence des microgouttelettes. Dans ce cas, les gouttelettes formées, peuvent émettre un signal de fluorescence intermédiaire à celui des sondes introduites dans le milieu.

La comparaison des trois duplex permet également d'observer les populations correspondant aux différents ARN ciblés. Le nombre des microgouttelettes observé pour chaque population est homogène entre les trois expériences, témoignant d'une bonne reproductibilité de cette stratégie.

L'étude comparée des données obtenues avec les duplex miR-21/ RNU 48 en RT-dPCR "une étape" et "deux étapes" ne démontrent pas de corrélation dans la quantification absolue des différentes populations (avec un rapport calculé 34 000x supérieur pour la réaction "deux étapes"). Cette différence importante peut s'expliquer par l'efficacité de la réaction de transcription inverse. En effet, dans l'expérience réalisée en deux étapes, la population encapsulée lors de la production de l'émulsion correspond aux ADNc produits lors de la réaction de transcription inverse, dont la quantité peut varier en fonction de l'enzyme et des amorces utilisées (Stahlberg *et al.* 2004). Cependant, on

constate néanmoins que le rapport des populations est conservé entre expériences en une et deux étapes (miR-21/RNU 48 = 1/11).

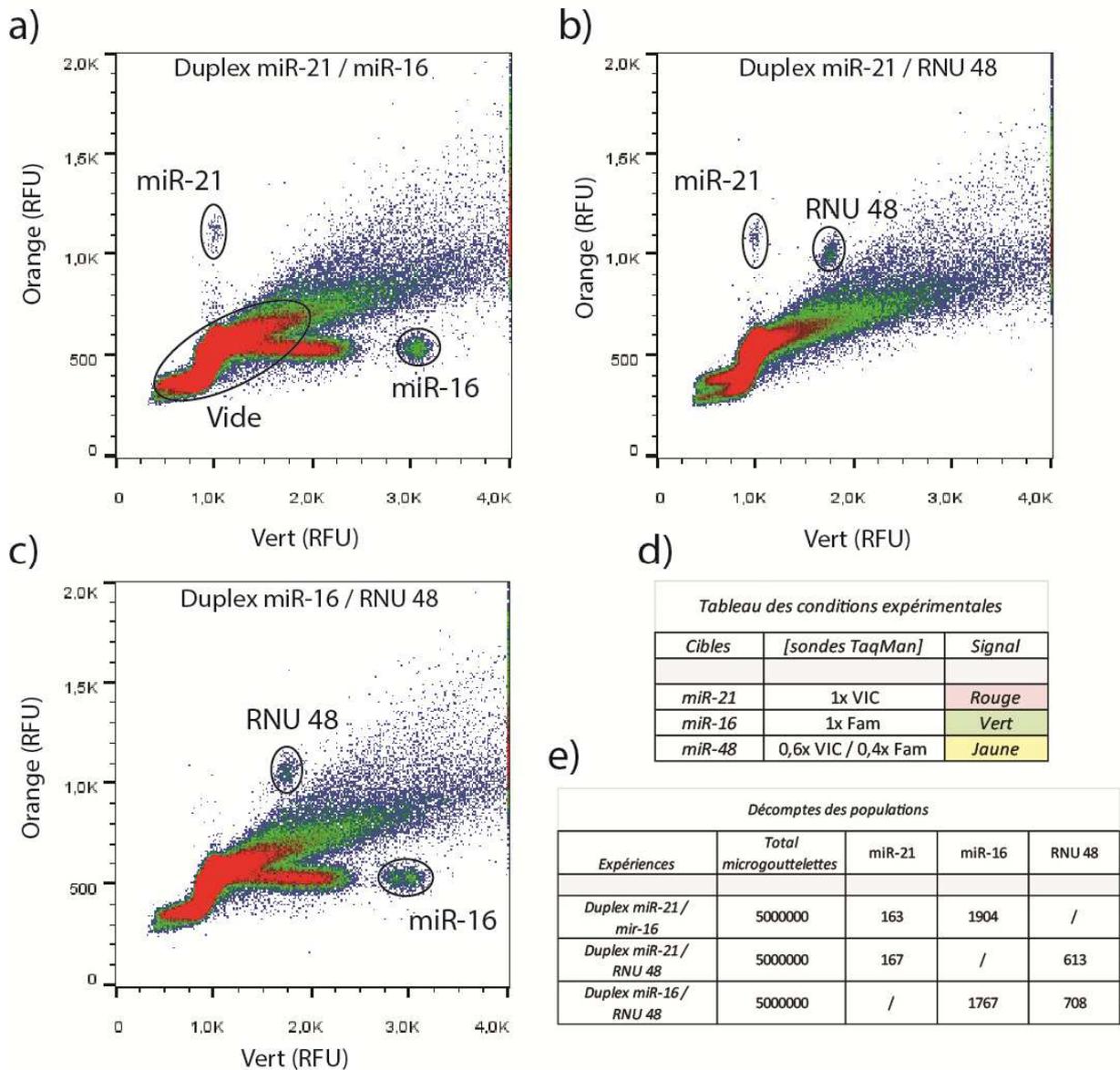


Figure 68 : Etude des miARN miR-21, miR-16 dans l'échantillon d'ARN HCT 116 en duplex par RT-dPCR "une étape" en microgouttelettes (kit AgPath-ID® One-Step RT-PCR):a), b) et c) analyse comparée en duplex de la distribution des populations de microARN miR-21 et miR-16, l'ARN RNU 48 sert de référence dans le milieu ; d) le tableau des conditions expérimentales informe sur les conditions de concentrations en sondes de transcription inverse et en sondes TaqMan® pour chaque expérience ; e) le décompte des populations, normalisé sur 5 millions de microgouttelettes, informe sur la répartition de chaque population pour les différentes expériences.

Une seconde étude a porté sur la détection simultanée de cibles d'ARN multiples à travers la réalisation d'un triplex de RT-dPCR en gouttelettes ciblant les microARN miR-21 et miR-16 ainsi que

la séquence d'ARN RNU 48. Les conditions de cette expérience (rapportées dans le tableau des conditions expérimentales – **Figure 69 b)**) sont identiques aux conditions utilisées précédemment pour les duplex en une étape.

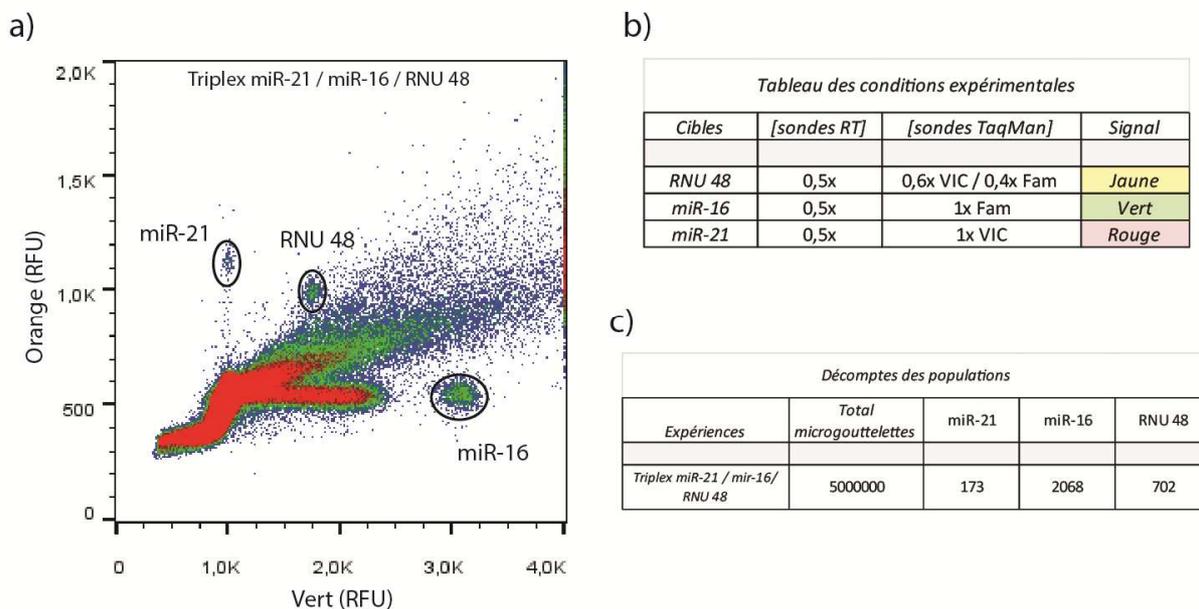


Figure 69 : Etude des miARN miR-21, miR-16 dans l'échantillon d'ARN HCT 116 en triplex par RT-dPCR "une étape" en microgouttelettes (kit AgPath-ID® One-Step RT-PCR): a) analyse en triplex de la distribution des populations de microARN miR-21 et miR-16 L'ARN RNU 48 sert de référence dans le milieu; b) le tableau des conditions expérimentales informe sur les conditions de concentrations en sondes de transcription inverse et en sondes TaqMan® pour chaque expérience ; c) le décompte des populations, normalisé sur 5 millions de microgouttelettes, informe sur la répartition de chaque population pour les différentes expériences.

Les résultats obtenus dans le décompte des populations démontrent une corrélation avec les résultats obtenus en duplex. On constate à nouveau une diminution importante de la quantité d'ARN absolue détecté en comparaison des expériences réalisées en deux étapes. Si l'efficacité de la transcription inverse peut expliquer cette différence, le matériel contenu dans le milieu réactionnel (enzymes, sondes et amorces) peut également engendrer une inhibition de la réaction d'amplification et ainsi introduire un biais dans l'analyse.

Afin d'étudier l'effet du matériel nécessaire à la réaction de RT-PCR ainsi que l'effet des conditions réactionnelles (temps et températures d'incubation et de thermocyclage) sur l'amplification des séquences ciblées et la stabilité des émulsions produites, nous avons réalisé une série d'expériences dans lesquelles nous avons : (i) modifié les conditions réactionnelles de RT-PCR (en utilisant les temps et températures d'incubation et de thermocyclage utilisé lors de la réaction de RT-PCR "deux étapes" – voir en **Annexe**) (**Figure 70 a)**) ; (ii) utilisé le produit de transcription inverse (ADNc – correspondant

à 40 ng d'ARN total initial) obtenu avec lors de la réaction en deux étapes (**Figure 70 d**) dans les mêmes conditions réactionnelles modifiées (cette expérience a été réalisée sans ajout d'amorces de transcription inverse dans le milieu réactionnel (en réalité, le milieu contient tout de même une faible quantité d'amorce de RT utilisée pour la formation d'ADNc – 0,01x après dilution du produit de RT)) . Un contrôle négatif a également été réalisé en l'absence d'ADNc et d'amorces de transcription inverse (**Figure 70 e**).

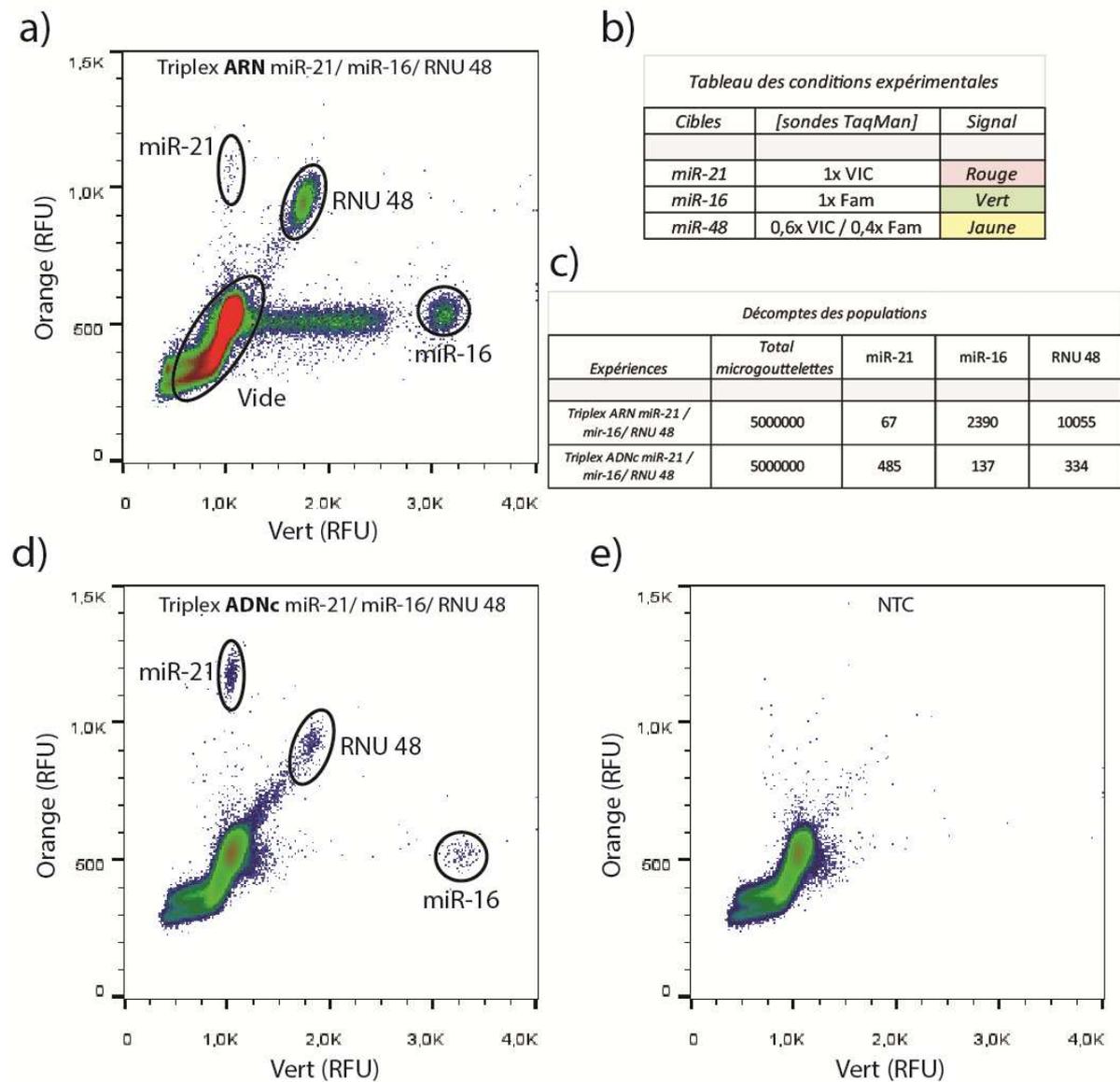


Figure 70 : Etude des microARN et ADNc correspondant aux miR-21 et miR-16 dans l'échantillon d'ARN HCT 116 en triplex par RT-PCR "une étape" en microgouttelettes dans des conditions réactionnelles modifiées: a) analyse en triplex de la distribution des populations de d'ADNc, issue d'une réaction de transcription inverse, et correspondant aux miR-21 et miR-16, l'ADNc correspondant à la séquence d'ARN RNU 48 sert de référence dans le milieu ; d) contrôle négatif en l'absence d'ADNc. ; b) le tableau des conditions expérimentales informe sur les conditions de concentrations en sondes TaqMan® pour chaque expérience ; c) le décompte des populations, normalisé sur 5 millions de microgouttelettes, informe sur la répartition de chaque population pour les différentes expériences.

Les résultats obtenues (**Figure 70 c)**) montrent augmentation de la quantité de miARN ciblé (à l'exception du miARN mir-16) par la simple modification des conditions réactionnelle de l'expérience. Ce constat démontre l'importance de ces conditions pour la sensibilité et l'efficacité des réaction de RT-PCR "une étape". Dans le cas de l'expérience réalisé avec le produit de transcription inverse (ADNc), on observe une diminution inexpliquée plus importante de la quantité de cible détectée en comparaisons des résultats précédent (e.g. le nombre de microgouttelettes représentant le miARN miR-16 diminue d'un facteur 17, de même que celles représentant l'ARN RNU 48 diminue d'un facteur 30), et ceux, même en l'absence d'amorces de transcription inverse. Ce constat peut permettre d'envisager qu'il y a bien une inhibition partielle de la réaction de PCR dans le milieu lors de la réaction de RT-PCR "une étape". Cependant, les amorces utilisées pour la réaction de transcription inverse ne sont pas la cause principale de cette inhibition.

De récents travaux ont étudié comparativement différents kits commerciaux de RT-PCR "une étape", évaluant pour chaque kit l'efficacité de quantification de séquences d'ARN synthétiques (Sanders *et al.* 2013). Cette étude rapporte une différence significative de sensibilité des réactions, variant en fonction des kits utilisés, mais également en fonction de la séquence ciblée. Dans ce contexte, il paraît donc difficile d'obtenir une linéarité de nos résultats par une étude comparative de la méthode de RT-PCR en microgouttelettes avec les différents kits utilisés (une ou deux étapes). Notre objectif reste cependant d'obtenir une sensibilité et reproductibilité optimale pour la détection de miARN spécifiques ainsi qu'une quantification absolue de ces derniers dans les échantillons biologiques analysés.

3.2.3. Analyse des échantillons en RT-PCR en microgouttelettes (kit TaqMan® One-Step RT-PCR)

Afin de déterminer la réaction de RT-PCR "une étape" la plus sensible pour notre méthode, nous avons testé un second kit commercial (kit TaqMan® One-Step RT-PCR) et comparé les résultats avec le kit précédemment utilisé dans des conditions strictement identiques en concentrations d'ARN total initial (80 ng), d'amorces et de sondes.

Les premiers travaux ont, à nouveau, portés sur l'étude des duplex miR-21/ miR-16, miR-21/ RNU 48 et miR-16/ RNU 48. Pour cela, une solution est encapsulée (volume total de 25 µL) contenant le matériel nécessaire à la réaction de RT-PCR, une quantité défini d'ARN totaux provenant des échantillons d'ARN HCT 116, ainsi qu'un système de différentes sondes TaqMan® (données fournies dans le tableau des conditions expérimentales – **Figure 71 d)**).

