



**HAL**  
open science

# Microfluidique papier : de la physique des écoulements au diagnostic du virus Ebola en Guinée

Laura Magro

► **To cite this version:**

Laura Magro. Microfluidique papier : de la physique des écoulements au diagnostic du virus Ebola en Guinée. Mécanique des fluides [physics.class-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066281 . tel-01449347

**HAL Id: tel-01449347**

**<https://theses.hal.science/tel-01449347>**

Submitted on 30 Jan 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

**Microfluidique**

(ED 391 - SMAER)

Préparée au LABORATOIRE GULLIVER - MMN

Présentée par

**Laura MAGRO**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Microfluidique papier : De la physique des écoulements  
au diagnostic du virus Ebola en Guinée**

Soutenance prévue le 19 octobre 2016

devant le jury composé de :

M.	<b>BODIGUEL</b>	Hugues	<b>Rapporteur</b>
M.	<b>FOUILLET</b>	Yves	<b>Rapporteur</b>
Mme	<b>BEN AMAR</b>	Martine	<b>Examinatrice</b>
Mme	<b>EVAIN-BRION</b>	Danièle	<b>Membre invité</b>
M.	<b>LAFAYE</b>	Pierre	<b>Membre invité</b>
M.	<b>MONTI</b>	Fabrice	<b>Co-Directeur de thèse</b>
M.	<b>TABELING</b>	Patrick	<b>Directeur de thèse</b>



---

## Remerciements

---

Que le lecteur m'excuse par avance pour ces peut-être un peu longs remerciements. Je ne me résous pas à laisser ce manuscrit sans une petite dédicace à toutes les personnes croisées lors de ces trois années. J'en oublierai pourtant probablement ... A ceux-là pardonnez ma maladresse, je vous remercie au même titre que les autres !

Pour commencer, j'aimerais remercier chaleureusement MM. Bodiguel et Fouillet d'avoir accepté de rapporter ma thèse, pour le temps qu'ils y ont consacré et les nombreux commentaires pertinents qu'ils m'ont fait parvenir. Je remercie également l'ensemble des membres du jury pour leur participation à l'évaluation de mes travaux de thèse.

Je suis particulièrement reconnaissante envers Patrick Tabeling et Fabrice Monti pour l'encadrement pendant ces trois ans de thèse. Patrick, merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet qui me tenait à cœur. Nos discussions scientifiques ont contribué à donner toujours plus de hauteur à ce projet. Fabrice, tu as manifesté rapidement ton envie de suivre de plus près ma thèse. Je te remercie pour tes précieux conseils, ton humour irremplaçable et le suivi lors de notre rendez-vous hebdomadaire.

La belle rencontre avec l'Institut Pasteur a été rendue possible par l'émission de radio *La tête au Carré* de Mathieu Vidard et par le tentaculaire réseau PC1 (Raphaëlle Thévenin et Pierre Legrain). Béatrice, quelle bonne idée tu as eu de te rendre disponible pour la *Task Force Ebola* ! Mille mercis pour ces vendredis 13 de manips, les doutes et les grandes réussites partagés ensemble, cet été incroyable en Guinée, nos boîtes de papier échangées sur les trottoirs du 5ème ou du 15ème arrondissement ("nos deals"), ta disponibilité et ton sourire. Pierre L., ton accompagnement a été indispensable pour défendre le projet dès le début sans compter ton temps pour les fastidieuses démarches administratives ! Jean-Claude et les filles de la CIBU ont été une part essentielle de cette collaboration. Votre expertise sur le diagnostic moléculaire et les conditions de terrain a été très précieuse. Jessica et Camille, merci pour votre regard objectif sur le projet, vos conseils avisés sur les problèmes expérimentaux et cette dynamique positive que vous entretenez si bien. Aurélia, tu n'as pas eu la partie la plus facile ... Merci pour ces nombreux essais, toutes ces après-midis que tu es venue passer à l'IPGG, ta patience envers une non-biologiste

et ton adoration des minions ! Je tiens à remercier le plus discret Anavaj et ses remarques justes.

Voyager en Guinée avec la Croix Rouge française a été une chance inestimable pour moi : constater les dégâts humains causés par l'épidémie et les forces déployées pour la contrer a donné encore plus de sens aux motivations de ce sujet de thèse. Il n'a été possible que par le travail conjoint de nombreuses personnes. Je remercie MicroFactory et R&D Vision pour la réalisation de la valise en un temps record, l'aide administrative de Florence Boulogne, Mialy Rabenoro et Kathleen Victoir, la prise en charge et l'accueil par les expatriés de la Croix Rouge française (Baptiste, Laurence, Mathieu, Docteur Fleury, ...). De Moriba, le laborantin du laboratoire d'analyses, à Suzanne, la cuisinière de la base 18, ces rencontres guinéennes sont riches de sens.

La fondation PremUp par son action de santé publique par la recherche scientifique sur la santé de la mère et de l'enfant, a apporté une orientation nouvelle à mon sujet de thèse. J'aurais aimé y consacrer plus de temps pour apporter ma contribution à cette mission menée par Danièle Evain-Brion. Je remercie Jean Guibourdenche pour nos réunions et ces premiers échanges entre Cochin et l'IPGG. Géromine, nos après-midi de manips sur le plateau IPGG ont été vraiment utiles et agréables, merci de ton aide et de ta bonne humeur. Aux dynamiques et inspirantes Laure et Karine, merci pour votre engagement féministe. Je vous dois en partie cette bourse L'Oréal-UNESCO et les belles aventures qui en ont découlé !

L'enthousiasmante collaboration avec bioMérieux s'est arrêtée trop tôt. Malgré tout, je remercie chaleureusement Christine Rozand, Agnès Rubens, Laurent Boulet et Marie-Pierre Montet pour les échanges constructifs.

Je tiens à remercier Karla Balaa, Laurie Bara, Antoine Blin et Jacques Lewiner pour leur accompagnement et leur pédagogie dans la valorisation de la recherche, lors des dépôts de brevet. Je remercie également tout ceux qui ont participé à mettre en lumière le projet : les services de communication de l'ESPCI et de l'IPGG, l'Espace des Sciences Pierre-Gilles de Gennes, le projet Lutétium, ...

J'ai eu le plaisir de travailler avec plusieurs stagiaires qui ont apporté une contribution non négligeable à ma thèse. A ce titre, je remercie particulièrement Paul, président du BDE des Mines mais PC1 dans l'âme, Claire que l'on aurait tant aimé garder plus longtemps au laboratoire (tes archives de stage sont les plus agréables à parcourir !) et Pierre, le musicien-médecin pour qui l'aventure de la thèse au MMN démarre tout juste. A toi de jouer avec le papier !