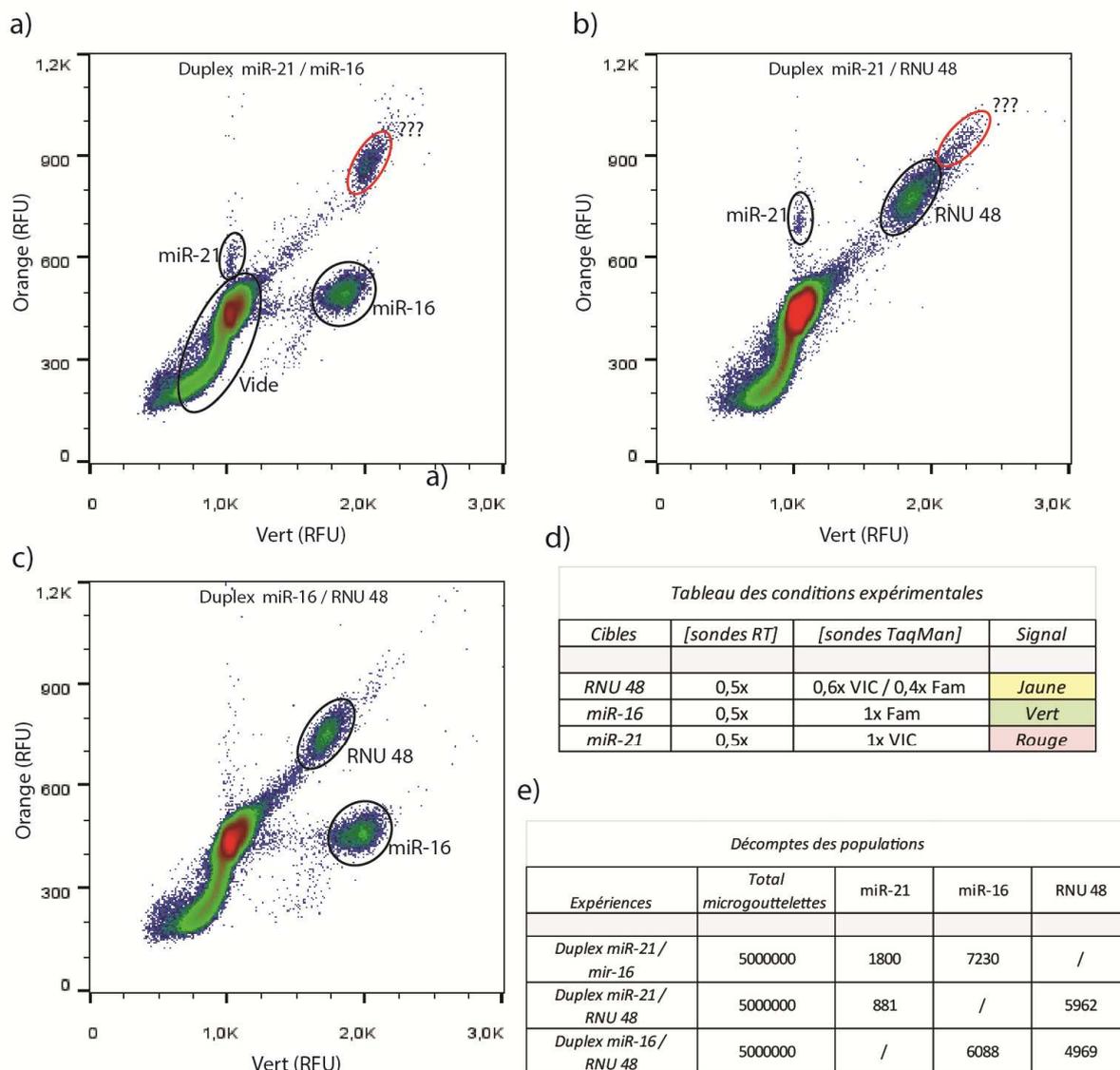


Figure 71 : Etude des microARN miR-21, miR-16 dans l'échantillon d'ARN HCT 116 en duplex par RT-PCR "une étape" en microgouttelettes (kit TaqMan® One-Step RT-PCR): a), b) et c) analyse comparée en duplex de la distribution des populations de microARN miR-21 et miR-16, l'ARN RNU 48 sert de référence dans le milieu ; d) le tableau des conditions expérimentales informe sur les conditions de concentrations en sondes de transcription inverse et en sondes TaqMan® pour chaque expérience ; e) le décompte des populations, normalisé sur 5 millions de microgouttelettes, informe sur la répartition de chaque population pour les différentes expériences.

Les résultats obtenus témoignent d'une meilleure sensibilité de ce système en microfluidique digitale avec une augmentation significative du nombre de cibles détectées pour chaque population (miR-21 – 3x supérieur ; miR-16 – 3x supérieur ; RNU 48 – 8x supérieur). On constate également une meilleure conservation de l'intégrité de l'émulsion avec une répartition bien définie de la fluorescence de chaque population. Cependant, on observe l'apparition d'une population intermédiaire systématique en présence des amorces de transcription inverse du miARN miR-21

(signal "jaune" - **Figure 71 a) et b)**), résultant probablement d'un phénomène de coalescence dans le milieu.

Si l'utilisation de ce kit permet de distinguer totalement les différentes populations de miARN, on constate tout de même une disparité non négligeable dans le décompte des microgouttelettes de chaque population entre les différentes expériences en duplex, notamment pour le miARN mir-21 dont la population est divisée par deux entre les deux expériences. Ces différences peuvent s'expliquer par une intensité de signal trop faible de la population de miR-21 dans le duplex miR21/ miR-16, qui se confond en partie, avec la population de microgouttelettes vides et induit un biais dans le décompte de la population. De même, l'augmentation du nombre de microgouttelettes correspondant à la population de la référence RNU 48 dans le duplex miR-21/ RNU 48 peut s'expliquer par l'apparition d'une population intermédiaire proche en fluorescence qui induit également un biais dans le décompte de la population.

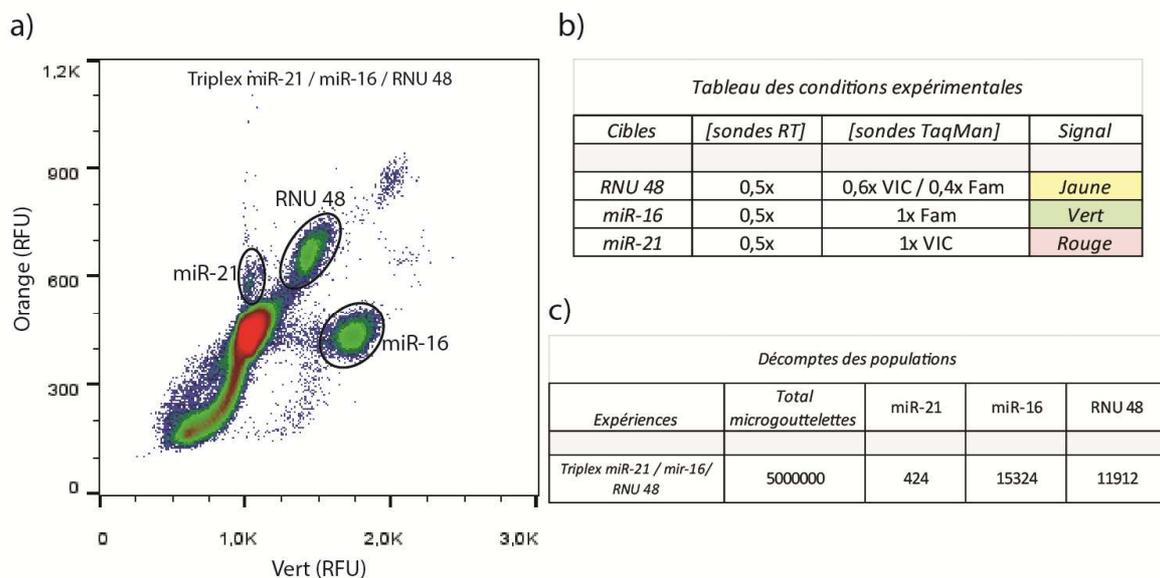


Figure 72 : Etude des microARN miR-21, miR-16 dans l'échantillon d'ARN HCT 116 en triplex par RT-PCR "une étape" en microgouttelettes (kit TaqMan® One-Step RT-PCR): a) analyse en triplex de la distribution des populations de microARN miR-21 et miR-16, l'ARN RNU 48 sert de référence dans le milieu ; b) le tableau des conditions expérimentales informe sur les conditions de concentrations en sondes de transcription inverse et en sondes TaqMan® pour chaque expérience ; c) le décompte des populations, normalisé sur 5 millions de microgouttelettes, informe sur la répartition de chaque population pour les différentes expériences.

Ce phénomène se confirme lors de l'expérience en triplex (**Figure 72**) réalisée dans les mêmes conditions. On observe dans ce cas une diminution de l'intensité de fluorescence des différentes populations correspondantes aux différents miARN ciblés. Cette diminution rend difficile la distinction des différentes populations d'ARN ciblés avec la population de microgouttelettes vides et

peut s'expliquer par une inhibition partielle de la réaction de PCR induite par les amorces de transcription inverse (seul facteur variable entre les différentes expériences). On constate ainsi une diminution de la quantité du miARN miR-21 et une augmentation de la quantité de miR-16 et RNU 48.

4. Conclusion

A travers ces différents travaux, nous avons pu mettre au point une méthode de détection de miARN, extraits de lignées cellulaires tumorales de cancer colorectal HCT 116, à travers deux stratégies de réaction de RT-dPCR en microgouttelettes. Pour cela, nous avons ciblé les miARN miR17*, miR-92a, miR-21 et miR-16 ainsi que le petit ARN RNU 48, servant de référence dans le milieu. Une première stratégie a consisté à réaliser une réaction de transcription inverse hors émulsion en microtube, séparément pour chaque miARN ciblé, puis d'analyser simultanément le produit de ces réactions en dPCR en microgouttelettes à travers différents multiplex (duplex, triplex et quadruplex). L'étude comparée des résultats obtenus en dPCR en microgouttelettes avec une étude des mêmes produits de transcription inverse en qPCR en microplaque démontre une cohérence dans la répartition des différents ARN ciblés au sein de l'échantillon. La comparaison des différentes expériences en duplex démontre une bonne reproductibilité du système. Cependant, si le rapport des différentes populations d'ADNc ciblés reste constant, on constate tout de même une diminution de la quantité absolue d'ADNc dans les expériences en triplex et en quadruplex, témoignant de l'influence du milieu réactionnel sur la sensibilité de cette méthode.

Une seconde stratégie a consisté à réaliser une analyse directe d'un échantillon d'ARN totaux (extrait de lignée cellulaire HCT 116) par une réaction de RT-dPCR "une étape" en microgouttelettes à travers l'étude de différents multiplex (duplex et triplex). Pour cela, différents kits de RT-PCR "une étape" commerciaux ont été testés afin d'obtenir une méthode de détection de miARN sensible et reproductible. Les résultats obtenus démontrent une disparité importante de l'efficacité des différents kits utilisés, ainsi qu'une déstabilisation partielle de l'émulsion provoquant des phénomènes de coalescence. On observe également une influence importante du milieu réactionnel (amorces et sondes) sur l'efficacité de cette méthode. Se basant sur ces résultats préliminaires, différents travaux sont aujourd'hui en cours afin d'optimiser cette méthode en variant les concentrations des différents réactifs ainsi que les différents cycles de température imputables aux réactions de transcription inverse et de PCR.

Depuis le début de ces travaux, différentes équipes de recherche ont mis en évidence l'intérêt de la microfluidique digitale pour la détection et la quantification de miARN (par une réaction de RT-PCR

"deux étapes") issues d'échantillons biologiques à travers l'utilisation de différentes plateformes commerciales de microfluidiques digitales (Raindrop®, Raindance Technologies ; Droplet Digital™ PCR System, Bio-Rad) (Takahashi *et al.* 2014). Notre objectif est, à ce jour, tourné vers la validation de cette méthode pour la détection, de manière reproductible et hautement sensible, de miARN spécifiques issue d'échantillons plasmatiques.

Conclusions et perspectives

L'objectif de cette thèse était de développer de nouvelles méthodes de détection de biomarqueurs spécifiques, simplifiées et reproductibles, par l'utilisation de la microfluidique digitale. Pour cela, nos travaux se sont orientés vers trois objectifs principaux : (i) le développement d'une nouvelle gamme de tensioactifs fluorés alternatifs, simples à synthétiser et compatibles avec les réactions biologiques, permettant une stabilité des émulsions adaptée à nos applications (notamment la réalisation de réaction de dPCR en gouttelettes) ; (ii) le développement de sondes alternatives à l'utilisation des sondes TaqMan[®], afin d'obtenir une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité pour la détection de séquence spécifique d'ADN ou d'ARN ; (iii) le développement d'une stratégie de détection efficace et reproductible de biomarqueurs spécifiques, plus particulièrement de microARN, par l'utilisation d'une plateforme microfluidique commerciale (Raindrop[®], Raindance Technologie). Enfin, une étude a été réalisée en parallèle afin de développer un module microfluidique pour la réalisation et l'analyse d'une réaction de dPCR en gouttelettes sur une puce unique (résultats fournis en annexes).

Le premier objectif de cette thèse était donc de réaliser une nouvelle gamme de tensioactifs fluorés compatibles avec nos applications en microfluidique digitale. Pour cela, ces composés devaient répondre à différents critères d'intérêt : (i) permettre une stabilité suffisante des émulsions produites vis-à-vis de contraintes induites par leur manipulation (collecte et réinjection), ou leur exposition à des variations de températures (incubation, thermocyclage) et de pression (incubation dans une ligne de délai par exemple) ; (ii) être compatible avec des réactions biologiques (dont la survie cellulaire ainsi que des réactions enzymatiques (PCR)) ; (iii) limiter la diffusion et la fuite de composés encapsulés à travers la phase continue et entre les microgouttelettes.

Pour cela, nous avons synthétisé une gamme de tensioactifs fluorés (Kry-jeffa) basée sur le couplage d'un polyéther perfluoré (Krytox[®]) avec une série de polypropylène glycol (Jeffamine[®]) de longueurs et de structures variables. Les différents tensioactifs produits ont été étudiés pour leurs apports en stabilité aux émulsions, leurs biocompatibilités et leurs incidences sur l'échange de composés entre microgouttelettes à travers différentes expériences mimant des applications concrètes en microfluidique digitale.

Cette étude a permis de développer, par une méthode de synthèse simple, et de valider l'intérêt de deux nouveaux tensioactifs fluorés (Kry-jeffa₉₀₀ et Kry-jeffa₁₀₀₀), particulièrement adaptés à nos différentes applications (notamment la réalisation de réaction de dPCR en gouttelettes). De plus, ces

différents travaux ont permis de mettre au point, par l'usage de la microfluidique digitale, une méthode d'analyse et de caractérisation de nouveaux tensioactifs.

A ce jour, le nombre important de composés polymères hydrophiles commerciaux ou synthétiques potentiellement associable aux molécules de Krytox® offre de nombreuses perspectives. De plus, la stratégie de synthèse mise en place lors de ces travaux permet, potentiellement, l'addition successive de composés de différentes natures sur une molécule de Krytox® servant de support, et offre une importante possibilité de combinaisons. Différents travaux sont aujourd'hui à l'étude afin de réaliser des tensioactifs alternatifs pour différentes applications. Une de ces applications consiste notamment à synthétiser des tensioactifs fluorescents afin d'observer plus précisément les phénomènes de diffusions de ces composés aux interfaces lors de la production et de l'écoulement des émulsions dans les canaux microfluidiques.

Un second objectif de cette thèse était de développer des sondes alternatives à l'utilisation des sondes TaqMan®, conventionnellement utilisées pour les réactions de PCR en temps réel. L'intérêt de ces travaux était d'obtenir des sondes possédant une meilleure sensibilité ainsi qu'une meilleure spécificité pour la détection de séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN.

Pour cela, nos travaux se sont orientés vers l'utilisation de sondes utilisant une réaction fluorogénique induite par hybridation nucléotidique. Notre stratégie consistait en la synthèse de deux systèmes de sondes, présentant un substrat fluorogénique associé à une séquence spécifique de PNA, utilisant : (i) pour le premier, une réaction fluorogénique dans laquelle deux précurseurs vont aboutir à la formation d'une molécule de Cyanine (Cy3) ; (ii) pour le second, la restauration d'un signal de fluorescence, dans lequel une molécule de Coumarine 334 va être réactivée par une réaction d'addition de Michael. Ces différentes sondes ont ensuite été étudiées pour leurs sensibilités et leurs spécificités d'appariement, dans la détection de différents miARN (miR-17*, miR-92 et miR-132) ainsi que pour la détection de l'allèle muté de gènes de l'EGFR (p.T790M), en solution, puis intégrées à l'outil microfluidique.

Le premier système étudié, basé sur l'utilisation de précurseurs de Cyanine, a démontré une faible sensibilité, mais une bonne spécificité de séquence permettant leur potentielle utilisation pour la détection de biomarqueurs spécifiques (miARN) en présence de compétiteurs biologiques. Cependant la nécessité de chauffer le milieu à 95°C (diminuant leur spécificité) ainsi que leur sensibilité limite leur utilisation pour la détection de séquences rares. Le second système étudié, basé sur l'utilisation d'une Coumarine "désactivée", offre de bien meilleurs résultats en sensibilité ainsi qu'une meilleure spécificité d'appariement, due notamment aux conditions d'utilisations plus douces (réaction à température ambiante ou incubation à 37°C). De plus, les travaux réalisés en microfluidique digitale ont démontré une bonne intégration de ces systèmes, avec une augmentation

de la spécificité de ces sondes. Cependant, la sensibilité ne permet pas la détection de molécules uniques en émulsion avec les techniques d'analyse utilisées dans cette étude (système optique), impliquant la nécessité d'amplifier la séquence étudiée par une réaction de PCR préalable. Différents travaux sont aujourd'hui en cours afin d'étudier l'intégration de ces sondes à une réaction de PCR en temps réel. D'autres perspectives, visant l'utilisation de fluorophores possédant un rendement quantique plus élevé (boîtes quantiques) sont également envisagées à ce jour.

Enfin, le troisième objectif de cette thèse était, à travers une collaboration avec l'entreprise RainDance Technologies, de développer une stratégie de détection efficace et reproductible de microARN, par l'utilisation d'une plateforme microfluidique commerciale (Raindrop®, Raindance Technologie).

Pour cela, nous avons ciblé différents miARN (miR17*, miR-92a et miR-21) dont la surexpression a été rapportée dans le cas de cancers colorectaux, ainsi que le miARN miR-16 et le petit ARN RNU 48, servant de référence dans le milieu. Deux stratégies ont été étudiées, impliquant chacune une amplification de la séquence ciblée par une réaction de RT-PCR utilisant des amorces "stem-loop" pour la transcription inverse ainsi que des sondes TaqMan® pour l'étude quantitative de la réaction : (i) une première stratégie consistait à réaliser une étude en multiplex des différents miARN ciblés par une réaction de RT-PCR "deux étapes" dans laquelle la réaction de transcription inverse est réalisée séparément de la réaction de PCR ; (ii) une seconde stratégie consistait à réaliser une étude en multiplex des différents miARN ciblés par une réaction de RT-PCR "une étape" ("one step") dans laquelle les réactions de transcription inverse et de PCR sont réalisées dans une solution unique. Pour cette seconde stratégie, différents kits commerciaux ont été utilisés afin d'établir la méthode la plus efficace et reproductible de détection de miARN par l'utilisation de la microfluidique digitale.

Les résultats obtenus démontrent la faisabilité de ce système pour la détection de miARN dans des échantillons biologiques. Cependant l'utilisation de kit de RT-PCR "une étape" nécessite encore à ce jour une optimisation des conditions réactionnelles (optimisations des temps et températures d'incubation et de thermocyclage) qui influence considérablement la sensibilité de cette méthode de même que la stabilité des émulsions produites.

L'objectif premier de ces travaux était d'obtenir une méthode de quantification de miARN provenant d'échantillons biologiques obtenue de manière non-invasive ou peu invasive (par détection dans le plasma, le sérum ou encore des échantillons fécaux). Pour cela, parallèlement à l'optimisation de cette méthode, différents travaux sont également en cours afin d'identifier la meilleure stratégie d'extraction de miARN provenant d'échantillons de plasma sanguin par l'utilisation de différents kits commerciaux (extractions d'ARN totaux, extraction spécifique de miARN et extraction de miARN exosomaux).

En conclusion, le travail réalisé durant ces quatre années de thèse a permis de mettre au point une nouvelle gamme de tensioactifs utilisables pour l'étude d'échantillons biologiques ainsi que des méthodes permettant d'en évaluer les propriétés pour la réalisation d'expériences de microfluidique digitale. Nous avons également mis au point de nouvelles sondes fluorescentes permettant la reconnaissance et la détection de biomarqueurs spécifiques. D'autres expériences ont permis de développer une méthode efficace de quantification de microARN au sein d'un échantillon clinique. Enfin, les derniers travaux ont permis le développement de nouvelles stratégies pour la réalisation d'incubation ou de réaction de PCR "on-chip".

Les différents travaux de cette thèse ont été réalisés, pour les deux premières années, au sein du laboratoire du professeur Andrew Griffiths (UMR 7006, ISIS, Strasbourg), puis en collaboration entre le laboratoire du Professeur Pierre Laurent-Puig, sous l'encadrement du Docteur Valérie Taly (UMR-S1147, Université Paris V, Paris) pour la réalisation de tests en systèmes microfluidiques, ainsi que l'application aux essais cliniques, et les laboratoires du Docteur Alexandre Specht (Co-directeur de thèse, Faculté de Pharmacie, Illkirch) et du Docteur Sylvain Ladame (Imperial College, Londres) pour la synthèse de nouvelles sondes PNAs.

Annexes

Annexe 1 : Micro-fabrication des puces en PDMS

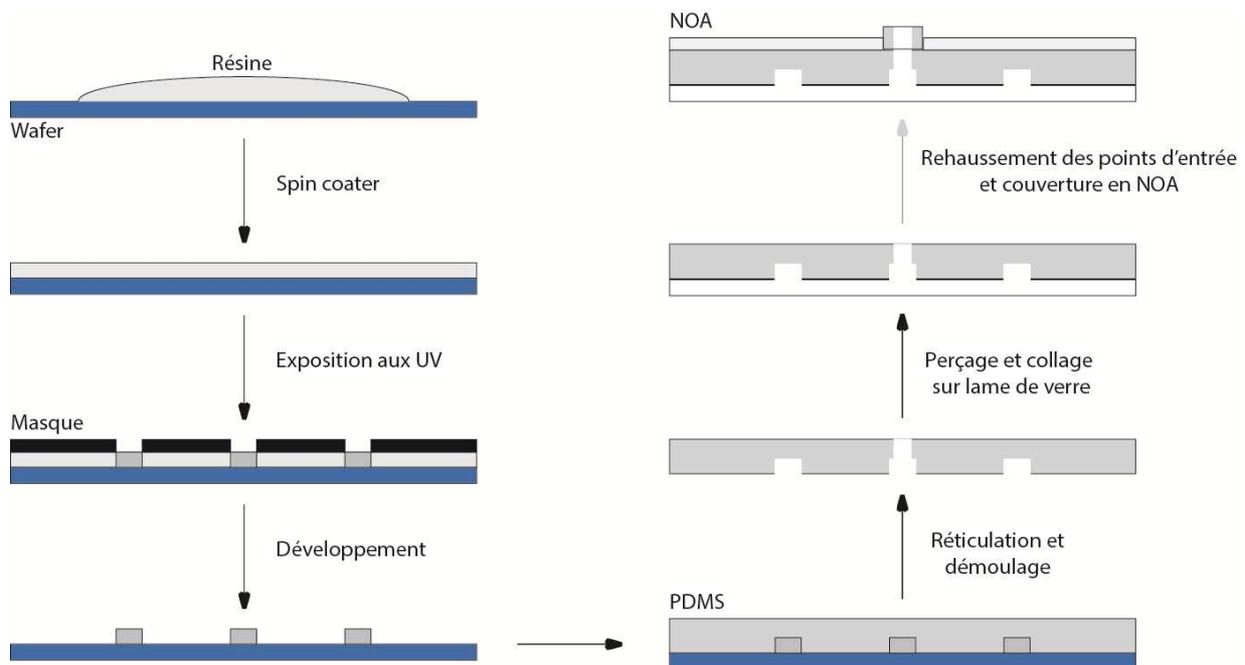


Figure 73 : Méthode de conception de puce microfluidique en PDMS par un procédé de lithographie douce : Les puces en matière polymère PDMS sont fabriquées par impression d'un module microfluidique en utilisant les procédés classiques de lithographie douce. Ce procédé se décompose typiquement en trois étapes principales : (i) la fabrication d'un moule en résine photosensible (SU-8) sur un support régulier en silicium (Wafer). Pour cela, une résine photosensible, possédant une viscosité prédéfinie, est déposée sur disque régulier de silicium (wafer). Le wafer est ensuite déposé sur un spin-coater (WS400-6NPP-LITE, Laurell Tech. Corp.) afin d'uniformiser l'étalement de la résine. Cette étape définit l'épaisseur de résine sur le wafer et donc la hauteur des futurs canaux microfluidiques. Le wafer est ensuite exposé à un rayonnement UV (Mask Aligner MJB3 / MJB4, Süss MicroTech) à travers un masque de photolithographie, puis nettoyé à l'aide d'un solvant développeur (SU-8 developer) afin de révéler la structure imprimée ; (ii) le moulage de la structure sur une puce en PDMS. Pour cela, un mélange 9:1 (m/m) de PDMS et d'agent réticulant préalablement dégazé sont déposés sur le moule en wafer avant d'être cuits à 65°C au minimum 2h. Une fois réticulé, le PDMS est démoulé de son support avant d'être percé à l'aide d'une pince à biopsie ($\varnothing = 0,75$ mm) aux points d'entrée et de sortie des différents liquides ; (iii) le collage de la puce sur une lame de verre. Pour cela, la puce en PDMS ainsi qu'une lame de verre d'1 mm d'épaisseur sont exposés au plasma à O₂ (Plasma system FEMTO, Diener Electronic) puis collées l'une à l'autre pour obtenir la puce finale. L'introduction d'une résistance dans la puce nécessite l'utilisation de lames de verre d'une couche d'oxyde d'indium et d'étain conductrice (ITO).

Annexe 2 : Micro-fabrication des puces en PDMS "double-couche"

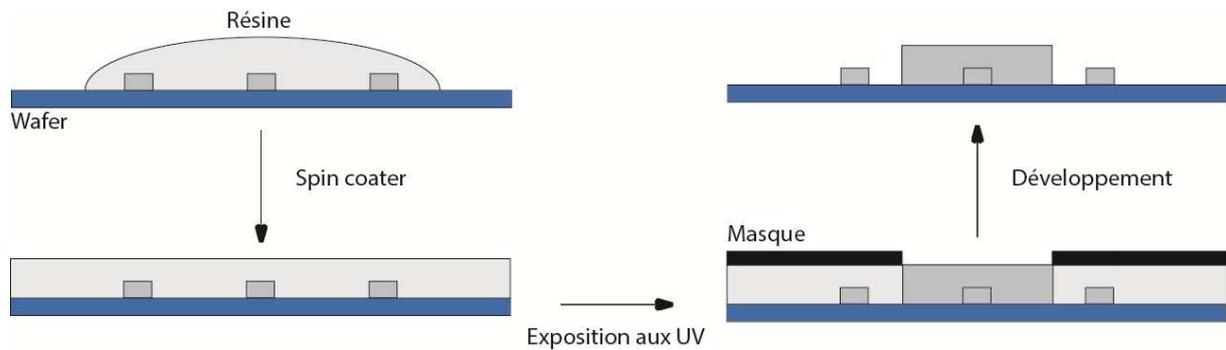


Figure 74 : Méthode de conception de puce microfluidique "double-couche" en PDMS par un procédé de lithographie douce : la fabrication de puces en PDMS "double-couche" suit le même procédé de lithographie douce (*Annexe 1*) mais nécessite un second dépôt de résine et une répétition de l'étape (i) lors de la fabrication du moule. Cette technique permet d'obtenir un réseau de canaux superposés ainsi qu'une variation contrôlée de la hauteur des canaux au sein de la puce microfluidique.

Annexe 3 : Module microfluidique avec chambre de coalescence

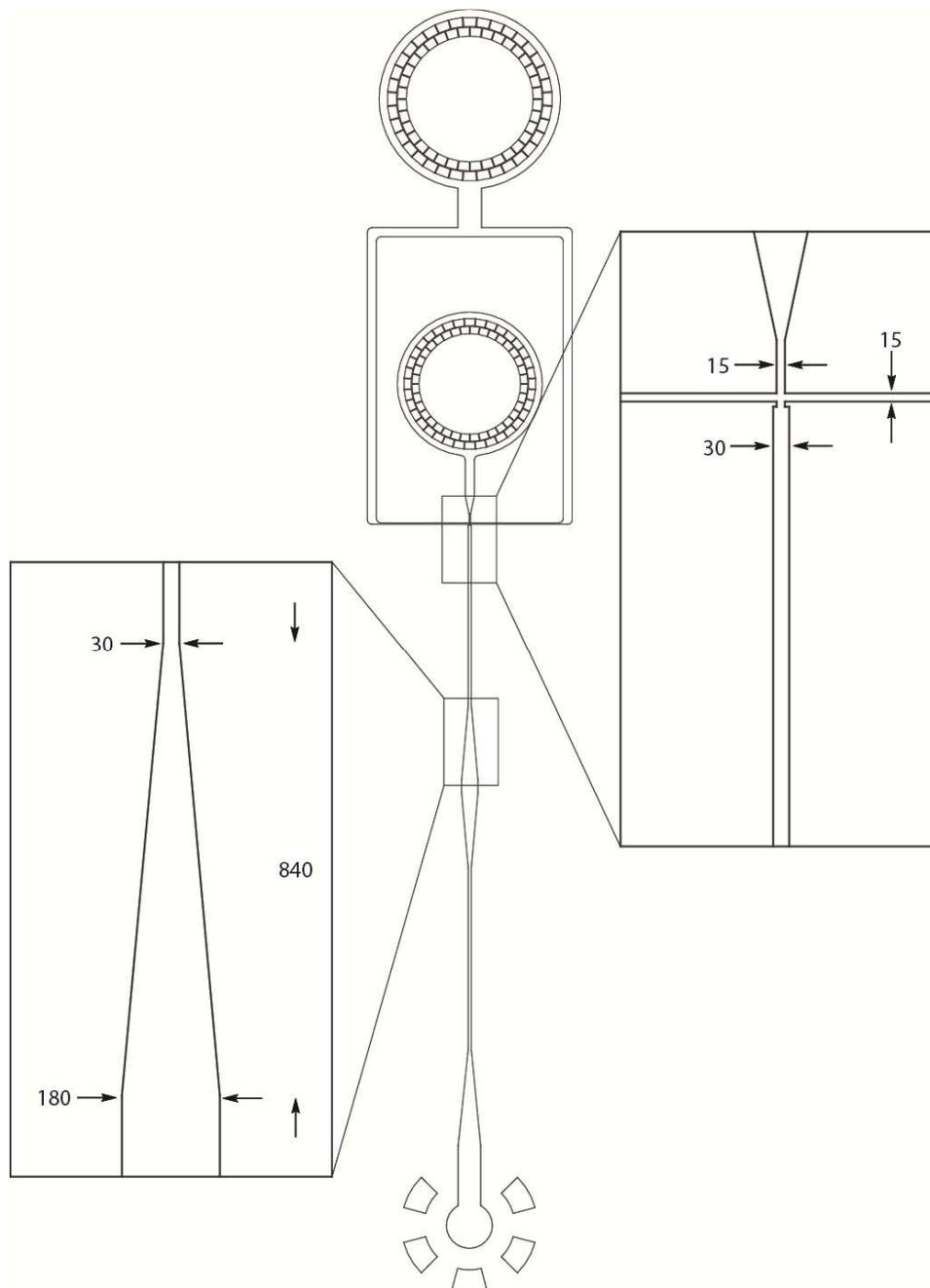


Figure 75 : Dimensions du module microfluidique avec chambre de coalescence : Toutes les valeurs sont données en μm .

Le tronçon du canal efférent compris entre la zone de production des microgouttelettes et la chambre de coalescence correspond à une longueur $l = 2000 \mu\text{m}$.

Annexe 4 : Module microfluidique de production

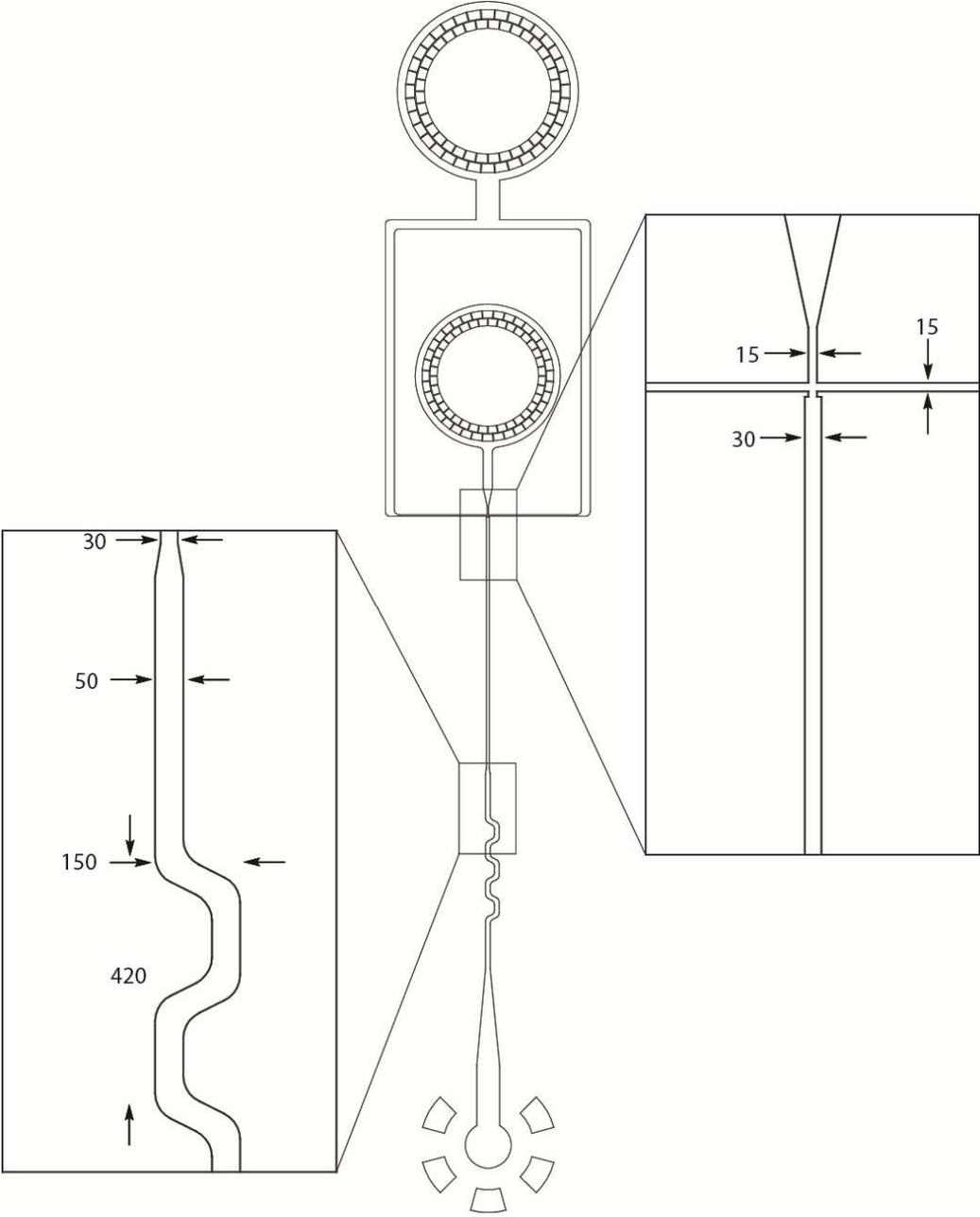


Figure 76 : Dimensions du module microfluidique de production : Toutes les valeurs sont données en μm . Le tronçon du canal efférent compris entre la zone de production des microgouttelettes et la zone de mélange correspond à une longueur $l = 2800 \mu\text{m}$.

Annexe 5 : Module microfluidique de réinjection

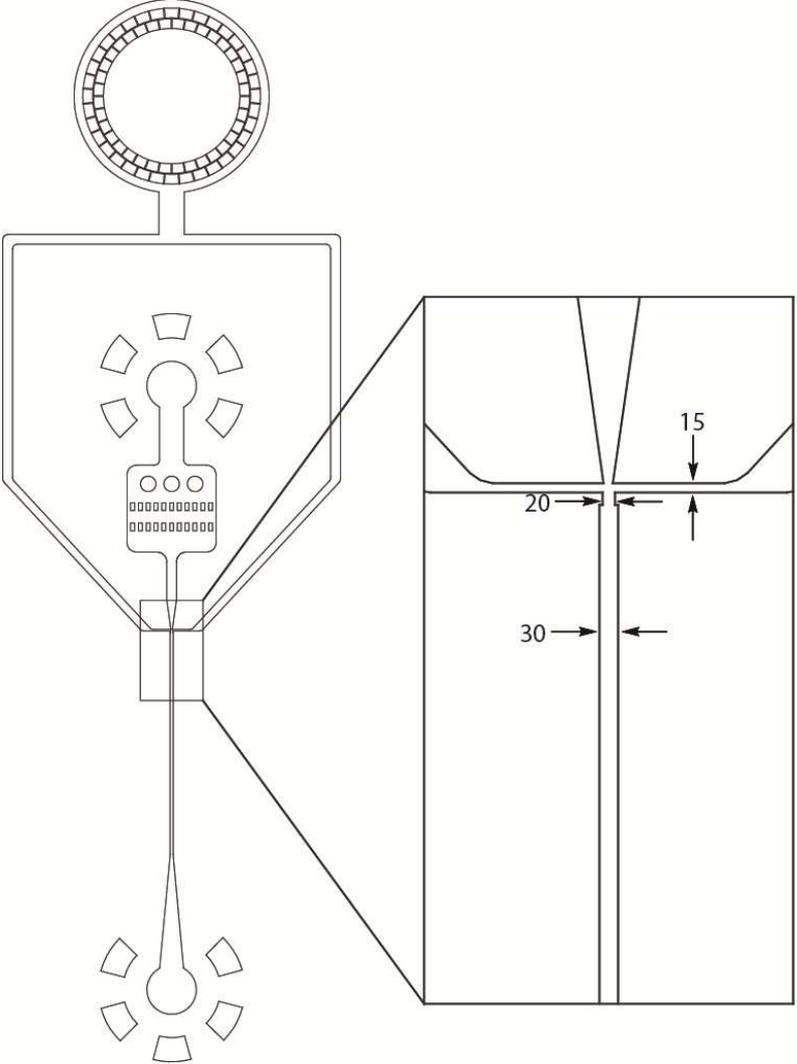


Figure 77 : Dimensions du module microfluidique de réinjection : Toutes les valeurs sont données en μm .