Le laboratoire MMN a été un environnement incroyable pour passer en douceur de l'insouciance de la première année vers la pression de la rédaction de thèse. Les bons moments comme les "vortex de la loose" se partagent autour d'un bon café à 16h04 avec Corentin, autour d'un petit-déj du mercredi avec mon co-bureau Vincent, autour d'une session tricot-photos de neveux avec Marie et Fériel, entre deux blind-tests *ChanteFrance* avec Axel, entre deux conseils LaTeX donnés à Loïc, autour d'une plancha d'Eliau, lors d'une discussion féministe engagée avec Marine, Margaux et Gustavo, entre deux confidences avec Cesare, entre deux actions de

la brigade MMN. Beaucoup de fameuses réunions ANR et puits de potentiel ... Je n'oublierai pas le voyage au ski organisé par Perrine et Stéphanie, et les vidéos gênantes qui traînent au fond de quelques disques durs. A ces inoubliables karaokés coréens avec Loïc et Fabrice. Marine Begazu (docteur Bengazu non ?) ma co-princesse, j'ai été ravie de partager l'aventure L'Oréal avec toi et avec l'attachante communauté des boursières. Charlotte, merci encore pour le prêt du lit-parapluie (oui je te le rends bientôt mes magnifiques neveux doivent être assez grands maintenant !) Aux anciens comme aux nouveaux, du laboratoire MMN ou des environs, merci pour ce quotidien agréable : Anne-Laure, Anaïs, Lucrezia, Jules, Alexandre, Emilie, Bruno, Cécile, Lorène, Benjamin, Joshua, Pavel, Bingqing, Elisabeth, Caro, les deux Guillaume, Géromine, Manon, Mériam, Sylvia, ...

La soutenance de thèse marque la fin de ces années PCn rendues inoubliables par de belles amitiés. L'équipe de la Trololoc - Charc & Marlène, Dorian, Jb - à Bourg-la-Reine ou à Bèze, merci pour ces grands moments (depuis le repas du 6ème à la Rez jusqu'au retour de la remise de diplôme) et tous ceux à venir. Les bananas Vincent & Thibaut (et les papillons), je reste surprise du si peu de marche qu'on peut faire en week-end randonnée ensemble ... A tous les CherrySM, aux participants de la Grande Joie du mercredi, aux soirées filles, aux projets PC Coup d'Pouce et SoScience, à cette belle famille PCn, mille mercis !

Ces années ont également été ponctuées par de nombreux rendez-vous avec les Bichons : Vanves, Paris, Guipavas, Genève, Malmö, Londres, Bangkok, Phnom Penh. Merci de votre accueil dans cette belle communauté vanvéenne : Rasay, Cécile, Louise, David, Jeanne, Vincent, Teddy, Elsa, Oscar, Oriane, Géraldine, Laureen, Thévy, Sylvain, Laëtitia, Eric et Maria, Corentin, ... et au plaisir de se retrouver pour les prochains évènements !

Je tiens à remercier ma Maman pour sa relecture attentive des moindres recoins de ce manuscrit pour le nettoyer de toute coquille. Merci surtout pour toutes ces années d'accompagnement dans la tolérance et le droit à l'erreur. Papa, le coach, avec toi c'était surtout la persévérance et le dépassement de soi sur les terrains de tennis. A mes sœurs Alice et Véronique, les supers nanas!, merci pour cette complicité partagée toutes les trois dans tous les moments de nos vies. Surtout, merci à vous quatre pour votre amour et votre soutien. La famille c'est aussi Pep & Nini, Fabienne, Pascal et Cyril, Hélène, Marc et les cousins, elle compte aujourd'hui de nombreuses "pièces rapportées" qui lui donnent de nouvelles couleurs : Sabri, Guillaume, Marc, Dominique, Christophe & Emilie, Laurent & Albin. Un grand merci à Danièle et Jean-Marc, Quentin, Thibaut, Mamie, Christian et Mireille, Florian, Pierre, pour m'avoir hébergée, invitée, accueillie plus d'une fois dans leur famille.

Le mot de la fin revient à Jean-Baptiste : ton soutien, ta patience, ta douceur me rendent plus sereine et c'était ô combien important pour rester confiante pendant la thèse. Merci à mon excellent et créatif partenaire de danse, mon compagnon de voyage, mon amoureux au quotidien.



**Microfluidique papier :  
De la physique des écoulements au diagnostic du virus Ebola en Guinée**

---

Les propriétés du papier - pompe capillaire, prix et disponibilité - lui permettent de répondre à tout type de contraintes logistiques et économiques d'un diagnostic médical de terrain. En amont de l'application, nous avons étudié les écoulements dans des géométries confinées par des barrières de cire. Une focalisation hydrodynamique associée à l'évaporation, crée un effet de concentrateur atteignant un facteur d'amplification de 1000. La continuité du diagnostic depuis le terrain jusqu'au laboratoire, est assurée par des dispositifs hybrides papier-microsystèmes. Dans cette thèse, l'élution d'échantillons séchés dans le papier est quantifiée et sa compatibilité avec diverses fonctions microfluidiques démontrée.

Nous nous sommes intéressés à deux applications de diagnostic : la détection d'un biomarqueur cardiaque par immunoessai et celle du virus Ebola par amplification d'acides nucléiques (RT-RPA). Avec un dispositif papier simple et une révélation colorimétrique, la troponine a été détectée jusqu'à une concentration de 1 ng/mL. Le diagnostic précoce de maladies infectieuses est rendu possible par la biologie moléculaire sur papier. Après des développements en laboratoire sur ARN synthétiques, des expériences réalisées en Guinée, sur des échantillons cliniques, à partir de papiers prêts à l'emploi, avec une instrumentation transportable ont atteint une sensibilité à 85,3%. Le multiplexage du diagnostic est obtenu dans des géométries multicouches par la réalisation simultanée de tests et contrôles. Enfin, l'application à d'autres pathogènes, comme HIV et la Dengue, a montré les limites du papier et de son environnement bio-chimique non contrôlé.

**Mots clés :**

microluidique papier, concentration, élution, NAAT, Ebola, RT-RPA





**Paper microfluidics :  
From liquid flow studies to Ebola virus diagnostics in Guinea**

---

Paper properties - such as capillary pump, affordability and availability - made it suitable for medical diagnostics in logistic and economic field constraints. Upstream of application, we studied liquid flows in wax-confined geometries. Hydrodynamic focus coupled to evaporation creates a concentrator effect reaching an amplification factor about 1000. Diagnosis continuity from the point of care to testing laboratory is insured thanks to hybrid paper-microsystem devices. In this thesis, the elution of dried samples in paper is quantified and its compatibility with various microfluidic functions demonstrated.

We were interested in two diagnostics applications : detection of a cardiac biomarker by immunoassay and of Ebola virus by nucleic acids amplification (RT-RPA). With simple paper device and a colorimetric signal, Troponin has been detected until a concentration of 1 ng/mL. Early diagnostics of infectious diseases is made possible with molecular biology on paper. After laboratory preliminary developments on synthetic RNA strains, experiments performed in Guinea with clinical samples, from ready to use papers, with carry-on equipment achieved a sensitivity of 85,3%. Multiplexed diagnostics is obtained in multilayered geometries enabling simultaneous tests and controls. Finally, application to other pathogenes, like HIV and Dengue, showed paper limits from its uncontrolled bio-chemical environment.

**Key words :**

paper microfluidics, concentration, elution, NAAT, Ebola, RT-RPA



# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>I Etat de l'art : le papier comme plateforme microfluidique</b>	<b>5</b>
<b>1 Physique des écoulements dans la microfluidique papier</b>	<b>7</b>
1.1 Etude des écoulements pour un laboratoire sur puce . . . . .	9
1.1.1 Principes physiques de la microfluidique . . . . .	9
1.1.2 Forces capillaires dans les microcanaux . . . . .	12
1.1.3 Puces microfluidiques capillaires . . . . .	14
1.2 Le support papier . . . . .	16
1.2.1 Les forces capillaires dans le papier . . . . .	16
1.2.2 Propriétés physico-chimiques du papier . . . . .	22
1.3 La microfluidique papier . . . . .	24
1.3.1 Techniques de fabrication . . . . .	24
1.3.2 Illustration de fonctions microfluidiques . . . . .	29
1.4 Limites du support papier . . . . .	32
1.4.1 Seuil de détection . . . . .	32
1.4.2 Description de la physique des écoulements . . . . .	33
1.5 Ce qu'il faut retenir . . . . .	34
<b>2 Applications de diagnostic médical sur papier</b>	<b>35</b>
2.1 Le papier dans les sciences analytiques . . . . .	37
2.1.1 Exemples de dispositifs papiers . . . . .	37
2.1.2 Les tests bandelettes . . . . .	38
2.1.3 Prélèvements séchés sur papier . . . . .	40
2.2 Préparation d'échantillons biologiques . . . . .	41
2.2.1 Protocoles standard en laboratoire . . . . .	41
2.2.2 Exemples de préparations sur papier . . . . .	42
2.2.3 Purification d'acides nucléiques sur papier . . . . .	44
2.3 Détection de pathogènes directe/indirecte . . . . .	46
2.3.1 Microscopie et culture cellulaire . . . . .	46
2.3.2 Tests de biologie moléculaire . . . . .	47
2.3.3 Immunoessais . . . . .	50
2.3.4 Comparaison des trois méthodes . . . . .	51
2.4 Tests de biologie moléculaire sur papier . . . . .	53
2.4.1 Détection d'acides nucléiques sur papier . . . . .	53

2.4.2	Amplification d'acides nucléiques sur papier . . . . .	57
2.5	Enjeux de cette thèse . . . . .	60
2.5.1	Utiliser la physique des écoulements pour améliorer la limite de détection	60
2.5.2	Développer les performances des systèmes standard . . . . .	61
2.5.3	De nouvelles solutions de diagnostic pour le virus Ebola . . . . .	62
2.6	Ce qu'il faut retenir . . . . .	63

## **II Développement de nouvelles fonctions microfluidiques à partir du support papier** **65**

### **3 Concentration d'échantillons par des écoulements capillaires confinés** **67**

3.1	Conditions expérimentales . . . . .	69
3.1.1	Dispositifs papier . . . . .	69
3.1.2	Visualisation des écoulements . . . . .	70
3.1.3	Conditions extérieures . . . . .	73
3.2	Analyse des effets du confinement sur les écoulements capillaires . . . . .	77
3.2.1	Etude de la diffusion de la cire . . . . .	77
3.2.2	Mise en évidence des contributions de l'imbibition capillaire et de l'étalement de goutte aux écoulements dans le papier . . . . .	82
3.3	Exploitation des propriétés du papier pour concentrer des échantillons . . . . .	86
3.3.1	Démonstration d'un concentrateur par rétention spatiale . . . . .	86
3.3.2	Concentration par focalisation hydrodynamique . . . . .	90
3.3.3	Optimisation de la focalisation hydrodynamique par rétention chromatographique . . . . .	97
3.4	Ce qu'il faut retenir . . . . .	100

### **4 Microsystèmes pour l'élution d'échantillons séchés sur papier** **103**

4.1	Conditions expérimentales . . . . .	105
4.1.1	Fabrication des microsystèmes hybrides . . . . .	105
4.1.2	Nature des échantillons séchés sur papier . . . . .	108
4.1.3	Dispositifs de mesures de l'élution . . . . .	108
4.2	Etude des écoulements dans les microsystèmes hybrides avec bandelette de papier	111
4.2.1	Configuration d'écoulements monophasiques . . . . .	111
4.2.2	Influence du papier sur les écoulements diphasiques . . . . .	113
4.2.3	Limites du dispositif . . . . .	116
4.3	Analyse quantitative de l'élution en microcanaux à partir de disques de papier	117
4.3.1	Mesures de fluorescence . . . . .	117
4.3.2	Analyse de composés élémentaires . . . . .	119
4.3.3	Application à l'élution de la $\beta$ -hCG . . . . .	126
4.4	Ce qu'il faut retenir . . . . .	128

<b>III Réalisation d'outils de diagnostic médical sur papier : de la troponine au virus Ebola</b>	<b>131</b>
<b>5 Détection d'un biomarqueur cardiaque par un immunoessai sur papier</b>	<b>133</b>
5.1 Conditions expérimentales . . . . .	135
5.1.1 Réaction biologique . . . . .	135
5.1.2 Dispositif papier . . . . .	136
5.1.3 Protocole . . . . .	136
5.2 Réalisation d'un immunoessai sur papier pour la détection de troponine . . . . .	137
5.2.1 Description du principe de fonctionnement . . . . .	137
5.2.2 Synthèse des principaux résultats expérimentaux . . . . .	139
5.3 Ce qu'il faut retenir . . . . .	145
<b>6 Application au diagnostic précoce de maladies infectieuses par la biologie moléculaire sur papier</b>	<b>147</b>
6.1 Conditions expérimentales . . . . .	150
6.1.1 Protocoles biologiques . . . . .	150
6.1.2 Dispositifs papier . . . . .	152
6.1.3 Instrumentation . . . . .	156
6.2 Réalisation de l'amplification LAMP sur papier . . . . .	160
6.2.1 Caractérisation de la LAMP en microtube . . . . .	160
6.2.2 Etude de la compatibilité avec les matériaux des puces papier . . . . .	162
6.2.3 Réaction LAMP sur papier . . . . .	166
6.3 Détection d'ARN Ebola par RT-RPA sur papier . . . . .	169
6.3.1 Caractérisation de la RT-RPA en microtube . . . . .	169
6.3.2 Réaction RT-RPA sur papier . . . . .	171
6.3.3 Expériences sur des échantillons cliniques en Guinée . . . . .	179
6.4 Parallélisation des expériences pour un diagnostic multiplexé . . . . .	185
6.4.1 Etude des propriétés d'écoulement . . . . .	185
6.4.2 Résultats biologiques . . . . .	193
6.4.3 Bilan du multiplexage . . . . .	197
6.5 RT-RPA pour la détection d'autres pathogènes . . . . .	198
6.5.1 Amplification d'acides nucléiques HIV et Dengue sur papier Whatman . . . . .	198
6.5.2 Influence de l'environnement imposé par le papier . . . . .	203
6.6 Ce qu'il faut retenir . . . . .	206
<b>Conclusions et Perspectives</b>	<b>209</b>
<b>A Evaluation des tests diagnostiques</b>	<b>213</b>
A.1 Phases de développement d'un test diagnostique . . . . .	213
A.1.1 Preuve de Concept . . . . .	213
A.1.2 Etude de cas-témoins . . . . .	214
A.1.3 Application à une cohorte . . . . .	214
A.2 Définition des indices de performances . . . . .	215
A.2.1 Sensibilité, spécificité . . . . .	215

A.2.2	Courbe ROC . . . . .	216
A.3	Discussion des biais . . . . .	217
A.3.1	Construction de l'étude . . . . .	217
A.3.2	Définition du Gold Standard . . . . .	217
A.3.3	Analyse de classes latentes . . . . .	218
<b>B</b>	<b>Protocoles biologiques d'amplification d'acides nucléiques</b>	<b>219</b>
B.1	LAMP : loop-mediated isothermal amplification . . . . .	219
B.2	RT-RPA : reverse transcription and recombinase proteins amplification . . . . .	219
B.2.1	Préparation du mélange réactionnel . . . . .	220
B.2.2	Expérience d'amplification . . . . .	220
<b>C</b>	<b>Un centre de traitement Ebola à Macenta en Guinée</b>	<b>221</b>
C.1	Carnets de voyage . . . . .	222
C.2	Organisation du Centre de Traitement Ebola . . . . .	224
C.2.1	Services techniques . . . . .	225
C.2.2	Accueil des patients . . . . .	225
C.2.3	Rôle social . . . . .	228
	<b>Communications scientifiques</b>	<b>231</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>235</b>