Annexe 6 : Module microfluidique d'incubation en ligne de délai

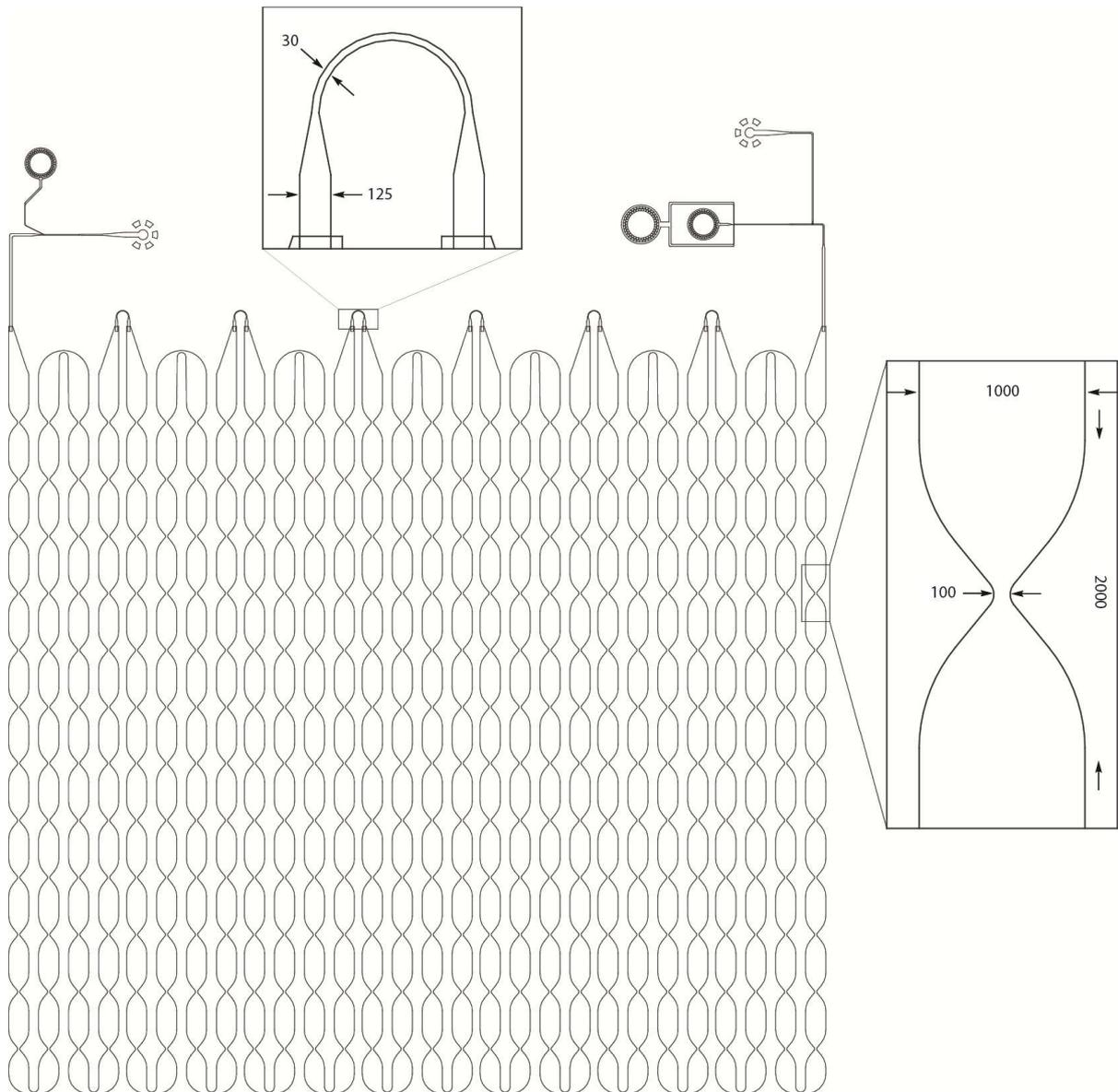


Figure 78 : Dimensions du module microfluidique d'incubation en ligne de délai : Toutes les valeurs sont données en μm .
Les dimensions de la zone de production correspondent à celle données ci-dessus (**Figure 76**).

Annexe 7 : Module microfluidique de production double

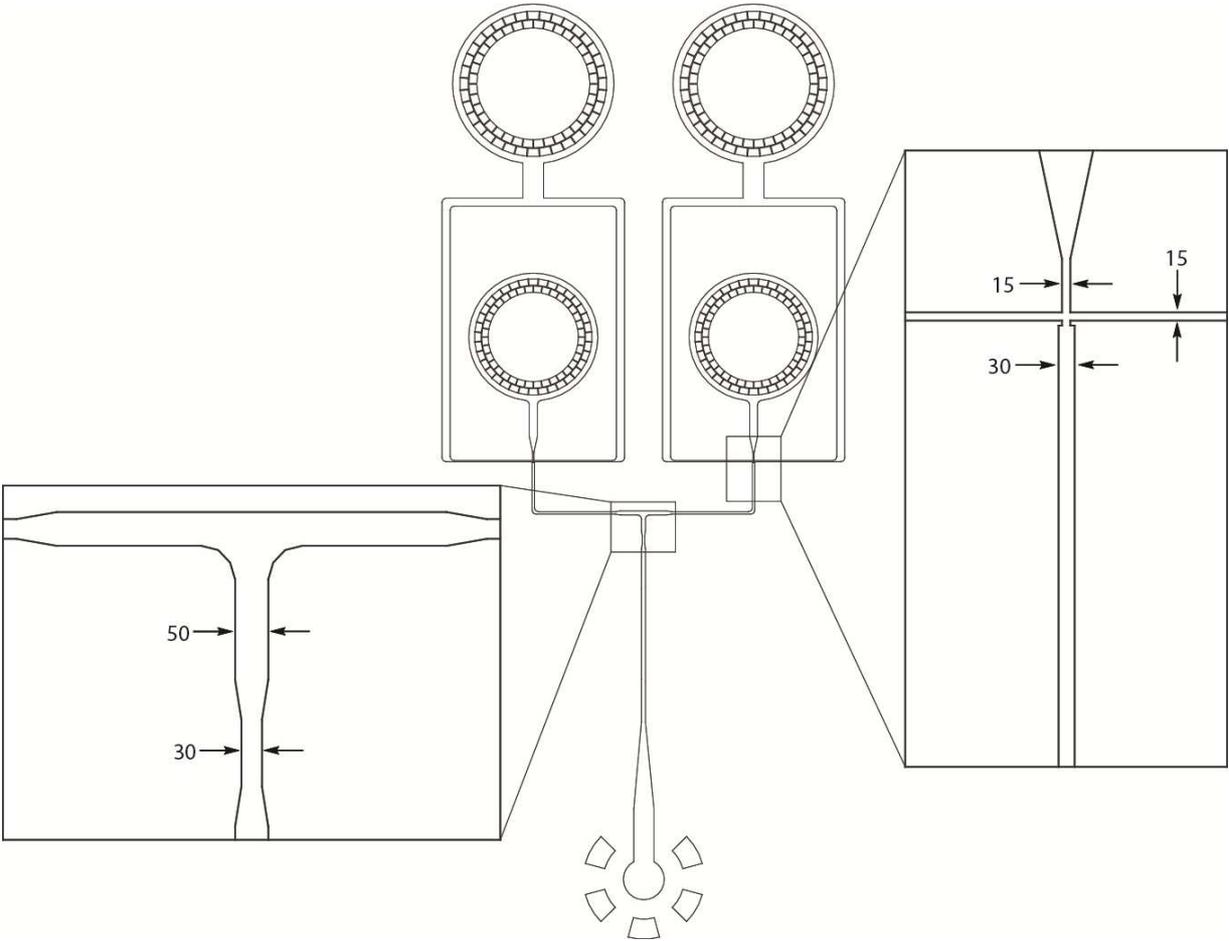


Figure 79 : Dimensions du module microfluidique d'incubation en ligne de délai : Toutes les valeurs sont données en μm.

Annexe 8 : Module microfluidique de production à double entrée de phases aqueuses

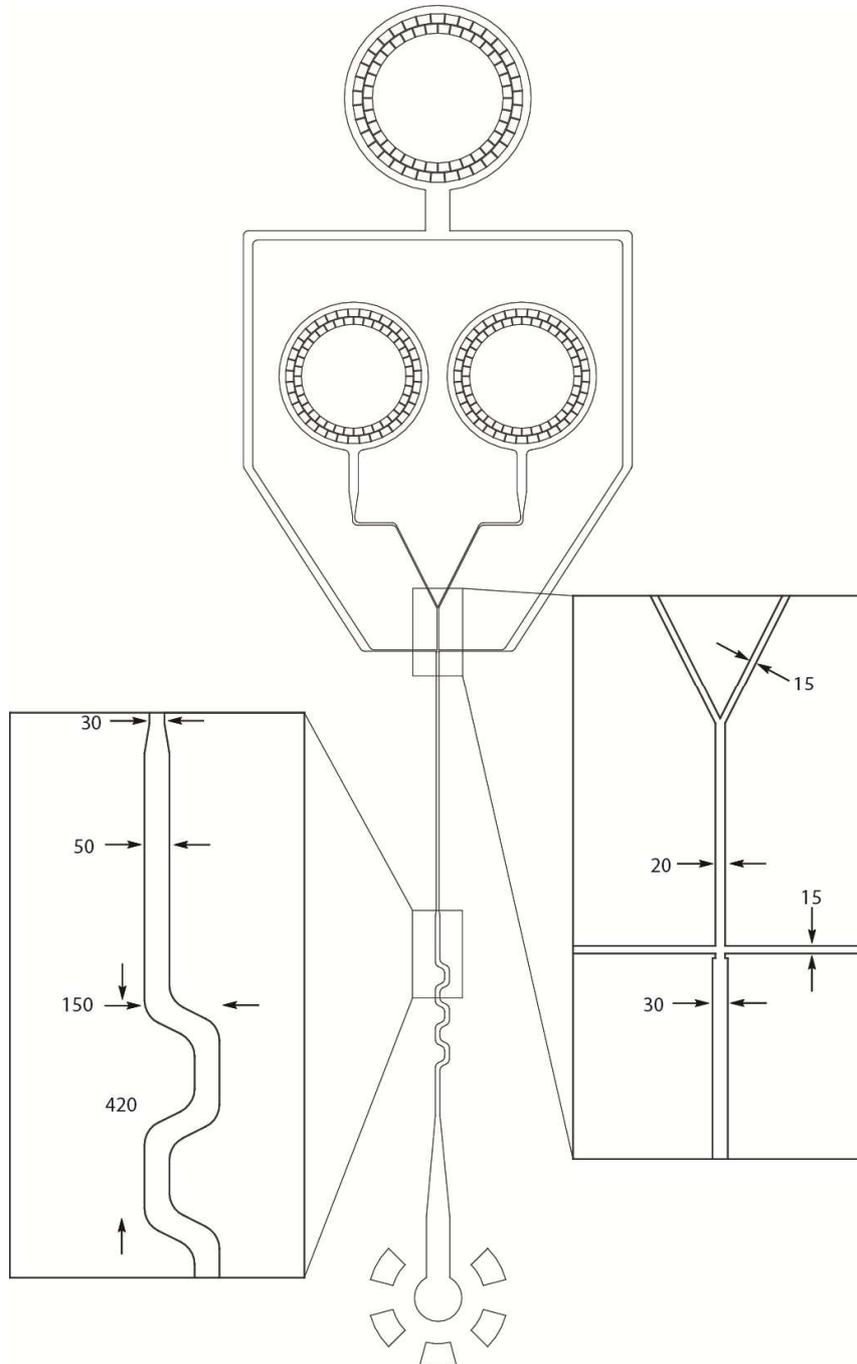


Figure 80 : Dimensions du module microfluidique de production à double entrée de phases aqueuses : Toutes les valeurs sont données en μm . Le tronçon du canal efférent compris entre la zone de production des microgouttelettes et la zone de mélange correspond à une longueur $l = 2800 \mu\text{m}$.

Annexe 9 : Protocole de réaction de Transcription Inverse, PCR et RT-PCR (Chapitre 3)

Composition	Volumes
<i>Reverse Transcription Buffer (10 x)</i>	5 µL
<i>MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL)</i>	3,35 µL
<i>dNTPs (100 mM)</i>	0,5 µL
<i>RNase Inhibitor (20 U/µL)</i>	0,65 µL
<i>Amorces RT (5 x)</i>	10 µL
<i>RNA</i>	X
<i>QSP Nuclease-free water</i>	Y
Volume total	50 µL

Tableau 9 : Protocole de réaction de Transcription Inverse (Kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcriptase).

Le milieu est chauffé à : (i) 16°C pendant 30 min ; (ii) 42°C pendant 30 min ; (iii) 85°C pendant 5 min avant d'être refroidie à 4°C.

Composition	Volumes
<i>TaqMan® Genotyping Master Mix (2 x)</i>	12,5 µL
<i>Droplet stabilizer (25 x)</i>	2,5 µL
<i>Sondes TaqMan® (20 x)</i>	X
<i>ADNc</i>	Y
<i>QSP Tampon Tris (100 mM)</i>	Z
Volume total	25 µL

Tableau 10 : Protocole de réaction de PCR (TaqMan® Genotyping Master Mix).

Le milieu est chauffé à : (i) 50°C pendant 2 min ; (ii) 95°C pendant 10 min ; puis 44 cycles de (iii) 95°C pendant 45 sec et 64°C pendant 90 sec, avant d'être refroidie à 4°C.

Composition	Volumes
<i>Master Mix (2 x)</i>	12,5 µL
<i>MultiScribe and Rnase Inhibitor Mix (40 x)</i>	1,25 µL
<i>Droplet stabilizer (25 x)</i>	2,5 µL
<i>Amorces RT (5 x)</i>	X
<i>Sondes TaqMan® (20 x)</i>	Y
<i>ARN</i>	Z
<i>QSP Water</i>	W
Volume total	25 µL

Tableau 11 : Protocole de réaction de RT-PCR (TaqMan® One-Step RT-PCR).

Le milieu est chauffé à : (i) 48°C pendant 30 min ; (ii) 95°C pendant 10 min ; puis 40 cycles de (iii) 95°C pendant 15 sec et 64°C pendant 60 sec, avant d'être refroidie à 4°C.

Composition	Volumes
<i>RT-PCR Buffer (2 x)</i>	12,5 µL
<i>RT-PCR Enzyme Mix (25 x)</i>	1,25 µL
<i>Droplet stabilizer (25 x)</i>	2,5 µL
<i>Amorces RT (5 x)</i>	X
<i>Sondes TaqMan® (20 x)</i>	Y
<i>ARN</i>	Z
<i>QSP Nuclease-free water</i>	W
Volume total	25 µL

Tableau 12 : Protocole de réaction de RT-PCR (AgPath-ID® One-Step RT-PCR).

Le milieu est chauffé à : (i) 45°C pendant 10 min ; (ii) 95°C pendant 15 min ; puis 40 cycles de (iii) 95°C pendant 15 sec et 60°C pendant 60 sec, avant d'être refroidie à 4°C.

Composition	Volumes
<i>RT-PCR Buffer (2 x)</i>	12,5 µL
<i>RT-PCR Enzyme Mix (25 x)</i>	1,25 µL
<i>Droplet stabilizer (25 x)</i>	2,5 µL
<i>Amorces RT (5 x)</i>	X
<i>Sondes TaqMan[®] (20 x)</i>	Y
<i>ARN</i>	Z
<i>QSP Nuclease-free water</i>	W
Volume total	25 µL

Tableau 13 : Protocole **OPTIMISE** de réaction de RT-PCR (AgPath-ID[®] One-Step RT-PCR).

Le milieu est chauffé à : (i) 16°C pendant 30 min ; (ii) 42°C pendant 30 min ; (iii) 95°C pendant 10 min ; puis 44 cycles de (iv) 95°C pendant 15 sec et 60°C pendant 45 sec, avant d'être refroidie à 4°C.

Annexe 10 : Développement de nouveaux modules microfluidiques adaptés pour la PCR sur puce

Micro-fabrication de puce en PDMS/NOA

La fabrication des puces en PDMS/NOA (Nordland Optical Adhesive) se base également sur le procédé de lithographie douce décrit précédemment. Dans ce cas, après dépôt du PDMS, le moule est à nouveau déposé sur un spin coater dans le but d'obtenir une hauteur de puce PDMS fine (< 1 mm). Les différents points d'entrée et de sortie sont rehaussés à l'aide de structures cylindriques ($\emptyset = 3$ mm, hauteur = 2 mm) en PDMS percés afin de permettre le branchement des arrivées et départs de liquides (tubes en téflon) dans la puce. Après fabrication de la puce, le PDMS est recouvert d'une colle photoréticulable NOA et exposé à un rayonnement UV pendant 60 secondes.

Micro-fabrication de puce en NOA

La fabrication des puces en NOA se base encore une fois sur le procédé de lithographie douce décrit précédemment. Dans ce cas, le moule est directement recouvert par une colle photoréticulable NOA et exposé à un rayonnement UV pendant 60 secondes. La puce en NOA est décollée du moule avant d'être percée à l'aide d'une pince à biopsie ($\emptyset = 0,75$ mm) aux points d'entrée et de sortie, ultérieurement rehaussés à l'aide de structures cylindriques ($\emptyset = 3$ mm, hauteur = 2 mm) en PDMS percés afin de permettre le branchement des arrivées et départs de liquides (tubes en téflon) dans la puce. La puce est ensuite collée sur lame de verre après exposition au plasma à O_2 (Plama system FEMTO, Diener Electronic).

Systèmes d'incubation statique

Les premiers travaux se sont basés sur l'utilisation de système d'incubations statiques à travers l'usage de module de réservoirs afin de réaliser une réaction de PCR sur puce. Pour cela une émulsion est produite par focalisation hydrodynamique dans un module de production, avant de se déverser dans un réservoir présent au sein même de la puce. La phase continue est composée d'une huile fluorée (HFE-7500) contenant le tensioactif Kry-jeffa₁₀₀₀ en concentration massique 3%. La phase dispersée est composée d'une solution de tampon phosphate PBS (1x) pour les tests préliminaires d'observation du comportement de l'émulsion. Une fois le réservoir rempli, la puce est

fermée hermétiquement à l'aide de tubes en téflon clos introduits dans les orifices d'entrée et de sortie. La puce est ensuite déposée dans un thermocycleur afin d'être soumise aux variations de température nécessaires au déroulement de la réaction de PCR (40 cycles de : 94°C, 15 sec. ; 60°C, 60 sec.). L'analyse de l'émulsion est ensuite réalisée au sein même de la puce à l'aide d'un microscope à fluorescence. En cas de conservation de l'intégrité de l'émulsion après encapsulation d'une solution de PBS, l'expérience est répétée en présence du matériel nécessaire à la réaction de PCR.

Module de réservoir en PDMS/NOA

Nos premières expériences se sont portées sur l'utilisation de puce en "PDMS classique". En sortie de thermocycleur, les puces sont analysées afin d'observer l'intégrité de l'émulsion. Dans ce cas, on observe une diminution conséquente du volume des microgouttelettes dans la puce. Une explication de ce phénomène peut être apportée par la nature poreuse du PDMS. Ce dernier étant perméable au gaz, il est envisageable d'observer une évaporation ou une absorption par le PDMS de la phase aqueuse durant les différents cycles de chauffage.