---

## Nomenclature

---

- $a$  : une longueur caractéristique
- $L$  : la longueur d'un microcanal
- $h$  : l'épaisseur d'un microcanal
- $w$  : la largeur d'un microcanal
- $r$  : le rayon interne d'un capillaire
- $r(t), r_0$  : le rayon d'une goutte
- $R$  : le rayon de courbure
- $H$  : la hauteur de liquide
- $l(t)$  : la position du front liquide
- $l_c$  : la longueur capillaire
- $\theta$  : l'angle de contact
- $r^*$  : la rugosité
- $f$  : la fraction surfacique
- $\epsilon$  : la porosité
- $k$  : la perméabilité
- $e$  : l'épaisseur du papier
- $V$  : le volume
- $s$  : la surface
- $\rho$  : la masse volumique
- $\mu$  : la viscosité dynamique
- $\gamma$  : la tension de surface
- $D$  : le coefficient de diffusion
- $c$  : la concentration
- $p$  : la largeur de la zone d'accumulation
- $Re$  : le nombre de Reynolds
- $Ca$  : le nombre capillaire
- $Bo$  : le nombre de Bond
- $Pe$  : le nombre de Peclet
- $N$  : le rapport N
- $g$  : l'accélération de la pesanteur
- $S$  : le paramètre d'étalement
- $\vec{v} = (v_x, v_y, v_z)$  : le vecteur vitesse
- $P$  : la pression
- $\Delta P$  : la différence de pression
- $\Delta$  : l'opérateur Laplacien
- $P_0$  : la pression atmosphérique
- $P_A, P_B$  : la pression au point A, B
- $Q$  : le débit
- $R_h$  : la résistance hydrodynamique
- $R_{th}$  : la résistance thermique
- $R_{elec}$  : la résistance électrique
- $T$  : la température
- $T_{amb}$  : la température ambiante
- $U$  : la tension
- $I$  : l'intensité de fluorescence
- $\alpha\beta$  : des paramètres ajustables





---

## Liste des abréviations

---

- $\beta$ -hCG :  $\beta$ -hormone Chorionique Gonadotrope
- $\mu$ -PAD : micro-Paper Analytical Devices
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- AKD : Alkyl Kétène Dimère
- ARN : Acide RiboNucléique
- AUC : Area Under Curve
- BSA : Bovine Serum Albumine
- C+ : Contrôle positif
- C- : Contrôle négatif
- CTE : Centre de Traitement Ebola
- DBS : Dried Blood Spot
- ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- FAM : 6-Carboxyfluorescéine
- GFP : Green Fluorescent Protein
- HDA : Helicase Dependant Amplification
- HIV : Virus d'Immunodéficience Humaine
- ICP-OES : Inductively-Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry
- IPGG : Institut Pierre-Gilles de Gennes pour la microfluidique
- LAMP : Loop-Mediated Isothermal Amplification
- NAAT : Nucleic-Acids Amplification Test
- NASBA : Nucleic Acid Sequence Based Amplification
- ONG : Organisation Non Gouvernementale
- ONU : Organisation des Nations Unies
- PAH : Poly Allylamine Hydrochloride
- PAL : Phosphatase Alcaline
- PBS : Phosphate Buffer Saline
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PDMS : Poly-Di(Méthyl)Siloxane
- PES : Poly Ether Sulfone
- PIV : Particle Image Velocimetry

- POC : Point of Care - au chevet du patient
- RCA : Rolling Circle Amplification
- ROC : Receiver Operating Curve
- RPA : Recombinase Proteins Amplification
- RT : Reverse Transcription
- ST : Sample Test
- STARD : Standards for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy
- TAT : Turn-Around Time - temps de traitement
- UNHAS : United Nations Humanitarian Air Services
- UV : Ultra-Violet

EN 2000, l'Organisation des Nations Unies (ONU) a adopté comme ligne directrice *les huit Objectifs du Millénaire pour le Développement* à atteindre d'ici 2015. Parmi ces thématiques, trois concernent directement le domaine de la santé : réduire la mortalité infantile ; améliorer la santé maternelle ; combattre les maladies. Cet engagement positionne l'accès aux soins comme un droit universel. Aujourd'hui, le bilan est mitigé [1] : 5 millions de personnes meurent encore chaque année de maladies liées à l'eau insalubre (choléra, diarrhée, hépatite, typhoïde, ...). En relais, *les Objectifs du Développement Durable* proposent notamment de garantir la bonne santé ; de promouvoir le bien-être de tous à tous les âges ; d'éradiquer les principales maladies, d'ici 2030. Dans ce contexte, la recherche scientifique, notamment dans le domaine du diagnostic médical, doit prendre en considération les contraintes pratiques et financières. L'ONU définit les paramètres à considérer pour un diagnostic médical accessible à tous par l'acronyme ASSURED : A affordable ; S sensitive ; S specific ; U user-friendly ; R rapid ; E equipment-free ; D delivered. A contrepied des solutions de haute-technologie qui restent chères et inaccessibles au plus grand nombre, l'innovation frugale consiste à donner une grande valeur ajoutée à des composants très communs. La microfluidique papier s'inscrit complètement dans cette philosophie.

**Les besoins en diagnostic** Le vieillissement de la population, l'accès aux soins des pays en voie de développement ou l'émergence de nouveaux pathogènes sont autant de situations qui conduisent au développement d'outils de diagnostic rapides.

Le domaine du diagnostic Point of Care (POC - au chevet du patient) réunit tous les dispositifs permettant des analyses biologiques rapides, réalisables partout et par un opérateur peu qualifié ou le patient lui-même. Selon les conditions pratiques ou la cible médicale, les avantages peuvent être nombreux : meilleure orientation dans le parcours de soin, détection précoce, bon suivi de maladies chroniques. Ces dispositifs sont pertinents dans plusieurs contextes. Dans le milieu hospitalier, les tests rapides permettent un tri des patients dès leur arrivée dans un service. Ainsi l'évacuation des cas légers et la prise en charge rapide (hospitalisation et traitements) des cas sévères désengorgent les salles d'attente. De manière similaire, au sein d'un cabinet médical, dans une infirmerie ou dans un petit centre de santé, donner la possibilité aux praticiens d'effectuer ces tests améliore l'orientation des patients.

Les Organisations Non-Gouvernementales (ONG) comme Médecins Sans Frontières ou la Croix Rouge, assurent des missions de santé dans des conditions de terrain hostiles : pauvreté, guerre, catastrophes naturelles, ... Les dispositifs de diagnostic à destination du corps médical doivent répondre à des contraintes sévères en ce qui concerne la logistique (énergie, maintenance, résistance, disponibilité des consommables, ...) et le coût. La dernière épidémie Ebola, responsable de plus de 11 000 décès dans les trois pays les plus touchés (Guinée, Liberia, Sierra Leone), a montré l'importance d'un diagnostic rapide des maladies infectieuses. La maîtrise de la propagation du virus passe par deux principales actions : casser les chaînes de contamination en informant la population (actions de prévention) et isoler les personnes infectées le plus rapidement possible grâce à un diagnostic précoce.