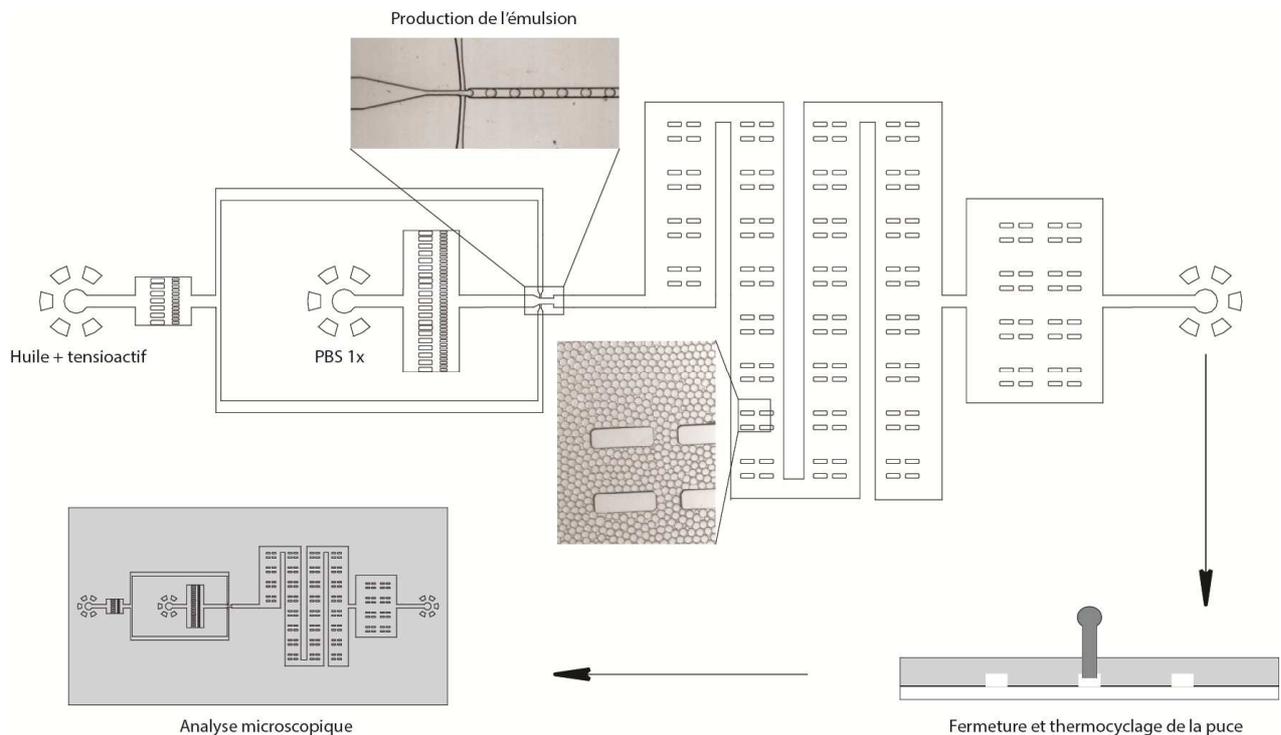


Figure 81 : Système d'incubation statique pour la PCR sur puce : Une émulsion est produite par focalisation hydrodynamique dans un module d'incubation. Après remplissage, la puce est fermée hermétiquement puis déposée au thermocycleur avant d'être analysée en sortie pour observer l'effet produit sur l'émulsion.

Module de réservoir en NOA

Dans cette expérience, des puces microfluidiques sont produites entièrement à partir de colle photoréticulable NOA (collées sur une lame de verre). La nature imperméable de ce composé laissait entrevoir la possibilité de limiter les phénomènes d'absorption afin de conserver une parfaite intégrité des émulsions. Plusieurs types de colle NOA ont été sélectionnées pour leurs propriétés optiques et d'adhésion sur le verre (NOA 81, 86 et UVS 91). Les moules NOA sont directement collés sur lame de verre après exposition au plasma à O₂. Si ce système est parfaitement utilisable à température ambiante, on constate cependant un phénomène de délamination de la puce vis-à-vis de la lame de verre après thermocyclage, entraînant une fuite de l'émulsion hors de la puce. Cette observation s'étend aux différents modèles de colle NOA utilisés.

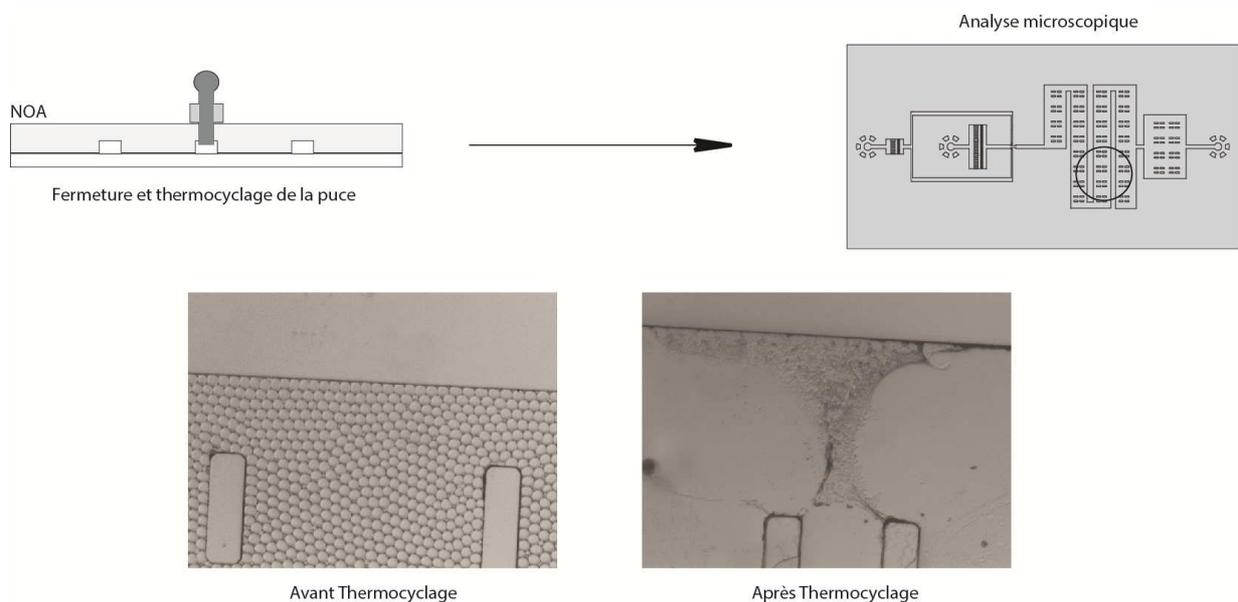


Figure 82 : Résultats microscopique après thermocyclage des modules d'incubation en colle NOA photoréticulable

Module de réservoir en verre

Pour cette expérience, des micro-puces en verre commerciales ont été utilisées (FlowCells Chip, Micronit). Le verre a l'avantage d'être un matériau parfaitement imperméable et rigide, et permet d'éviter toute absorption ou toutes fuites éventuelles de l'émulsion. Afin d'adapter la puce à nos systèmes, des structures de branchement en PDMS ($\varnothing = 3$ mm, hauteur = 2 mm) préalablement percées à l'aide d'une pince à biopsie ($\varnothing = 0,75$ mm) ont été collées aux points d'entrée et de sortie de la puce après exposition au plasma à O_2 . Le module imprimé sur la puce dont nous disposons ne permettant pas la production d'une émulsion directe dans la puce, cette dernière est produite préalablement dans un module de production en PDMS et injectée dans la puce en verre. Cette puce est ensuite fermée hermétiquement à l'aide de tubes en téflon scellés placés dans les orifices d'entrée et de sortie et déposée dans un thermocycleur avant d'être analysée par microscopie optique.

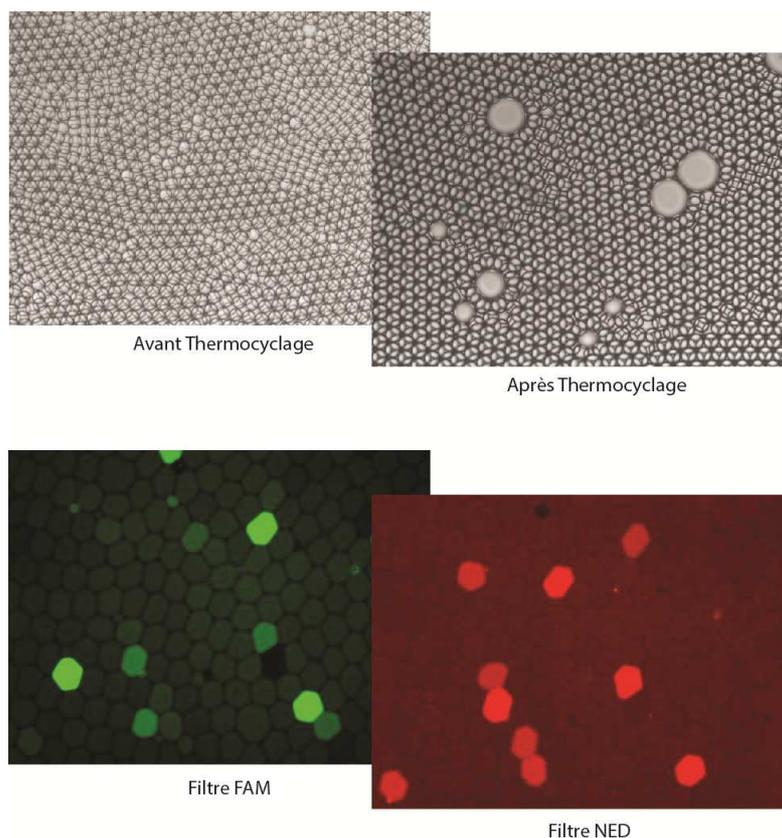


Figure 83 : Résultats en microscopie optique et à épifluorescence après thermocyclage d'une réaction de ePCR dans un module d'incubation en verre

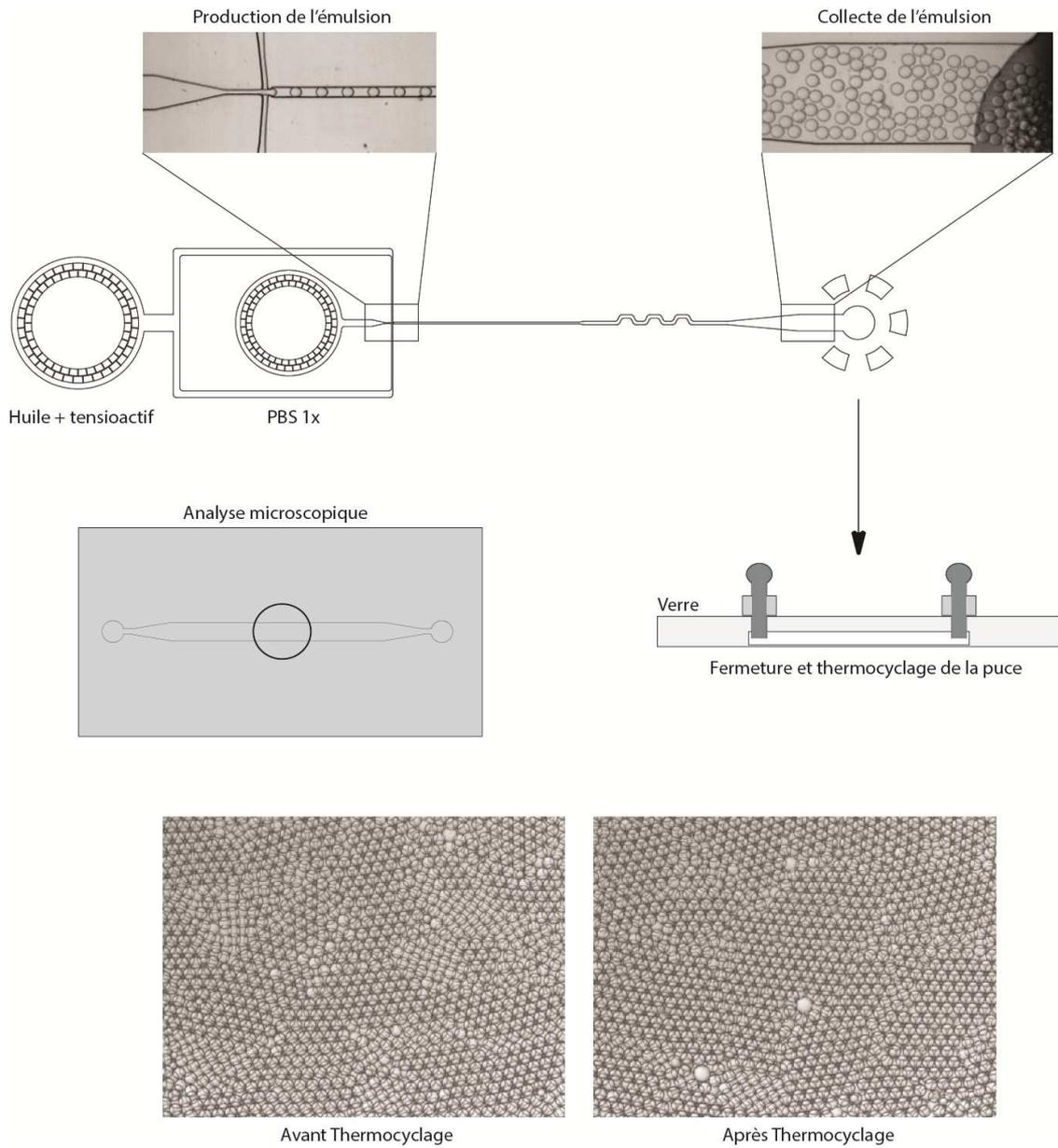


Figure 84 : Résultats microscopique après thermocyclage du module d'incubation en verre : Une émulsion est produite par focalisation hydrodynamique dans un module de production en PDMS. L'émulsion est ensuite introduite dans un module d'incubation en verre puis déposée au thermocycleur avant d'être analysée par microscopie optique.

Bibliographie

- Abate AR., Hung T., Mary P., Agresti JJ., Weitz DA. (2010) "*High-throughput injection with microfluidics using picoinjectors*". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (45), 19163-19166.
- Abate AR., Lee D., Do T., Holtze C., Weitz DA. (2008) "*Glass coating for PDMS microfluidic channels by sol-gel methods*". Lab. Chip. 8 (4), 516-518.
- Abate AR., Poitzsch A., Hwang Y., Lee J., Czerwinska J., Weitz DA. (2009) "*Impact of inlet channel geometry on microfluidic drop formation*". Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys. 80 (2), 026310.
- Abate AR., Weitz DA. (2011) "*Faster multiple emulsification with drop splitting*". Lab. Chip. 11 (11), 1911-1915.
- Abe H., Kool ET. (2004) "*Destabilizing universal linkers for signal amplification in self-ligating probes for RNA*". J. Am. Chem. Soc. 126 (43), 13980-13986.
- Abe H., Kool ET. (2006) "*Flow cytometric detection of specific RNAs in native human cells with quenched autoligating FRET probes*". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (2), 263-268.
- Ahn K., Agresti J., Chong H., Marquez M. and Weitz DA. (2006) "*Electrocoalescence of drops synchronized by size-dependent flow in microfluidic channels*". Appl. Phys. Lett. 88 (26), 264105.
- Anderson JR., Chiu DT., Jackman RJ., Cherniavskaya O., McDonald JC., Wu H., Whitesides SH., Whitesides GM. (2000) "*Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping*". Anal. Chem. 72 (14), 3158-3164.
- Anna SL., Bontoux N., Stone HA. (2003) "*Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels*". Appl. Phys. Lett. 82 (3), 364-366.
- Anna SL., Mayer HC. (2006) "*Microscale tipstreaming in a microfluidic flow focusing device*". Phys. Fluids 18, 121512.
- Aris R. (1956) "*On the Dispersion of a Solute in a Fluid Flowing through a Tube*". Proc. R. Soc. Lond. A 235 (1200), 67-77.
- Aumiller GD., Chandross EA., Tomlinson WJ. and Weber HP. (1974) "*Submicrometer resolution replication of relief patterns for integrated optics*". J. Appl. Phys. 45 (10), 4557-4562.
- Ayaz L., Cayan F., Balci S., Görür A., Akbayir S., Yıldırım Yaroğlu H., Doğruer Unal N., Tamer L. (2014) "*Circulating microRNA expression profiles in ovarian cancer*". J. Obstet. Gynaecol. 1-5.
- Baker M. (2012) "*Digital PCR hits its stride*". Nat. Methods 9, 541-544.

- Bandrés E., Cubedo E., Agirre X., Malumbres R., Zárata R., Ramirez N., Abajo A., Navarro A., Moreno I., Monzó M., García-Foncillas J. (2006) "*Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues*". *Mol. Cancer* 5, 29.
- Baret JC., Kleinschmidt F., El Harrak A., Griffiths AD. (2009) "*Kinetic aspects of emulsion stabilization by surfactants: a microfluidic analysis*". *Langmuir*. 25 (11), 6088-6093.
- Baroud CN., de Saint Vincent MR., Delville JP. (2007) "*An optical toolbox for total control of droplet microfluidics*". *Lab. Chip*. 7 (8), 1029-1033.
- Barshack I., Lithwick-Yanai G., Afek A., Rosenblatt K., Tabibian-Keissar H., Zepeniuk M., Cohen L., Dan H., Zion O., Strenov Y., Polak-Charcon S., Perelman M. (2010) "*MicroRNA expression differentiates between primary lung tumors and metastases to the lung*". 206 (8), 578-584.
- Beer NR., Hindson BJ., Wheeler EK., Hall SB., Rose KA., Kennedy IM., Colston BW. (2007) "*On-chip, real-time, single-copy polymerase chain reaction in picoliter droplets*". *Anal. Chem.* 79 (22), 8471,8475.
- Beer NR., Wheeler EK., Lee-Houghton L., Watkins N., Nasarabadi S., Hebert N., Leung P., Arnold DW., Bailey CG., Colston BW. (2008) "*On-chip single-copy real-time reverse-transcription PCR in isolated picoliter droplets*". *Anal. Chem.* 80 (6), 1854-1858.
- Belloul M., Bartolo JF., Ziraoui B., Coldren F., Taly V., El Abed AI. (2013) "*High-throughput formation and control of monodisperse liquid crystals droplets driven by an alternating current electric field in a microfluidic device*". *Applied Physics Letters* 130 (3), 033112.
- Beneyton T. (2011) "*Evolution dirigée et biopile enzymatique : étude de la laccase CotA et optimisation par évolution dirigée en microfluidique digitale*". Université de Strasbourg.
- Beneyton T., Coldren F., Baret JC., Griffiths AD., Taly V. (2014) "*CotA laccase: high-throughput manipulation and analysis of recombinant enzyme libraries expressed in E. coli using droplet-based microfluidics*". *Analyst*. 139 (13), 3314-3323.
- Bernath K., Hai M., Mastrobattista E., Griffiths AD., Magdassi S., Tawfik DS. (2004) "*In vitro compartmentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting*". *Anal. Chem.* 325 (1), 151-157.
- Bernes G., Gentle I. (2005) "*Interfacial science : an introduction*". Oxford, Oxford University Press.
- Beverung CJ., Radke CJ., Blanch HW. (1999) "*Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements*". *Biophys. Chem.* 81 (1), 59-80.