Dans les exemples précédents, la réalisation du test dépend toujours d'un personnel médical formé. Cependant, de plus en plus de dispositifs sont mis à la disposition même du grand public, comme l'exemple du test de grossesse ou, plus récemment, du test HIV vendu en pharmacie. Cette configuration d'auto-test réalisable à domicile facilite le suivi de maladies chroniques, limite les déplacements et est très appropriée dans des situations de désert médical [2, 3]. Le concept de télémédecine associe l'auto-test et les technologies de communication.

Les outils de diagnostic portables trouvent de nombreuses applications dans le secteur médical mais sont également d'une grande utilité dans la sécurité alimentaire et la surveillance environnementale.

**Les enjeux des tests rapides** Le temps de traitement (ou TAT : Turn-Around Time) est défini par le délai qui sépare le moment où la décision est prise de faire un test et celui où les actions découlant du résultat du test démarrent [4]. Avec des laboratoires externes, même si l'analyse intrinsèque ne prend qu'une heure, les étapes administratives et logistiques en amont et en aval rallongent considérablement le temps de traitement.

En plus de raccourcir le TAT, les tests rapides au chevet du patient facilitent les interactions directes entre personnel soignant et patient. Ce dernier a alors une meilleure compréhension du traitement.

Dans certaines situations, un diagnostic précoce joue un rôle vital. C'est le cas pour les épidémies où il accroît les chances de guérison de la personne infectée et brise la chaîne de contamination grâce aux mesures mises en place. C'est également le cas pour les maladies cardiaques : distinguer une angine de poitrine d'un infarctus du myocarde est d'une importance cruciale aux urgences d'un hôpital. Pour cela, la détection de biomarqueurs cardiaques, comme la troponine, par des immunoessais peut réduire considérablement le TAT [5, 6].

Les performances d'un outil de diagnostic rapide peuvent être évaluées selon deux catégories [7]. Les performances pratiques regroupent toutes les caractéristiques nécessaires au bon fonctionnement du test : compétences de l'opérateur, type d'échantillons biologiques et procédure de prélèvement, durée du test, besoins en consommables et instrumentations. Elles déterminent l'utilisation concrète du dispositif et sa compatibilité avec la situation de terrain. La pertinence analytique concerne la limite de détection, la précision de mesure (quantitatif/qualitatif), la gamme de concentrations, la sensibilité et la spécificité. Le test diagnostique doit répondre à un besoin particulier [8] et si sa sensibilité analytique est trop faible, il devient sans intérêt et va même gêner le diagnostic (besoin d'un test en doublon). Aujourd'hui, il est nécessaire que les tests rapides approchent les performances du laboratoire [9].

Le problème majeur des tests POC réside dans le manque de contrôle qualité et de procédures standardisées. Avec des opérateurs non formés ou n'utilisant le dispositif que de manière très occasionnelle, les sources d'erreurs sont nombreuses. Dans tous les cas, ces tests doivent inclure un contrôle interne qui alerte sur un potentiel dysfonctionnement du dispositif. Il faut aussi s'assurer d'une continuité et d'une compatibilité entre les tests de terrain et les analyses de routine des laboratoires.

Les résultats des tests rapides type bandelettes (décrits dans la section 2.1) se présentent souvent sous la forme colorimétrique ON-OFF ou semi-quantitative. Cette appréciation subjective est parfois difficile à interpréter et sujette aux erreurs. Il existe des dispositifs quantitatifs de mesure mais ils dépendent alors d'équipements additionnels, ce qui augmente le coût et les contraintes logistiques (maintenance, source d'énergie, ...).

Un aspect de coût doit être considéré. Une analyse réalisée sur le terrain peut coûter jusqu'à 10 fois plus cher que le même test en routine au laboratoire. Cette différence provient des plus petits volumes de production, des frais de distribution et du format individuel. La disponibilité du test engendre également des coûts de sur-diagnostic dans des situations où il ne serait pas nécessaire. On les estime à 5% de la prise en charge médicale totale, contre 70% pour les médicaments [10].

Ces coûts sont largement contrebalancés par les bénéfices cliniques et économiques à long terme. Le diagnostic précoce donne un meilleur contrôle des épidémies et évite les complications des maladies en stade avancé. Dans l'exemple du suivi du diabète, équiper les patients de dispositifs d'auto-test diminue le nombre de visites cliniques. Une étude a montré une réduction significative du coût annuel par patient grâce à cet investissement [11].

**Un laboratoire sur puce** En réponse à ces besoins de diagnostic rapide au chevet du patient, le concept de laboratoire sur puce a émergé depuis les années 2000. Il consiste à rassembler au sein d'un même objet toutes les fonctions d'un laboratoire d'analyse, ce que permet la microfluidique. Par la réduction des volumes et des temps d'analyse, la miniaturisation autorise la parallélisation et l'automatisation des tests par l'écoulement.

Pourtant, peu de développements microfluidiques atteignent les applications de terrain. Le principal paramètre mis en cause est la dépendance en équipements de laboratoire. Faire s'écouler les liquides dans des microcanaux, visualiser l'intérieur d'une puce microfluidique, détecter un résultat d'analyse ... Toutes ces opérations nécessitent un savoir-faire et une instrumentation lourde.

A l'inverse, le papier a la propriété de drainer naturellement les liquides. Ces écoulements autonomes peuvent être mis à profit pour mélanger des réactifs avec un échantillon biologique. C'est l'exemple du test bandelette. Très simple d'utilisation et très peu cher, le papier apparaît comme un support de diagnostic idéal. Sa structure poreuse micrométrique le place dans des dimensions caractéristiques de la microfluidique. Contrairement aux microsystèmes issus de techniques de fabrication sophistiquées, le papier est un matériau dont la fabrication est un procédé ancestral. De récentes innovations conduisent aujourd'hui à une meilleure maîtrise de ses propriétés physiques qui permettent de contrôler les écoulements et transforment ce support en une potentielle plateforme microfluidique aux multiples fonctions. Par exemple, l'impression de barrières de cire dans le papier définit un contraste de mouillage hydrophile-hydrophobe qui confine l'écoulement d'eau au sein d'un motif.

**Motivations et contributions** Les chapitres 1 et 2 rassemblent l'état de l'art de la microfluidique papier relatif à la physique des écoulements et aux applications de diagnostic. Une attention particulière est portée à la préparation d'échantillons sur papier et à l'amplification d'acides nucléiques.

La loi de Lucas-Washburn est le principal modèle qui décrit l'avancée du front liquide dans une bandelette de papier. Cette loi macroscopique ne rend pourtant pas compte de la structure plus locale des écoulements. Dans cette thèse, la physique des écoulements dans le papier est étudiée en s'intéressant particulièrement à la compétition entre les effets de volume - l'imbibition capillaire - et ceux de surface - l'étalement de goutte. La géométrie imposée par des barrières en cire peut permettre de favoriser l'un des phénomènes par rapport à l'autre.

Contrairement à un microcanal unique d'une puce microfluidique dont la géométrie et la taille sont bien maîtrisées, le papier est formé par un large ensemble de microcanaux interconnectés. Le milieu poreux est donc responsable d'un grand volume mort qui nuit à l'analyse de petites quantités de fluide. De plus, la pompe capillaire tend à répartir les échantillons à l'intérieur de tout le papier accessible. Cette dispersion spatiale associée aux propriétés optiques contribue à une limite de détection insuffisante dans le papier. L'objectif du chapitre 3 est de proposer des solutions de concentration d'analytes et d'en quantifier les performances. Le confinement par des barrières de cire ainsi que l'évaporation de solvant sont les principaux paramètres d'intérêt pour réaliser simplement les dispositifs de concentration.