- Bhattacharya S., Datta A., Berg JM., Gangopadhyay S. (2005). "Studies on surface wettability of poly(dimethyl)siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength". *J. Microelectromechanical Systems* 14 (3), 590-597.
- Bibette J., Morse DC., Witten TA., Weitz DA. (1992) "Stability criteria for emulsions". *Phys. Rev. Lett.* 69 (16), 2439-2442.
- Biscontin A., Casara S., Cagnin S., Tombolan L., Rosolen A., Lanfranchi G., De Pittà C. (2010) "New miRNA labeling method for bead-based quantification". *BMC Mol. Biol.* 11, 44.
- Boele J., Persson H., Shin JW., Ishizu Y., Newie IS., Søkilde R., Hawkins SM., Coarfa C., Ikeda K., Takayama K., Horie-Inoue K., Ando Y., Burroughs AM., Sasaki C., Suzuki C., Sakai M., Aoki S., Ogawa A., Hasegawa A., Lizio M., Kaida K., Teusink B., Carninci P., Suzuki H., Inoue S., Gunaratne PH., Rovira C., Hayashizaki Y., de Hoon MJ. (2014) "PAPD5-mediated 3' adenylation and subsequent degradation of miR-21 is disrupted in proliferative disease". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (31), 11467-11472.
- Bremond N., Thiam AR., Bibette J. (2008) "Decompressing emulsion droplets favors coalescence". *Phys. Rev. Lett.* 100 (2), 024501-024504.
- Brewer LR., Bianco PR. (2008) "Laminar flow cells for single-molecule studies of DNA-protein interactions". *Nat. Methods* 5 (6), 517-525.
- Calhoun MF., Sanchez J., Olaya D., Gershenson ME., Podzorov V. (2008) "Electronic functionalization of the surface of organic semiconductors with self-assembled monolayers". *Nat. Mater.* 7 (1), 84-89.
- Castoldi M., Schmidt S., Benes V., Noerholm M., Kulozik AE., Hentze MW., Muckenthaler MU. (2006) "A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA)". *RNA* 12 (5), 913-920.
- Chabert M., Dorfman KD., Viovy JL. (2005) "Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels". *Electrophoresis* 26 (19), 3706-3715.
- Chabert M., Viovy JL. (2008) "Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (9), 3191-3196.
- Chabinyk ML., Chiu DT., McDonald JC., Stroock AD., Christian JF., Karger AM., Whitesides GM. (2001) "An integrated fluorescence detection system in poly(dimethylsiloxane) for microfluidic applications". *Anal. Chem.* 73 (18), 4491-4498.
- Chapman RG., Ostuni E., Takayama S., Holmlin RE., Yan L., Whitesides GM. (2000) "Surveying for surfaces that resist the adsorption of proteins". *J. Am. Chem. Soc.* 122 (34), 8303-8304.

- Chatzikyriakidou A., Voulgari PV., Georgiou I., Drosos AA. (2012) "*miRNAs and related polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility*". *Autoimmun. Rev.* 11 (9), 639-641.
- Chen C., Ridzon DA., Broomer AJ., Zhou Z., Lee DH., Nguyen JT., Barbisin M., Xu NL., Mahuvakar VR. (2005) "*Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR*". *Nucleic Acids Res.* 33 (20), e179.
- Chen D., Du W., Liu Y., Liu W., Kuznetsov A., Mendez FE., Philipson LH., Ismagilov RF. (2008) "*The chemistrode: a droplet-based microfluidic device for stimulation and recording with high temporal, spatial, and chemical resolution*". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (44), 16843-16848.
- Chiu DT., Lorenz RM., Jeffries GD. (2009) "*Droplets for ultrasmall-volume analysis*". *Anal. Chem.* 81 (13), 5111-5118.
- Choi SY., Yun J., Lee OJ., Han HS., Yeo MK., Lee MA., Suh KS. (2013) "*MicroRNA expression profiles in placenta with severe preeclampsia using a PNA-based microarray*". *Placenta* 34 (9), 799-804.
- Christopher GF., Anna SL. (2007) "*Microfluidic methods for generating continuous droplet streams*". *J. Phys. D: Appl. Phys.* 40 (19), R319.
- Christopher GF., Noharuddin NN., Taylor JA., Anna SL. (2008) "*Experimental observations of the squeezing-to-dripping transition in T-shaped microfluidic junctions*". *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys.* 78 (3), 036317
- Ciocca DR., Calderwood SK. (2005) "*Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications*". *Cell Stress Chaperones* 10 (2), 86-103.
- Cissell KA., Rahimi Y., Shrestha S., Hunt EA., Deo SK. (2008) "*Bioluminescence-based detection of microRNA, miR21 in breast cancer cells*". *Anal Chem.* 80 (7), 2319-2325.
- Clausell-Tormos J., Lieber D., Baret JC., El-Harrak A., Miller OJ., Frenz L., Blouwolff J., Humphry KJ., Köster S., Duan H., Holtze C., Weitz DA., Griffiths AD., Merten CA. (2008) "*Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of Mammalian cells and multicellular organisms*". *Chem. Biol.* 15 (5), 427-437.
- Copeland WC., Longley MJ. (2014) "*Mitochondrial genome maintenance in health and disease*". *DNA Repair* 19, 190-198.
- Courtois F., Olguin LF., Whyte G., Bratton D., Huck WT., Abell C., Hollfelder F. (2008) "*An integrated device for monitoring time-dependent in vitro expression from single genes in picolitre droplets*". *Chembiochem.* 9 (3), 439-446.
- Datta S., Ghosal S. (2009) "*Characterizing dispersion in microfluidic channels*". *Lab. Chip.* 9 (17), 2537-2550.

- Day E., Dear PH., McCaughan F. (2013) "*Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine*". *Methods* 59 (1), 101-107.
- De Mench M., Garstecki P., Jousse F., Stone HA. (2008) "*Transition from squeezing to dripping in a microfluidic T-shaped junction*". *J. Fluid. Mech.* 595, 141-161.
- Debey-Pascher S., Eggle D., Schultze JL. (2009) "*RNA stabilization of peripheral blood and profiling by bead chip analysis*". *Methods Mol. Biol.* 496, 175-210.
- Didelot A., Kotsopoulos SK., Lupo A., Pekin D., Li X., Atochin I., Srinivasan P., Zhong Q., Olson J., Link DR., Laurent-Puig P., Blons H., Hutchison JB., Taly V. (2013) "*Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples*". *Clin. Chem.* 59 (5), 815-823.
- Diehl F., Li M., He Y., Kinzler KW., Vogelstein B., Dressman D. (2006) "*BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions*". *Nat. Methods* 3 (7), 551-559.
- Dittrich PS., Schwille P. (2003) "*An integrated microfluidic system for reaction, high-sensitivity detection, and sorting of fluorescent cells and particles*". *Anal. Chem.* 75 (21), 5767-5774.
- Doench JG., Petersen CP., Sharp PA. (2003) "*siRNAs can function as miRNAs*". *Genes Dev.* 17 (4), 438-442.
- Dollet B., van Hoeve W., Raven JP., Marmottant P., Versluis M. (2008) "*Role of the channel geometry on the bubble pinch-off in flow-focusing devices*". *Phys. Rev. Lett.* 100 (3), 034504.
- Dorfman KD., Chabert M., Codarbox JH., Rousseau G., de Cremoux P., Viovy JL. (2005) "*Contamination-free continuous flow microfluidic polymerase chain reaction for quantitative and clinical applications*". *Anal. Chem.* 77 (11), 3700-3704.
- Dressman D., Yan H., Traverso G., Kinzler KW., Vogelstein B. (2003) "*Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations*". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (15), 8817-8822.
- Dreyfus R., Tabeling P., Willaime H. (2003) "*Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels*". *Phys. Rev. Lett.* 90 (14), 144505.
- Dukhin SS., Kretschmar G., Miller R. (1995) "*Dynamics of adsorption at liquid interfaces : theory, experiment, application*". Amsterdam, Elsevier.
- Eastburn DJ., Sciambi A., Abate AR. (2013) "*Picoinjection enables digital detection of RNA with droplet rt-PCR*". *PLoS One* 8 (4), e62961.
- Eramah S., Landry M., Favereaux A. (2014) "*MicroRNAs regulate neuronal plasticity and are involved in pain mechanisms*". *Front. Cell. Neurosci.* 8 (31), 1-15.

- Esteller M. (2011) "Non-coding RNAs in human disease". *Nat. Rev. Genet.* 12 (12), 861-874.
- Fallah-Araghi A., Baret JC., Ryckelynck M., Griffiths AD. (2012) "A completely in vitro ultrahigh-throughput droplet-based microfluidic screening system for protein engineering and directed evolution". *Lab. Chip.* 12 (5), 882-891.
- Ficheux MF., Bonakdar L., Leal-Calderon F., Bibette J. (1998) "Some Stability Criteria for Double Emulsions" *Langmuir.* 14 (10), 2702-2706.
- Franzini RM., Kool ET. (2011) "Improved templated fluorogenic probes enhance the analysis of closely related pathogenic bacteria by microscopy and flow cytometry". *Bioconjug. Chem.* 22 (9), 1869-1877.
- Franzini RM., Kool ET. (2011) "Two successive reactions on a DNA template: a strategy for improving background fluorescence and specificity in nucleic acid detection". *Chemistry.* 71 (7), 2168-2175.
- Franzini RM., Kool ET. (2009) "Efficient nucleic acid detection by templated reductive quencher release". *J. Am. Chem. Soc.* 131 (44), 16021-16023.
- Frenz L., Blank K., Brouzes E., Griffiths AD. (2009) "Reliable microfluidic on-chip incubation of droplets in delay-lines". *Lab. Chip.* 9 (10), 1344-1348.
- Frenz L., El Harrak A., Pauly M., Bégin-Colin S., Griffiths AD., Baret JC. (2008) "Droplet-based microreactors for the synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles". *Angew. Chem.* 47 (36), 6817-6820.
- Fuerstman MJ., Lai A., Thurlow ME., Shevkoplyas SS., Stone HA., Whitesides GM. (2007) "The pressure drop along rectangular microchannels containing bubbles". *Lab. Chip.* 7 (11), 1479-1489.
- Fuller AM., Qian L. (2014) "MiRiad Roles for MicroRNAs in Cardiac Development and Regeneration". *Cells* 3 (3), 724-750.
- Gallo A., Alevizos I. (2013) "Isolation of circulating microRNA in saliva". *Methods Mol. Biol.* 1024, 183-190.
- Gao Z., Yang Z. (2006) "Detection of microRNAs using electrocatalytic nanoparticle tags". *Anal. Chem.* 78 (5), 1470-1477.
- Gao Z., Yu YH. (2007) "Direct labeling microRNA with an electrocatalytic moiety and its application in ultrasensitive microRNA assays". *Biosens. Bioelectron.* 22 (6), 933-940.
- Garstecki P., Fuerstman MJ., Stone HA., Whitesides GM. (2006) "Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up". *Lab. Chip.* 6 (3), 437-446.

- Garstecki P., Stone HA., Whitesides GM. (2005) "*Mechanism for flow-rate controlled breakup in confined geometries: a route to monodisperse emulsions*". Phys. Rev. Lett. 94 (16), 164501.
- Gartner ZJ., Kanan MW., Liu DR. (2002) "*Multistep small-molecule synthesis programmed by DNA templates*". J. Am. Chem. Soc. 124 (35), 10304-10306.
- Gartner ZJ., Liu DR. (2001) "*The generality of DNA-templated synthesis as a basis for evolving non-natural small molecules*". J. Am. Chem. Soc. 123 (28), 6961-6963.
- Ghadessy FJ., Ong JL., Holliger P. (2001) "*Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication*". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (8), 4552-4557.
- Guha M., Castellanos-Rizaldos E., Makrigiorgos GM. (2013) "*DISSECT Method Using PNA-LNA Clamp Improves Detection of EGFR T790m Mutation*". PLoS One 8 (6), e67782.
- Guillot P., Colin A. (2005) "*Stability of parallel flows in a microchannel after a T junction*". Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys. 72 (6), 066301.
- Günther A., Jensen KF. (2006) "*Multiphase microfluidics: from flow characteristics to chemical and materials synthesis*". Lab. Chip. 6 (12), 1487-1503.
- Gupta A., Murshed SMS., Kumar R. (2009) "*Droplet formation and stability of flows in a microfluidic T-junction*". Appl. Phys. Lett. 94 (16), 164107.
- Guzel E, Karatas OF, Semercioz A, Ekici S, Aykan S, Yentur S, Creighton CJ, Ittmann M, Ozen M. Hadjinicolaou AV., Demetriou VL., Hezka J., Beyer W., Hadfield TL., Kostrikis LG. (2009) "*Use of molecular beacons and multi-allelic real-time PCR for detection of and discrimination between virulent Bacillus anthracis and other Bacillus isolates*". J. Microbiol. Methods 78 (1), 45-53.
- Harder P., Grunze M., Dahint R., Whitesides GM., Laibinis PE. (1998) "*Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption*". J. Phys. Chem. B. 102 (2), 426-436.
- Hayes J., Peruzzi PP., Lawler S. (2014) "*MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy*". Trends Mol. Med. 20 (8), 460-469.
- Hébert SS., De Strooper B. (2009) "*Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease*". Trends Neurosci. 32 (4), 199-206.
- Hébert SS., Horr  K., Nicolai L., Bergmans B., Papadopoulou AS., Delacourte A., De Strooper B. (2009) "*MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression*". Neurobiol. Dis. 33 (3), 422-428.

- Heneghan HM., Miller N., Kerin MJ. (2010) "*Circulating miRNA signatures: promising prognostic tools for cancer*". 28 (29), e573-574.
- Holtze C., Rowat AC., Agresti JJ., Hutchison JB., Angilè FE., Schmitz CH., Köster S., Duan H., Humphry KJ., Scanga RA., Johnson JS., Pisignano D., Weitz DA. (2008) "*Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions*". Lab. Chip. 8 (10), 1632-1639.
- Huang Y., Coull JM. (2009) "*Diamine catalyzed hemicyanine dye formation from nonfluorescent precursors through DNA programmed chemistry*". J. Am. Chem. Soc. 130 (11), 3238-3239.
- Huang Y., Zou Q., Wang SP., Tang SM., Zhang GZ., Shen XJ. (2011) "*The discovery approaches and detection methods of microRNAs*". 38 (6), 4125-4135.
- Huang Z., Huang D., Ni S., Peng Z., Sheng W., Du X. (2010) "*Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer*". Int. J. Cancer 127 (1), 118-126.
- Huang ZP., Nepl RL., Wang DZ. (2010) "*MicroRNAs in cardiac remodeling and disease*". J. Cardiovasc. Transl. Res. 3 (3), 212-218.
- Huber DL., Manginell RP., Samara MA., Kim Bl., Bunker BC. (2003) "*Programmed adsorption and release of proteins in a microfluidic device*". Science 301 (5631), 352-354.
- Huebner A., Bratton D., Whyte G., Yang M., Demello AJ., Abell C., Hollfelder F. (2009) "*Static microdroplet arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays*". Lab. Chip. 9 (5), 692-698.
- Huebner A., Sharma S., Srisa-Art M., Hollfelder F., Edel JB., Demello AJ. (2008) "*Microdroplets: a sea of applications?*". Lab. Chip. 8 (8), 1244-1254.
- Huggett JF., Whale A. (2013) "*Digital PCR as a novel technology and its potential implications for molecular diagnostics*". Clin. Chem. 59 (12), 1691-1693.
- Humphreys KJ., Cobiac L., Le Leu RK., Van der Hoek MB., Michael MZ. (2013) "*Histone deacetylase inhibition in colorectal cancer cells reveals competing roles for members of the oncogenic miR-17-92 cluster*". Mol. Carcinog. 52 (6), 459-474.
- Hung LH., Choi KM., Tseng WY., Tan YC., Shea KJ., Lee AP. (2006) "*Alternating droplet generation and controlled dynamic droplet fusion in microfluidic device for CdS nanoparticle synthesis*". Lab. Chip. 6 (2), 174-178.
- Husny J., Cooper-White JJ. (2006) "*The effect of elasticity on drop creation in T-shaped microchannels*". J. Non-Newtonian Fluid. Mech. 137, 121-136.
- Hutvágner G., Zamore PD. (2002) "*A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*". Science 297 (5589), 2056-2060.

- Ikeda S., Pu WT. (2010) "Expression and function of microRNAs in heart disease". *Curr. Drug Targets* 11 (8), 913-925.
- Ismagilov RF., Stroock AD., Kenis PJA., Whitesides G., Stone HA. (2000) "Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels". *Appl. Phys. Lett.* 76 (17), 2376-2378.
- Jain KK. (2011) "The Handbook of Biomarkers". Humana Press.
- Jentsch E., Mokhir A. (2009) "A fluorogenic, nucleic acid directed "click" reaction". *Inorg. Chem.* 48 (20), 9593-9595.
- Ji W., Zhou W., Abruzzese R., Guo W., Blake A., Davis S., Davis S., Polejaeva I. (2005) "A method for determining zygosity of transgenic zebrafish by TaqMan real-time PCR". *Anal. Biochem.* 344 (2), 240-246.
- Jo K., Chen YL., de Pablo JJ., Schwartz DC. (2009) "Elongation and migration of single DNA molecules in microchannels using oscillatory shear flows". *Lab. Chip.* 9 (16), 2348-2355.
- Joanicot M., Ajdari A. (2005) "Applied physics. Droplet control for microfluidics". *Science* 309 (5736), 887-888.
- Kalinina O., Lebedeva I., Brown J., Silver J. (1997) "Nanoliter scale PCR with TaqMan detection". *Nucleic Acids Res.* 25 (10), 1999-2004.
- Karatas OF., Guzel E., Suer I., Ekici ID., Caskurlu T., Creighton CJ., Ittmann M., Ozen M. (2014) "miR-1 and miR-133b are differentially expressed in patients with recurrent prostate cancer". *PLoS One* 9 (6), e98675.
- Kasschau KD., Xie Z., Allen E., Llave C., Chapman EJ., Krizan KA., Carrington JC. (2003) "P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA uncton". *Dev Cell.* 4 (2), 205-217.
- Kiss MM., Ortoleva-Donnelly L., Beer NR., Warner J., Bailey CG., Colston BW., Rothberg JM., Link DR., Leamon JH. (2008) "High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets". *Anal. Chem.* 80 (23), 8975-8981.
- Kleinbaum DJ., Kool ET. (2010) "Sandwich probes: two simultaneous reactions for templated nucleic acid detection". *Chem. Commun.* 46 (43), 8154-8156.
- Kleinbaum DJ., Miller GP., Kool ET. (2010) "Double displacement: An improved bioorthogonal reaction strategy for templated nucleic acid detection". *Bioconjug. Chem.* 21 (6), 1115-1150.
- Klemic KG., Klemic JF., Reed MA., Sigworth FJ. (2002) "Micromolded PDMS planar electrode allows patch clamp electrical recordings from cells". *Biosens. Bioelecton.* 17 (6-7), 597-604.