Dans les sciences analytiques, le support papier est utilisé de manière routinière au chevet du patient pour des applications de diagnostic. C'est le cas notamment du prélèvement de sang séché sur papier et du test bandelette. De manière à généraliser l'utilisation du papier à toute la population et vers une plus grande variété d'échantillons biologiques, le papier doit s'inscrire dans une logique de diagnostic complète : depuis le test instantané au chevet du patient jusqu'au laboratoire d'analyse. Dans ce contexte, l'étude proposée dans le chapitre 4 discute l'élution dans des puces microfluidiques, d'échantillons séchés sur papier. Il est question de l'influence du papier sur les régimes d'écoulements dans différentes géométries de microcanaux ainsi que des performances d'élution selon la nature des analytes.

Dans le chapitre 5, les principes de concentration développés dans le chapitre 3 sont appliqués à un immunoessai. L'objectif est de détecter un biomarqueur cardiaque à l'état de traces, car sa seule présence est spécifique d'un infarctus du myocarde. Le test bandelette est donc revisité sur papier à l'intérieur de motifs en cire.

La récente épidémie Ebola illustre le besoin urgent en outils de diagnostic pour la détection précoce de pathogènes. Pour cela, l'amplification d'acides nucléiques permet d'atteindre une fenêtre de diagnostic inaccessible par les tests bandelettes, et le support papier est l'un des meilleurs candidats pour répondre aux contraintes d'utilisation de terrain. Le chapitre 6 étudie la biocompatibilité de la microfluidique papier avec différentes réactions de biologie moléculaire. Nous nous intéressons ensuite à la détection du virus Ebola, à partir d'un support papier prêt à l'emploi et intégrant des contrôles internes. Les premiers développements sur systèmes modèles, en laboratoire, ont donné lieu à des expériences sur échantillons réels en Guinée. La parallélisation des réactions est démontrée grâce au contrôle des écoulements dans le papier. Enfin, la généralisation à d'autres pathogènes, comme la dengue et le Virus d'Immunodéficience Humaine (HIV), soulève des questions sur la robustesse des papiers cellulose vis à vis d'autres membranes aux états de surface mieux contrôlés.

## Première partie

Etat de l'art : le papier comme  
plateforme microfluidique





---

## Physique des écoulements dans la microfluidique papier

---

### Table des matières

1.1	Etude des écoulements pour un laboratoire sur puce . . . . .	<b>9</b>
1.1.1	Principes physiques de la microfluidique . . . . .	9
	Résistance hydrodynamique . . . . .	10
	Nécessité d'équipements . . . . .	11
1.1.2	Forces capillaires dans les microcanaux . . . . .	12
	Nombres sans dimension . . . . .	12
	Loi de Jurin . . . . .	13
	Écoulement dans un microcanal . . . . .	14
1.1.3	Puces microfluidiques capillaires . . . . .	14
	Milieux poreux artificiels . . . . .	14
	L'évaporation comme moteur d'écoulement . . . . .	15
1.2	Le support papier . . . . .	<b>16</b>
1.2.1	Les forces capillaires dans le papier . . . . .	16
	Imbibition capillaire dans un milieu poreux . . . . .	16
	Gouttes sur un substrat . . . . .	18
	Effets de l'évaporation . . . . .	20
	Dispositifs hybrides : micropuces et papier . . . . .	21
1.2.2	Propriétés physico-chimiques du papier . . . . .	22
	Cellulose et fonctionnalisation chimique . . . . .	22
	Variété des substrats . . . . .	23
	Visualisation dans le papier . . . . .	23
1.3	La microfluidique papier . . . . .	<b>24</b>
1.3.1	Techniques de fabrication . . . . .	24
	Découpe du milieu poreux . . . . .	24
	Obstruction physique . . . . .	25
	Contraste de mouillage . . . . .	25

	Origami . . . . .	27
	Microcanaux dans le papier . . . . .	28
1.3.2	Illustration de fonctions microfluidiques . . . . .	29
	Parallélisation des écoulements . . . . .	29
	Mélange et séparation . . . . .	30
	Vannes . . . . .	30
1.4	Limites du support papier . . . . .	<b>32</b>
1.4.1	Seuil de détection . . . . .	32
1.4.2	Description de la physique des écoulements . . . . .	33
1.5	Ce qu'il faut retenir . . . . .	<b>34</b>

---

LE sang dans le corps humain, comme la sève des arbres, circule dans des artères, des veines, des capillaires dont les diamètres sont micrométriques alors que leurs longueurs atteignent plusieurs centimètres voire mètres. Ce sont les dimensions caractéristiques de la microfluidique, science de la miniaturisation des écoulements [12]. Confiner à l'échelle micrométrique supprime les effets de la gravité sans atteindre les forces moléculaires, qui dominent sur des distances nanométriques. Maîtriser ces écoulements permet d'appréhender des comportements rhéologiques, de reproduire des fonctions élémentaires d'organes humains, de manipuler des particules micrométriques (colloïdes ou cellules) et d'envisager des réactions chimiques dans de très petits volumes. Les applications de la microfluidique touchent donc des domaines aussi variés que la biologie, la cosmétique ou le pétrole. Cependant l'utilisation de ces dispositifs est grandement restreinte à l'environnement des laboratoires et s'exporte peu au delà. La miniaturisation extrême des puces microfluidiques n'est pas toujours synonyme de portabilité car une dépendance lourde des équipements perdure.

A l'inverse, le papier est omniprésent dans la vie quotidienne. Son coût et sa disponibilité en font un support qui répond à tous les critères pour un diagnostic médical de terrain accessible à tous. Les forces capillaires dans le papier génèrent des écoulements autonomes qui peuvent être utilisés dans les sciences analytiques. Sous la dénomination "papier" sont regroupés aussi bien les supports traditionnels à base de cellulose que les membranes artificielles. Cette grande diversité de substrats offre des propriétés très variées en termes de chimie de surface, de porosité, de structure, de géométrie ... En 2007, l'équipe de G.M. Whitesides décrit le concept de microfluidique papier et ses dispositifs analytiques (micro-Paper Analytical Devices -  $\mu$ PAD) [13]. Des solutions de fabrication innovantes assurent un contrôle des écoulements dans le papier, suivant des motifs personnalisables. Dans ce nouveau champ de recherche, c'est l'application - orientée diagnostic médical de terrain - et ses contraintes opérationnelles qui guident le développement des puces papier depuis la fonction microfluidique jusqu'au laboratoire sur papier.

## 1.1 Etude des écoulements pour un laboratoire sur puce

### 1.1.1 Principes physiques de la microfluidique

La maîtrise des écoulements au sein des microsystèmes relève d'équipements spécifiques. D'une part, la miniaturisation est responsable d'une augmentation importante de la résistance hydrodynamique qui n'est pas favorable au passage de liquide. D'autre part, la visualisation des écoulements ou des résultats d'analyses repose sur des systèmes externes de détection.