- Kloosterman WP., Wienholds E., de Bruijn E., Kauppinen S., Plasterk RH. (2006) "*In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes*". *Nat. Methods* 3 (1), 27-29.
- Kminkova J., Mraz M., Zaprazna K., Navrkalova V., Tichy B., Plevova K., Malcikova J., Cerna K., Rausch T., Benes V., Brychtova Y., Doubek M., Mayer J., Pospisilova S. (2014) "*Identification of novel sequence variations in microRNAs in chronic lymphocytic leukemia*". *Carcinogenesis* 35 (5), 992-1002.
- Koripelly G., Meguellati K., Ladame S. (2010) "*Dual sensing of hairpin and quadruplex DNA structures using multicolored peptide nucleic acid fluorescent probes*". *Bioconjug. Chem.* 21 (11), 2103-2109.
- Köster S., Angilè FE., Duan H., Agresti JJ., Wintner A., Schmitz C., Rowat AC., Merten CA., Pisignano D., Griffiths AD., Weitz DA. (2008) "*Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells*". *Lab. Chip.* 8 (7), 1110-1115.
- Krafft MP. (2001) "*Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research*". *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 19 (16), 1529-1539.
- Krol J., Loedige I., Filipowicz W. (2010) "*The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*". *Nat. Rev. Genet.* 11 (9), 597-610.
- Kumaresan P., Yang CJ., Cronier SA., Blazej RG., Mathies RA. (2008) "*High-throughput single copy DNA amplification and cell analysis in engineered nanoliter droplets*". *Anal. Chem.* 80 (10), 3522-3529.
- Ladue JS., Wroblewski F., Karmen A. (1954) "*Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction*". *Science* 120 (3117), 497-499.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. (2001) "*Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*". 294 (5543), 853-858.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A., Meyer J., Lendeckel W., Tuschl T. (2002) "*Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*". *Curr. Biol.* 12 (9), 735-739.
- Lahann J., Mitragotri S., Tran TN., Kaido H., Sundaram J., Choi IS., Hoffer S., Somorjai GA., Langer R. (2003) "*A reversibly switching surface*". *Science* 299 (5605), 371-374.
- Lee JN., Park C., Whitesides GM. (2003) "*Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices*". *Anal. Chem.* 75 (23), 6544-6554.
- Lee RC., Feinbaum RL., Ambros V. (1993) "*The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*". 75 (5), 843-854.

- Leidinger P., Keller A., Borries A., Reichrath J., Rass K., Jager SU., Lenhof HP., Meese E. (2010) "High-throughput miRNA profiling of human melanoma blood samples". *BMC Cancer* 10, 262.
- Leshansky AM., Afkhami S., Jullien MC., Tabeling P. (2012) "Obstructed breakup of slender drops in a microfluidic T junction". *Phys. Rev. Lett.* 108 (26), 264502.
- Li H., Franzini RM., Bruner C., Kool ET. (2010) "Templated chemistry for sequence-specific fluorogenic detection of duplex DNA". *Chembiochem.* 11 (15), 2132-2137.
- Li M., Diehl F., Dressman D., Vogelstein B., Kinzler KW. (2006) "BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants". *Nat Methods* 3 (2), 95-97.
- Li X., McCord EF., Baiagern S., Fox P., Howell JL., Sahoo SK., Rinaldi PL. (2011) "2D-NMR studies of a model for Krytox® fluoropolymers". *Magn. Reson. Chem.* 49 (7), 413-424.
- Li X., Turánek J., Knötigová P., Kudláčková H., Mašek J., Pennington DB., Rankin SE., Knutson LB., Lehmler HJ. (2008) "Synthesis and biocompatibility evaluation of fluorinated, single-tailed glucopyranoside surfactants". *New J. Chem.* 32, 2169-2179.
- Li Y., Yao L., Liu F., Hong J., Chen L., Zhang B., Zhang W. (2014) "Characterization of microRNA expression in serous ovarian carcinoma". *Int. J. Mol. Med.* 34 (2), 491-498.
- Liau A., Karnik R., Majumdar A., Cate JH. (2005) "Mixing crowded biological solutions in milliseconds". *Anal. Chem.* 77 (23), 7618-7625.
- Lichtman JW., Conchello JA. (2005) "Fluorescence microscopy". *Nat. Methods* 2 (12), 910-919.
- Link A., Balaguer F., Shen Y., Nagasaka T., Lozano JJ., Boland CR., Goel A. (2010) "Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening". *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19 (7), 1766-1774.
- Link DR., Anna SL., Weitz DA., Stone HA. (2004) "Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices". *Phys. Rev. Lett.* 92 (5), 054503.
- Lion N., Rossier JS., Girault HH. (2006) "Microfluidic Applications in Biology : From Technologies to Systems Biology". Willey-VCH.
- Liu Y., Jung SY., Collier CP. (2009) "Shear-driven redistribution of surfactant affects enzyme activity in well-mixed femtoliter droplets". *Anal. Chem.* 81 (12), 4922-4928.
- Livak KJ., Schmittgen TD. (2001) "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method". *Methods.* 25 (4), 402-408.
- Lowe KC., Davey MR., Power JB. (1998) "Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture". 16 (6), 272-277.

- Lu J., Getz G., Miska EA., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert BL., Mak RH. (2005) "*MicroRNA expression profiles classify human cancers*". *Nature* 435 (7043), 834-848.
- Lu J., Getz G., Miska EA., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert BL., Mak RH., Ferrando AA., Downing JR., Jacks T., Horvitz HR., Golub TR. (2005) "*MicroRNA expression profiles classify human cancers*". *Nature* 435 (7043), 834-838.
- Lu Y., Ryan SL., Elliott DJ., Bignell GR., Futreal PA., Ellison DW., Bailey S., Clifford SC. (2009) "*Amplification and overexpression of Hsa-miR-30b, Hsa-miR-30d and KHDRBS3 at 8q24.22-q24.23 in medulloblastoma*". *PLoS One* 4 (7), e6159.
- Lynam-Lennon N., Maher SG., Reynolds JV. (2009) "*The roles of microRNA in cancer and apoptosis*". *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 84 (1), 55-71.
- Lynn FC. (2009) "*Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism*". *Trends Endocrinol. Metab.* 20 (9), 452-459.
- Maerkl SJ., Quake SR. (2007) "*A systems approach to measuring the binding energy landscapes of transcription factors*". *Science* 315 (5809), 233-237.
- Martino A., Mancuso T., Rossi AM. (2010) "*Application of high-resolution melting to large-scale, high-throughput SNP genotyping: a comparison with the TaqMan method*". *J. Biomol. Screen* 15 (6), 623-629.
- Mason TG., Bibette J., Weitz DA. (1995) "*Elasticity of Compressed Emulsions*". *Phys. Rev. Lett.* 75 (10), 2051-2054.
- Mastrobattista E., Taly V., Chanudet E., Treacy P., Kelly BT., Griffiths AD. (2005) "*High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions*". *Chem. Biol.* 12 (12), 1291-1300.
- Masuda S., Washizu M., Nanba T. (1989). "*Novel Method of Cell-Fusion in Field Constriction Area in Fluid Integrated-Circuit*". *Ieee Trans. Incl. Appl.* 25 (4), 732-737.
- Matheis K., Laurie D., Andriamandroso C., Arber N., Badimon L., Benain X., Bendjama K., Clavier I., Colman P., Firat H., Goepfert J., Hall S., Joos T., Kraus S., Kretschmer A., Merz M., Padro T., Planatscher H., Rossi A., Schneiderhan-Marra N., Schuppe-Koistinen I., Thomann P., Vidal J.M., Molac B. (2011) "*A generic operational strategy to qualify translational safety biomarkers*". *Drug. Discov. Today* 16 (13-14), 600-608.
- Matsumoto S., Kita Y., Yonezawa D. (1976) "*An attempt at preparing water-in-oil-in-water multiple-phase emulsions*". *J. Colloid Interface Sci.* 57 (2), 353-361.
- Mazutis L. (2009) "*Droplet-based microfluidics for protein evolution*". *Université de Strasbourg*

- Mazutis L., Baret JC., Griffiths AD. (2009) "A fast and efficient microfluidic system for highly selective one-to-one droplet fusion". *Lab. Chip.* 9 (18), 2665-2672.
- McKee ML., Milnes PJ., Bath J., Stulz E., O'Reilly RK., Turberfield AJ. (2012) "Programmable one-pot multistep organic synthesis using DNA junctions". *J. Am. Chem. Soc.* 134 (3), 1446-1449.
- McKee ML., Milnes PJ., Bath J., Stulz E., Turberfield AJ., O'Reilly RK. (2010) "Multistep DNA-templated reactions for the synthesis of functional sequence controlled oligomers". *Angew. Chem.* 49 (43), 7948-7951.
- Meguellati K., Koripelly G., Ladame S. (2010) "DNA-templated synthesis of trimethine cyanine dyes: a versatile fluorogenic reaction for sensing G-quadruplex formation". *Angew. Chem.* 49 (15), 2738-2742.
- Mhlanga MM., Malmberg L. (2001) "Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR". *Methods* 25 (4), 463-471.
- Mitchell PS., Parkin RK., Kroh EM., Fritz BR., Wyman SK., Pogosova-Agadjanyan EL., Peterson A., Noteboom J., O'Briant KC., Allen A., Lin DW., Urban N., Drescher CW., Knudsen BS., Stirewalt DL., Gentleman R., Vessella RL., Nelson PS., Martin DB., Tewari M. (2008) "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (30), 10513-10518.
- Mocellin S., Rossi CR., Pilati P., Nitti D., Marincola FM. (2003) "Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research". *Trends. Mol. Med.* 9 (5), 189-195.
- Mogilyansky E., Rigoutsos I. (2013) "The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease". *Cell Death Differ.* 20 (12), 1603-1614.
- Moltzahn F., Olshen AB., Baehner L., Peek A., Fong L., Stöppler H., Simko J., Hilton JF., Carroll P., Blesloch R. (2011) "Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients". *Cancer Res.* 71 (2), 550-560.
- Mookherjee N., El-Gabalawy HS. (2013) "High degree of correlation between whole blood and PBMC expression levels of miR-155 and miR-146a in healthy controls and rheumatoid arthritis patients". *J Immunol. Methods* 400-401, 106-110.
- Moore TL., Kupchik HZ., Marcon N., Zamcheck N. (1971) "Carcinoembryonic antigen assay in cancer of the colon and pancreas and other digestive tract disorders". *Am. J. Dig. Dis.* 16 (1), 1-7.
- Nakano M., Komatsu J., Matsuura S., Takashima K., Katsura S., Mizuno A. (2003) "Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion". *J. Biotechnol.* 102 (2), 117-124.

- Nakashima T., Shimizu M., Kukizaki M. (2000) "*Particle control of emulsion by membrane emulsification and its applications*". *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45 (1), 47-56.
- Naylor R., Gilham PT. (1966) "*Studies on some interactions and reactions of oligonucleotides in aqueous solution*". *Biochemistry* 5 (8), 2722-2728.
- Neely LA., Patel S., Garver J., Gallo M., Hackett M., McLaughlin S., Nadel M., Harris J., Gullans S., Rooke J. (2006) "*A single-molecule method for the quantitation of microRNA gene expression*". *Nat. Methods* 3 (1), 41-46.
- Ng EK., Tsang WP., Ng SS., Jin HC., Yu J., Li JJ., Röcken C., Ebert MP., Kwok TT., Sung JJ. (2009) "*MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer*". *Br. J. Cancer* 101 (4), 699-706.
- Nie Z., Seo M., Xu S., Lewis PC., Mok., Kumacheva E., Whitesides GM., Garstecki P., Stone HA. (2008) "*Emulsification in a microfluidic flow-focusing device: effect of the viscosities of the liquids*". *Microfluidics and Nanofluidics* 5 (5), 585-594.
- Nielsen PE., Egholm M., Berg RH., Buchardt O. (1991) "*Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide*". *Science* 254 (5037), 1497-1500.
- Nisisako T., Torii T., Higuchi T. (2002) "*Droplet formation in a microchannel network*". *Lab. Chip.* 2 (1), 24-26.
- Niu X., Gielen F., deMello AJ., Edel JB. (2009) "*Electro-coalescence of digitally controlled droplets*". *Anal. Chem.* 81 (17), 7321-7325.
- Niu X., Gulati S., Edel JB., deMello AJ. (2008) "*Pillar-induced droplet merging in microfluidic circuits*". *Lab. Chip.* 8 (11), 1837-1841.
- Nuovo G., Lee EJ., Lawler S., Godlewski J., Schmittgen T. (2009) "*In situ detection of mature microRNAs by labeled extension on ultramer templates*". *Biotechniques* 46 (2), 115-126.
- Obernosterer G., Martinez J., Alenius M. (2007) "*Locked nucleic acid-based in situ detection of microRNAs in mouse tissue sections*". *Nat Protoc.* 2 (6), 1508-1514.
- O'Donovan B., Eastburn DJ., Abate AR. (2012) "*Electrode-free picoinjection of microfluidic drops*". *Lab Chip.* 12 (20), 4029-4032.
- Okushima S., Nisisako T., Torii T., Higuchi T. (2004) "*Controlled production of monodisperse double emulsions by two-step droplet breakup in microfluidic devices*". *Langmuir.* 20 (23), 9905-9908.
- Ottesen EA., Hong JW., Quake SR., Leadbetter JR. (2006) "*Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria*". *Science* 314 (5804), 1464-1467.

- Ottino JM., Wiggins S. (2004) "*Applied physics. Designing optimal micromixers*". Science 305 (5683), 485-486.
- Ottino JM., Wiggins S. (2004) "*Introduction: mixing in microfluidics*". Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci. 362 (1818), 923-935.
- Pannacci N., Bruus H., Bartolo D., Etchart I., Lockhart T., Hennequin Y., Willaime H., Tabeling P. (2008) "*Equilibrium and nonequilibrium states in microfluidic double emulsions*". Phys. Rev. Lett. 101 (16), 164502.
- Park NJ., Zhou X., Yu T., Brinkman BM., Zimmermann BG., Palanisamy V., Wong DT. (2006) "*Characterization of salivary RNA by cDNA library analysis*". Arch. Oral Biol. 52 (1), 30-35.
- Pekin D., Skhiri Y., Baret JC., Le Corre D., Mazutis L., Salem CB., Millot F., El Harrak A., Hutchison JB., Larson JW., Link DR., Laurent-Puig P., Griffiths AD., Taly V. (2011) "*Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics*". Lab. Chip. 11 (13), 2156-2166.
- Percivalle C., Bartolo JF., Ladame S. (2013) "*Oligonucleotide-templated chemical reactions: pushing the boundaries of a nature-inspired process*". Org. Biomol. Chem. 11 (1), 16-26.
- Pinheiro LB., Coleman VA., Hindson CM., Herrmann J., Hindson BJ., Bhat S., Emslie KR. (2012) "*Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification*". Anal. Chem. 84 (2), 1003-1011.
- Pipper J., Inoue M., Ng LF., Neuzil P., Zhang Y., Novak L. (2007) "*Catching bird flu in a droplet*". Nat. Med. 13 (10), 1259-1263.
- Popat KC., Desai TA. (2004) "*Poly(ethylene glycol) interfaces: an approach for enhanced performance of microfluidic systems*". Biosens. Bioelectron. 19 (9), 1037-1044.
- Priest C., Herminghaus S., Seemann R. (2006) "*Controlled electrocoalescence in microfluidics: Targeting a single lamella*". Appl. Phys. Lett. 89 (13), 134101.
- Prime KL., Whitesides GM. (1991) "*Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces*". Science 252 (5009), 1164-1167.
- Psaltis D., Quake SR., Yang C. (2006) "*Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics*". Nature 442 (7101), 381-386.
- Quake SR., Scherer A. (2000) "*From micro- to nanofabrication with soft materials*". Science 209 (5496), 1536-1540.
- Rask L., Balslev E., Søkilde R., Høgdall E., Flyger H., Eriksen J., Litman T. (2014) "*Differential expression of miR-139, miR-486 and miR-21 in breast cancer patients sub-classified according to lymph node status*". Cell Oncol. 37 (3), 215-227.

- Ray A., Nordén B. (2000) "*Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future*". *FASEB J.* 14 (9), 1041-1060.
- Raymond CK., Roberts BS., Garrett-Engle P., Lim LP., Johnson JM. (2005) "*Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs*". *RNA* 11 (11), 1737-1744.
- Regazzi R. (2010) "*Diabetes mellitus reveals its micro-signature*". *Circ. Res.* 107 (6), 686,688.
- Reiter G., Khanna R., Sharma A. (2000) "*Enhanced instability in thin liquid films by improved compatibility*". *Phys. Rev. Lett.* 84 (7), 1432-1435.
- Ren Q., Liang J., Wei J., Basturk O., Wang J., Daniels G., Gellert LL., Li Y., Shen Y., Osman I., Zhao J., Melamed J., Lee P. (2014) "*Epithelial and stromal expression of miRNAs during prostate cancer progression*". *Am. J. Transl. Res.* 6 (4), 329-339.
- Riess JG., Greiner J. (2000) "*Carbohydrate- and related polyol-derived fluorosurfactants: an update*". *Carbohydr. Res.* 327 (1-2), 147-168.
- Ro S., Park C., Jin J., Sanders KM., Yan W. (2006) "*A PCR-based method for detection and quantification of small RNAs*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351 (3), 756-763.
- Roa W., Brunet B., Guo L., Amanie J., Fairchild A., Gabos Z., Nijjar T., Scrimger R., Yee D, Xing J. (2010) "*Identification of a new microRNA expression profile as a potential cancer screening tool*". *Clin. Invest. Med.* 33 (2), E124.
- Roach LS., Song H., Ismagilov RF. (2005) "*Controlling nonspecific protein adsorption in a plug-based microfluidic system by controlling interfacial chemistry using fluoruous-phase surfactants*". *Anal. Chem.* 77 (3), 785-796.
- Robertson KD. (2005) "*DNA methylation and human disease*". *Nat. Rev. Genet.* 6 (8), 597-610.
- Rosalki SB. (1967) "*An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination*". *J. Lab. Clin. Med.* 69 (4), 695-705.
- Ruan K., Fang X., Ouyang G. (2009) "*MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer*". 285 (2), 116-126.
- Rubin E., Rumney S., Wang S., Kool ET. (1995) "*Convergent DNA synthesis: a non-enzymatic dimerization approach to circular oligodeoxynucleotides*". *Nucleic Acids Res.* 23 (17), 3547-3553.
- Sagiv J. (1980) "*Organized Monolayers by Adsorption .1. Formation and Structure of Oleophobic Mixed Monolayers on Solid-Surfaces*". *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1), 92-98.

- Saiki RK., Gelfand DH., Stoffel S., Scharf SJ., Higuchi R., Horn GT., Mullis KB., Erlich HA. (1988) "*Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*". Science 239 (4839), 487-491.
- Saiki RK., Scharf S., Faloona F., Mullis KB., Horn GT., Erlich HA., Arnheim N. (1985) "*Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*". Science 230 (4732), 1350-1354.
- Sanders R., Mason DJ., Foy CA., Huggett JF. (2013) "*Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification*". PLoS One 8 (9), e75296.
- Sando S., Kool ET. (2002) "*Quencher as leaving group: efficient detection of DNA-joining reactions*". J. Am. Chem. Soc. 124 (10), 2096-2097.
- Sando S., Abe H., Kool ET. (2004) "*Quenched auto-ligating DNAs: multicolor identification of nucleic acids at single nucleotide resolution*". J. Am. Chem. Soc. 126 (4), 1081-1087.
- Sando S., Kool ET. (2002) "*Imaging of RNA in bacteria with self-ligating quenched probes*". J. Am. Chem. Soc. 124 (33), 9686-9687.
- Sang L., Hong Y., Wang F. (2009) "*Investigation of viscosity effect on droplet formation in T-shaped microchannels by numerical and analytical methods*". Microfluidics and Nanofluidics 6 (5), 621-635.
- Sarraf SA., Stancheva I. (2004) "*Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly*". Mol. Cell. 15 (4), 595-605.
- Satulovsky J., Carignano MA., Szleifer I. (2000) "*Kinetic and thermodynamic control of protein adsorption*". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 (16), 9037-9041.
- Schaerli Y., Wootton RC., Robinson T., Stein V., Dunsby C., Neil MA., French PM., Demello AJ., Abell C., Hollfelder F. (2009) "*Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets*". Anal. Chem. 81 (1), 302-306.
- Schmittgen TD., Jiang J., Liu Q., Yang L. (2004) "*A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors*". Nucleic Acids Res. 32 (4), e43.
- Schmittgen TD., Lee EJ., Jiang J., Sarkar A., Yang L., Elton TS., Chen C. (2008) "*Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA*". Methods. 44 (1), 31-38.
- Schmitz CH., Rowat AC., Köster S., Weitz DA. (2009) "*Dropspots: a picoliter array in a microfluidic device*". Lab. Chip. 9 (1), 44-49.
- Shi W., Qin J., Ye N., Lin B. (2008) "*Droplet-based microfluidic system for individual Caenorhabditis elegans assay*". Lab. Chip. 8 (9), 1432-1435.

- Shibata A., Abe H., Ito M., Kondo Y., Shimizu S., Aikawa K., Ito Y. (2009) "DNA templated nucleophilic aromatic substitution reactions for fluorogenic sensing of oligonucleotides". *Chem. Commun.* 43, 6586-6588.
- Shui L., van den Berg A., Eijkel JC. (2009) "Interfacial tension controlled W/O and O/W 2-phase flows in microchannel". *Lab. Chip.* 9 (6), 795-801.
- Siegel AC., Shevkoplyas SS., Weibel DB., Bruzewicz DA., Martinez AW., Whitesides GM. (2006) "Cofabrication of electromagnets and microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45 (41), 6877-6882.
- Silverman AP., Kool ET. (2006) "Detecting RNA and DNA with templated chemical reactions". *Chem. Rev.* 106 (9), 3775-37889.
- Sjöblom J. (2006) "Emulsions and emulsion stability". Boca Raton, Taylor & Francis.
- Skhiri Y., Gruner P., Semin B., Brosseau Q., Pekin D., Mazutis L., Goust V., Kleinschmidt F., El Harrak A., Hutchison JB., Mayot E., Bartolo JF., Griffiths AD., Taly V., Baret JC. (2012) "Dynamics of molecular transport by surfactants in emulsions". *Soft Matter* 8, 10618-10627.
- Skreka K., Zywicki M., Karbiener M., Hüttenhofer A., Scheideler M., Rederstorff M. (2012) "Expression Profiling of a Heterogeneous Population of ncRNAs Employing a Mixed DNA/LNA Microarray". *J. Nucleic Acids* 2012, 1-10.
- Sochor M., Basova P., Pesta M., Dusilkova N., Bartos J., Burda P., Pospisil V., Stopka T. (2014) "Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum". *BMC Cancer* 14, 448-455.
- Solinas A., Brown LJ., McKeen C., Mellor JM., Nicol J., Thelwell N., Brown T. (2001) "Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications". *Nucleic Acids Res.* 29 (20), E96.
- Song H., Bringer MR., Tice JD., Gerdtz CJ., Ismagilov RF. (2003) "Experimental test of scaling of mixing by chaotic advection in droplets moving through microfluidic channels". *Appl. Phys. Lett.* 83 (12), 4664-4666.
- Song H., Chen DL., Ismagilov RF. (2006) "Reactions in droplets in microfluidic channels". *Angew. Chem.* 45 (44), 7336-7356.
- Song H., Ismagilov RF. (2003) "Millisecond kinetics on a microfluidic chip using nanoliters of reagents". *J. Am. Chem. Soc.* 125 (47), 14613-14619.
- Song H., Tice JD., Ismagilov RF. (2003) "A microfluidic system for controlling reaction networks in time". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (42 (7), 768-772.

- Squires TM., Quake SR. (2005) "*Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale*". Rev. Mod. Phys. 77 (3), 977-1026.
- Srisa-Art M., deMello AJ., Edel JB. (2007) "*High-throughput DNA droplet assays using picoliter reactor volumes*". Anl. Chem. 79 (17), 6682-6689.
- Srisa-Art M., Dyson EC., deMello AJ., Edel JB. (2008) "*Monitoring of real-time streptavidin-biotin binding kinetics using droplet microfluidics*". Anal. Chem. 80 (18), 7063-7067.
- Ståhlberg A., Kubista M., Pfaffl M. (2004) "*Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis*". Clin. Chem. 50 (9) 1678-1680.
- Stanczyk J., Pedrioli DM., Brentano F., Sanchez-Pernaute O., Kolling C., Gay RE., Detmar M., Gay S., Kyburz D. (2008) "*Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis*". Arthritis Rheum. 58 (4), 1001-1009.
- Sykes PJ., Neoh SH., Brisco MJ., Hughes E., Condon J., Morley AA. (1992) "*Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution*". Biotechniques 13 (3), 444-449.
- Takada S., Mano H. (2007) "*Profiling of microRNA expression by mRAP*". Nat. Protoc. 2 (12), 3136-3145.
- Takahashi K., Yan IK., Kim C., Kim J., Patel T. (2014) "*Analysis of extracellular RNA by digital PCR*". Front. Oncol. 4, 129.
- Taly V., Pekin D., El Abed A., Laurent-Puig P. (2012) "*Detecting biomarkers with microdroplet technology*". Trends Mol. Med. 18 (7), 405-416.
- Tan WH., Takeuchi S. (2007) "*A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications*". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (4), 1146-1151.
- Tan YC., Ho YL., Lee AP. (2007). "*Droplet coalescence by geometrically mediated flow in microfluidic channels*". Microfluid. and Nanofluid. 3 (4), 495-499.
- Tan YC., Lee AP. (2005) "*Microfluidic separation of satellite droplets as the basis of a monodispersed micron and submicron emulsification system*". Lab Chip. 5 (10), 1178-1183.
- Tarragó D., Fenoll A., Sánchez-Tatay D., Arroyo LA., Muñoz-Almagro C., Esteva C., Hausdorff WP., Casal J., Obando I. (2008) "*Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR*". Clin. Microbiol. Infect. 14 (9), 828-834.
- Taylor G. (1953) "*Dispersion of Soluble Matter in Solvent Flowing Slowly through a Tube*". Proc. R. Soc. Lond. A 219 (1137), 186-203.
- Teh SY., Lin R., Hung LH., Lee AP. (2008) "*Droplet microfluidics*". Lab. Chip. 8 (2), 198-220.

- Theberge AB., Courtois F., Schaerli Y., Fischlechner M., Abell C., Hollfelder F., Huck WT. (2010) "*Microdroplets in microfluidics: an evolving platform for discoveries in chemistry and biology*". *Angew. Chem.* 82 (9), 3449-3453.
- Thiam AR., Bremond N., Bibette J. (2009) "*Breaking of an emulsion under an ac electric field*". *Phys. Rev. Lett.* 102 (18), 188304.
- Thorsen T., Roberts RW., Arnold FH., Quake SR. (2001) "*Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device*". *Phys. Rev. Lett.* 86 (18), 4163-4166.
- Tice JD., Lyon AD., Ismagilov RF. (2004) "*Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels*". *Anal. Chim. Acta.* 507 (1), 73-77.
- Tice JD., Song H., Lyon AD., Ismagilov RF. (2003) "*Formation of Droplets and Mixing in Multiphase Microfluidics at Low Values of the Reynolds and the Capillary Numbers*". *Langmuir.* 19 (22), 9127-9133.
- Torres A., Torres K., Wdowiak P., Paszkowski T., Maciejewski R. (2013) "*Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues*". *Gynecol. Oncol.* 130 (3), 588-594.
- Um E., Park JK. (2009) "*A microfluidic abacus channel for controlling the addition of droplets*". *Lab. Chip.* 9 (2), 207-212.
- Unger MA., Chou HP., Thorsen T., Scherer A., Quake SR. (2000) "*Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography*". *Science* 288 (5463), 113-116.
- Utada AS., Lorenceau E., Link DR., Kaplan PD., Stone HA., Weitz DA. (2005) "*Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device*". *Science* 308 (5721), 537-541.
- van der Graaf S., Nisisako T., Schroën CG., van der Sman RG., Boom RM. (2006) "*Lattice Boltzmann simulations of droplet formation in a T-shaped microchannel*". *Langmuir.* 22 (9), 4144-4152.
- Veronese A., Pepe F., Chiacchia J., Pagotto S., Lanuti P., Veschi S., Di Marco M., D'Argenio A., Innocenti I., Vannata B., Autore F., Marchisio M., Wernicke D., Verginelli F., Leone G., Rassenti LZ., Kipps TJ., Mariani-Costantini R., Laurenti L., Croce CM., Visone R. (2014) "*Allele-specific loss and transcription of the miR-15a/16-1 cluster in chronic lymphocytic leukemia*". *Leukemia* 1-10.
- Vester B., Wengel J. (2004) "*LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA*". *Biochemistry* 43 (42), 13233-13241.
- Vogelstein B., Kinzler KW. (1999) "*Digital PCR*". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (16), 9236-9241.

- Von Kiedrowski G. (1986) "A Self-Replicating Hexadeoxynucleotide". *Angew. Chem.* 25 (10), 932-935.
- Vyas SM., Turánek J., Knötigová P., Kašná A., Kvardová V., Koganti V., Rankin SE., Knutson BL., Lehmler HJ. (2005) "Synthesis and biocompatibility evaluation of partially fluorinated pyridinium bromides". *Nex J. Chem.* 30, 944-951.
- Walter NG., Huang CY., Manzo AJ., Sobhy MA. (2008) "Do-it-yourself guide: how to use the modern single-molecule toolkit". *Nat. Methods* 5 (6), 475-489.
- Wang K., Lu YC., Xu JH., Luo GS. (2009) "Determination of dynamic interfacial tension and its effect on droplet formation in the T-shaped microdispersion process". *Langmuir.* 25 (4), 2153-2158.
- Wang M., Xie H., Mi S., Chen J. (2007) "Recent patents on the identification and clinical application of microRNAs and target genes". *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 1 (2), 116-124.
- Wang S., Kool ET. (1994) "Circular RNA oligonucleotides. Synthesis, nucleic acid binding properties, and a comparison with circular DNAs". *Nucleic Acids Res.* 22 (12), 2326-2333.
- Wang W., Yang C., Li CM. (2009) "On-demand microfluidic droplet trapping and fusion for on-chip static droplet assays". *Lab. Chip.* 9 (11), 1504-1506.
- Wang Y., Shi J., Wu Y., Xu W., Wang Q., Zhang J., Jiang M., Gu G. (2012) "Use of Luminex xMAP bead-based suspension array for detecting microRNA in NSCLC tissues and its clinical application". *Tumori.* 98 (6), 792-799.
- Ward T., Faivre M., Abkarian M., Stone HA. (2005) "Microfluidic flow focusing: drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping". *Electrophoresis* 26 (19), 3716-3724.
- Wark AW., Lee HJ., Corn RM. (2008) "Multiplexed detection methods for profiling microRNA expression in biological samples". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (4), 644-652.
- Weller SA., Elphinstone JG., Smith NC., Boonham N., Stead DE. (2000) "Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay". *Appl. Environ Microbiol.* 66 (7), 2853-2858.
- Whitesides GM. (2006) "The origins and the future of microfluidics". *Nature* 442 (7101), 368-373.
- Whitesides GM., Ostuni E., Takayama S., Jiang X., Ingber DE. (2001) "Soft lithography in biology and biochemistry". *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 3, 335-373.
- Willaime H., Barbier V., Kloul L., Maine S., Tabeling P. (2006) "Arnold tongues in a microfluidic drop emitter". *Phys. Rev. Lett.* 96 (5), 054501.
- Williams R., Peisajovich SG., Miller OJ., Magdassi S., Tawfik DS., Griffiths AD. (2006) "Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR". *Nat. Methods* 3 (7), 545-550.

- Xia Y., Whitesides GM. (1998) "Soft lithography" *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (5), 551-575.
- Xia Y., Whitesides GM. (1998) "Soft lithography" *Annu. Rev. Mater. Sci.* 28, 153-184.
- Xiang X., Chen L., Zhang C., Luo M., Ji X., He Z. (2012) "A fluorescence-based colorimetric droplet platform for biosensor application to the detection of α -fetoprotein". *Analyst.* 137 (23), 5586-5591.
- Xu JH., Luo GS., Li SW., Chen GG. (2006) "Shear force induced monodisperse droplet formation in a microfluidic device by controlling wetting properties". *Lab. Chip.* 6 (1), 131-136.
- Xu Q., Hashimoto M., Dang TT., Hoare T., Kohane DS., Whitesides GM., Langer R., Anderson DG. (2009) "Preparation of monodisperse biodegradable polymer microparticles using a microfluidic flow-focusing device for controlled drug delivery". *Small.* 5 (13), 1575-1581.
- Xu Y., Karalkar NB., Kool ET. (2001) "Nonenzymatic autoligation in direct three-color detection of RNA and DNA point mutations". *Nat. Biotechnol.* 19 (2), 148-152.
- Xu Y., Kool ET. (1999) "High sequence fidelity in a non-enzymatic DNA autoligation reaction". *Nucleic Acids Res.* 27 (3), 875-881.
- Yang MH., Yu J., Chen N., Wang XY., Liu XY., Wang S., Ding YQ. (2013) "Elevated microRNA-31 expression regulates colorectal cancer progression by repressing its target gene SATB2". *PLoS One* 8 (12), e85353.
- Yang P., Wirnsberger G., Huang HC., Cordero SR., McGehee MD., Scott B., Deng T., Whitesides GM., Chmelka BF., Buratto SK., Stucky GD. (2000) "Mirrorless lasing from mesostructured waveguides patterned by soft lithography". *Science* 287 (5452), 465-468.
- Yobas L., Martens S., Ong WL., Ranganathan N. (2006) "High-performance flow-focusing geometry for spontaneous generation of monodispersed droplets". *Lab. Chip.* 6 (8), 1073-1079.
- Yun KS., Yoon E. (2008) "Fabrication of complex multilevel microchannels in PDMS by using three-dimensional photoresist masters". *Lab. Chip.* 8 (2), 245-250.
- Zagnoni M., Baroud CN., Cooper JM. (2009) "Electrically initiated upstream coalescence cascade of droplets in a microfluidic flow". *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 80 (4), 046303.
- Zeng S., Li B., Su X., Qin J., Lin B. (2009) "Microvalve-actuated precise control of individual droplets in microfluidic devices". *Lab. Chip.* 9 (10), 1340-1343.
- Zhang DZ., Lau KM., Chan ES., Wang G., Szeto CC., Wong K., Choy RK., Ng CF. (2014) "Cell-Free Urinary MicroRNA-99a and MicroRNA-125b Are Diagnostic Markers for the Non-Invasive Screening of Bladder Cancer". *PLoS One* 9 (7), e100793.

- Zhang GJ., Chua JH., Chee RE., Agarwal A., Wong SM. (2009) "*Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors*". *Biosens. Bioelectron.* 24 (8), 2504-2508.
- Zhang QM., He SJ., Shen N., Luo B., Fan R., Fu J., Luo GR., Zhou SF., Xiao SW., Xie XX. (2014) "*Overexpression of MAGE-D4 in colorectal cancer is a potentially prognostic biomarker and immunotherapy target*". *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7 (7), 3917-3927.
- Zheng B., Tice JD., Ismagilov RF. (2004) "*Formation of droplets of alternating composition in microfluidic channels and applications to indexing of concentrations in droplet-based assays*". *Anal. Chem.* 76 (17), 4977-4982.
- Zheng B., Tice JD., Roach LS., Ismagilov RF. (2004) "*A droplet-based, composite PDMS/glass capillary microfluidic system for evaluating protein crystallization conditions by microbatch and vapor-diffusion methods with on-chip X-ray diffraction*". *Angew. Chem.* 43 (19), 2508-2511.
- Zhong Q., Bhattacharya S., Kotsopoulos S., Olson J., Taly V., Griffiths AD., Link DR., Larson JW. (2011) "*Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR*". *Lab. Chip.* 11 (7), 2167-2174.
- Zhu Y., Fang Q. (2013) "*Analytical detection techniques for droplet microfluidics--a review*". *Anal. Chim. Acta.* 787, 24-35.
- Zhu YJ., Xu B., Xia W. (2014) "*Hsa-mir-182 downregulates RASA1 and suppresses lung squamous cell carcinoma cell proliferation*". *Clin. Lab.* 60 (1), 155-159.
- Zhu Z., Jenkins G., Zhang W., Zhang M., Guan Z., Yang CJ. (2012) "*Single-molecule emulsion PCR in microfluidic droplets*". *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (8), 2127-2143.
- Zimmermann M., Mueller T., Dieplinger B., Bekos C., Beer L., Hofbauer H., Dome B., Ankersmit HJ. (2014) "*Circulating heat shock protein 27 as a biomarker for the differentiation of patients with lung cancer and healthy controls--a clinical comparison of different enzyme linked immunosorbent assays*". *Clin Lab.* 60 (6), 999-1006.

Développement de sondes et de systèmes microfluidiques pour la détection de nouveaux biomarqueurs spécifiques

Résumé

L'efficacité des traitements contre diverses pathologies dépend dans bien des cas de la précocité de la prise en charge des patients. Ce contexte pousse de nos jours les chercheurs à élaborer de nouvelles méthodes de diagnostic, généralement basées sur la détection de biomarqueurs spécifiques, permettant d'établir une corrélation entre un dérèglement moléculaire de l'organisme et la survenue d'une maladie.

L'objectif de ces travaux était, par l'utilisation de la microfluidique digitale en gouttelettes, d'établir de nouvelles procédures simples et reproductibles, témoignant d'une sensibilité importante afin de déterminer d'infimes variations de l'état moléculaire de l'organisme à travers la recherche de biomarqueurs spécifiques. Pour cela nous avons élaboré une nouvelle gamme de tensioactifs fluorés adaptés aux applications biologiques en microfluidique digitale, ainsi que différentes stratégies d'étude des variations de l'expression de microARN extrait d'échantillons biologiques, basées respectivement sur les réactions induites par hybridation nucléotidique et sur la réaction de RT-PCR digitale.

Mots-clés : Microfluidique en gouttelettes, PCR digitale, microARN, tensioactifs.

Summary

Efficiency of treatments for various diseases depends in many cases in precocity of patient management. Nowadays, this context urges researchers to develop new methods of diagnosis, generally based on the detection of specific biomarkers. These new methods allowing to establish correlations between physiological disorders and arisen of diseases states.

The aim of this study was, by the use of droplet-based microfluidic, to work out a simple and reproducible procedure, with an increased sensitivity, to determine tiny variations of physiological state through the detection of specific biomarkers. Thus, we developed a new range of fluorinated surfactants fitted to biological applications in droplet-based microfluidics as well as various strategies to study variations of microRNA expressions in a biological sample. These methods, based on DNA-template reaction and digital PCR reaction, allows performing a substantial number of simultaneous reactions in micro-compartments (microdroplets) of picolitre volumes.

Keywords: Droplet-based microfluidic, digital PCR, microRNA, DNA-template reaction, surfactants.