## Résistance hydrodynamique

Dans un microcanal (voir figure 1.1), un écoulement est régi par l'équation de Navier-Stokes (équation 1.1). Sous hypothèse d'état stationnaire et à bas nombre de Reynolds  $Re$  (équation 1.2), l'équation est réduite à l'équilibre entre l'ensemble des forces s'appliquant au système : dissipations visqueuses et gradient de pression (équation 1.3). En effet, aux échelles micrométriques et pour un fluide newtonien incompressible, les forces gravitaires sont négligeables et on bénéficie de l'hypothèse d'incompressibilité.

$$\rho \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \text{grad}) \vec{v} \right) = -\text{grad}P + \mu \Delta \vec{v} \quad (1.1)$$

$$Re = \frac{\text{inertie}}{\text{viscosité}} = \frac{\rho v a}{\mu} = \frac{10^{-3} \times 10^{-3} \times 0,1 \times 10^{-3}}{10^{-3}} = 0,1 \times 10^{-6} \ll 1 \quad (1.2)$$

$$\text{grad}P = \mu \Delta \vec{v} \quad (1.3)$$

Avec  $\vec{v}$  le vecteur vitesse dans le microcanal,  $\rho$  la masse volumique du liquide,  $P$  la pression,  $\mu$  la viscosité dynamique,  $a$  une distance caractéristique. Une application numérique du nombre de Reynolds est donnée dans le cas d'un écoulement d'eau à une vitesse de 1 mm/s dans un microcanal de section carrée  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ . Ces conditions confirment l'hypothèse de faible nombre de Reynolds.

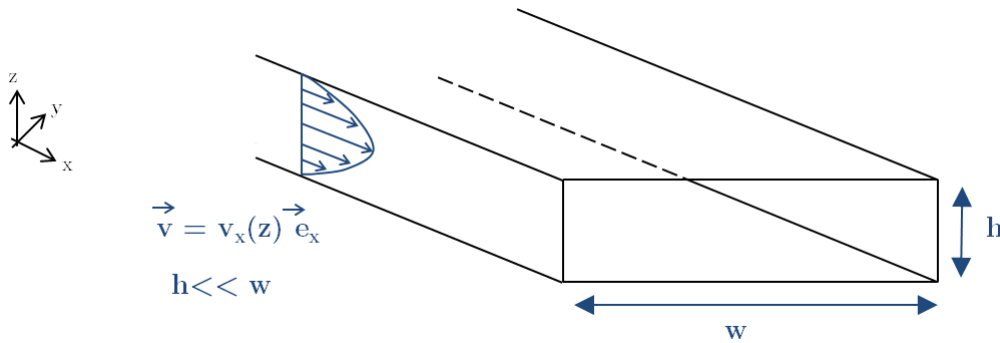


Figure 1.1 – Cellule de Hele-Shaw et profil de vitesse parabolique.

Dans un état stationnaire et une géométrie type cellule de Hele-Shaw (*largeur*  $\gg$  *hauteur*), l'écoulement est unidirectionnel et ne dépend que de la hauteur du microcanal. L'intégration de l'équation du mouvement donne un profil de vitesse parabolique dont l'expression est précisée dans l'équation 1.4.

$$\vec{v} = v_x(z) \vec{e}_x = \frac{\Delta P}{2\mu L} \left( \frac{h^2}{4} - z^2 \right) \vec{e}_x \quad (1.4)$$

Avec  $h$  et  $L$  respectivement la hauteur et la longueur du microcanal, et  $\Delta P$  la différence de pression aux extrémités du microcanal.

Une seconde intégration de la vitesse sur la section du microcanal permet de remonter à la formule du débit  $Q$  en fonction du gradient de pression et des dimensions caractéristiques du microsystème (équation 1.5).

$$Q = \iint_S \vec{v} \cdot \vec{e}_x \, dydz = \int_{y=-\frac{w}{2}}^{\frac{w}{2}} \int_{z=-\frac{h}{2}}^{\frac{h}{2}} \frac{\Delta P}{2\mu L} \left( \frac{h^2}{4} - z^2 \right) \, dydz = \frac{wh^3}{12\mu L} \Delta P \quad (1.5)$$

Avec  $w$  la largeur du microcanal.

L'analogie hydrodynamique-électrocinétique qui associe le débit au courant électrique et le gradient de pression à la différence de potentiel permet de créer la notion de résistance hydrodynamique (équation 1.6), analogue de la résistance électrique. Le calcul précédent pour un canal de section rectangulaire montre l'effet du confinement. La résistance hydrodynamique est proportionnelle à l'inverse de la hauteur au cube. Autrement dit, pour obtenir un même écoulement dans un microcanal 10 fois plus fin, il faut appliquer un gradient de pression 1000 fois plus grand.

$$R_h = \frac{12\mu L}{wh^3} \quad (1.6)$$

### Nécessité d'équipements

En considérant un microcanal de section  $100 \, \mu\text{m} \times 100 \, \mu\text{m}$  et un écoulement d'eau à  $1 \, \text{mm/s}$ , l'application numérique des équations précédentes donne :

$$\Delta P = 12 \, \text{Pa/m} = 0,12 \, \text{Bar/mm} \quad (1.7)$$

Pour atteindre ce niveau de pression, une instrumentation spécifique est nécessaire. Les écoulements peuvent être contrôlés en débit ou en pression. Dans le premier cas, l'utilisation d'un pousse-seringue permet d'imposer un débit constant, facile à calculer par le déplacement latéral du piston et le diamètre interne de la seringue. Bien que très simple d'utilisation, cette technologie est souvent limitée : le moteur pas à pas applique une force discontinue et les temps de réponse du système peuvent être longs (régimes transitoires dus à l'élasticité des matériaux). Des solutions de pressurisation de réservoirs liquides offrent l'alternative de contrôler les écoulements en pression. Dans cette situation, le temps de réponse du système dépend de la vitesse du son dans le fluide et il est possible d'ajouter des dispositifs de rétro-contrôle pour augmenter la stabilité.

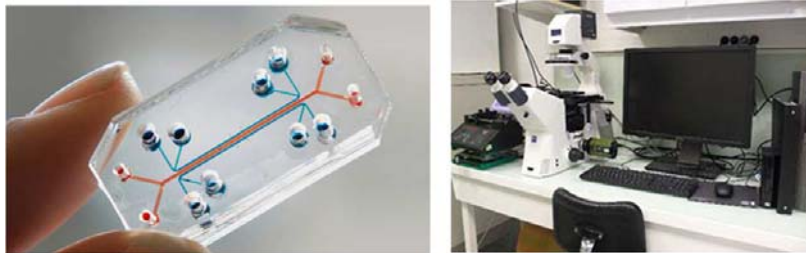


Figure 1.2 – Puce microfluidique et environnement expérimental associé.

En pratique, les dispositifs microfluidiques (figure 1.2 par le Wyss Institute et l'INSERM) sont associés à d'autres équipements notamment pour la visualisation et la détection. Microscopes, caméras, lampes U.V., capteurs, connectiques, tubes ... sont les outils et accessoires classiques utilisés autour d'une puce microfluidique. Les inconvénients de tels équipements sont nombreux (prix, dépendance en énergie, mobilité, logistique liée au consommable, savoir-faire de l'utilisateur) et rendent les puces microfluidiques non appropriées pour les applications de terrain.

### 1.1.2 Forces capillaires dans les microcanaux

Afin de rendre les puces microfluidiques plus autonomes vis à vis des équipements, il est possible d'exploiter les forces capillaires. En compétition avec les forces gravitaires et la dissipation visqueuse, la capillarité peut être mise à profit en augmentant le confinement et en contrôlant la mouillabilité des surfaces.

#### Nombres sans dimension

Le calcul des nombres sans dimension permet de mettre en évidence la prédominance d'une force par rapport à une autre dans une situation particulière. Dans les dispositifs capillaires, les trois grandeurs d'intérêt sont la capillarité, la viscosité et la gravité. Le nombre capillaire  $Ca$  définit le rapport entre la viscosité et la capillarité (équation 1.8). Le nombre de Bond  $Bo$  compare la gravité et la capillarité (équation 1.9). Le rapport  $N$  entre le nombre capillaire et le nombre de Bond permet de classer la force dominante entre viscosité et gravité (équation 1.10).

$$Ca = \frac{\text{viscosité}}{\text{capillarité}} = \frac{\mu v}{\gamma} \quad (1.8)$$

$$Bo = \frac{\text{gravité}}{\text{capillarité}} = \frac{\rho g a^2}{\gamma} \quad (1.9)$$

$$N = \frac{\text{viscosité}}{\text{gravité}} = \frac{Ca}{Bo} = \frac{\mu v}{\rho g a^2} \quad (1.10)$$

Avec  $\mu$  la viscosité dynamique,  $v$  la vitesse d'écoulement,  $\gamma$  la tension de surface,  $\rho$  la masse volumique,  $g$  l'accélération de la pesanteur et  $a$  une distance caractéristique du système.

Dans les écoulements et le transport d'analytes, le nombre de Peclet  $Pe$  rend compte des effets convectifs par rapport à la diffusion (équation 1.11).

$$Pe = \frac{\text{convection}}{\text{diffusion}} = \frac{av}{D} \quad (1.11)$$

Avec  $a$  une distance caractéristique du système,  $v$  la vitesse d'écoulement et  $D$  le coefficient de diffusion des analytes.

### Loi de Jurin

Une démonstration directe de la capillarité consiste à plonger un capillaire hydrophile dans l'eau (figure 1.3). Dans cette configuration, un écoulement d'eau dans un microtube de diamètre  $100\ \mu\text{m}$  est caractérisé par les nombres sans dimensions suivants :  $Ca \sim 10^{-5}$  ;  $Bo \sim 1$  ;  $N \sim 10^{-5}$ . Il y a donc compétition entre les forces capillaires et gravitaires, alors que la viscosité reste négligeable.

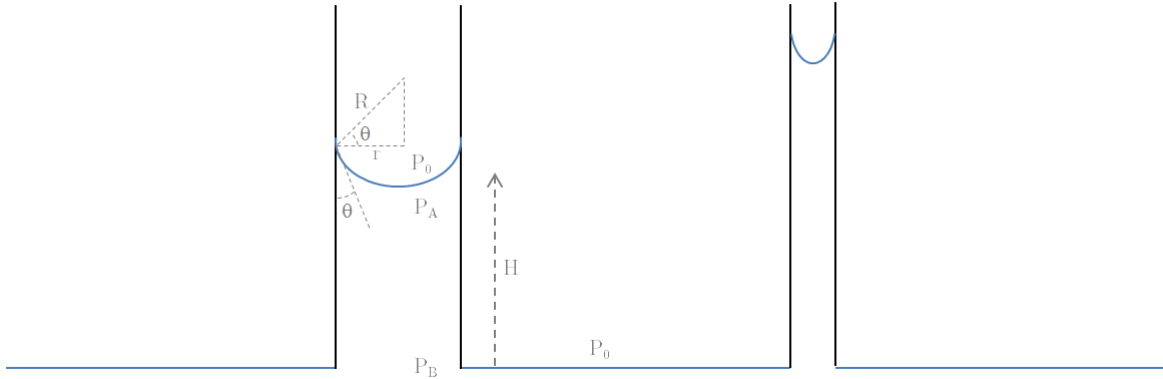


Figure 1.3 – Montée capillaire.

Les interactions de surface définissent l'angle de contact entre le liquide et la paroi du tube, ce qui impose la forme du ménisque. Or cette courbure induit à l'interface air-eau une pression de Laplace définie dans l'équation 1.12 et qui devient moteur de l'écoulement : l'eau monte dans le capillaire.

$$P_0 - P_A = \frac{2\gamma}{R} = \frac{2\gamma \cos \theta}{r} \quad (1.12)$$

Avec  $P_0$  la pression atmosphérique,  $P_A$  la pression dans le liquide juste sous le ménisque,  $\gamma$  la tension de surface,  $R$  le rayon de courbure du ménisque,  $\theta$  l'angle de contact entre le liquide et le capillaire,  $r$  le rayon interne du capillaire.

Quand la loi de Laplace et la loi de l'hydrostatique (équation 1.13) s'équilibrent, l'écoulement s'arrête, c'est la loi de Jurin.

$$P_A + \rho g H = P_B = P_0 \quad (1.13)$$

Avec  $H$  la hauteur du ménisque et  $P_B$  la pression dans le liquide au niveau de la surface plane.

La hauteur  $H$  d'équilibre se calcule à partir des paramètres géométriques et de l'angle de contact (équation 1.14). En augmentant le confinement et l'hydrophilie du capillaire, l'écoulement atteint une plus grande hauteur.

$$H = \frac{2\gamma \cos \theta}{\rho g r} \quad (1.14)$$



### Écoulement dans un microcanal

Cette même expérience réalisée dans un capillaire horizontal permet de s'affranchir des effets de gravité. Dans ces conditions, seule la viscosité du liquide s'oppose au mouvement (équation 1.15). L'équilibre de cette dissipation avec la force capillaire rend compte de l'écoulement [14, 15].

$$\frac{4\gamma \cos \theta}{r} = \frac{32\mu l(t)}{r^2} \frac{dl(t)}{dt} \quad (1.15)$$

Avec  $l(t)$  la position du front de liquide en fonction du temps  $t$ .

L'avancée du front de liquide répond à une loi de diffusion : proportionnelle à la racine carrée du temps, c'est la loi de Lucas-Washburn (équation 1.16).

$$l(t) = \sqrt{\frac{\gamma r \cos \theta}{4\mu} t} \quad (1.16)$$

Généralisable à un ensemble de capillaires parallèles, l'équation de Lucas-Washburn est utilisée pour décrire macroscopiquement les écoulements en milieux poreux, notamment dans le papier (voir section 1.2.1).

### 1.1.3 Puces microfluidiques capillaires

Si la miniaturisation n'est pas favorable aux écoulements stationnaires, il est possible d'exploiter les forces capillaires et les régimes transitoires pour générer des écoulements autonomes.

#### Milieux poreux artificiels

Si un écoulement autonome est possible dans un microcanal selon la loi de Lucas-Washburn, le défi est de dépasser le régime initial. En effet, une fois le microcanal rempli, il n'y a plus de force capillaire et l'écoulement s'arrête. Une solution proposée dans la littérature [16, 17] est de remplacer la sortie du microcanal par un milieu poreux artificiel (figure 1.4).

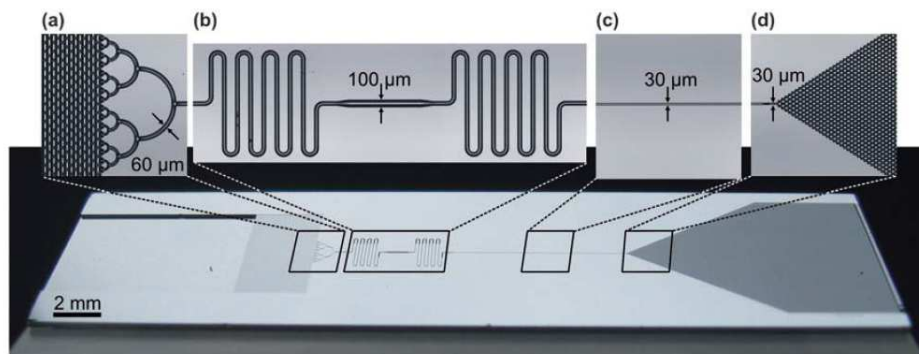


Figure 1.4 – Puce microfluidique capillaire

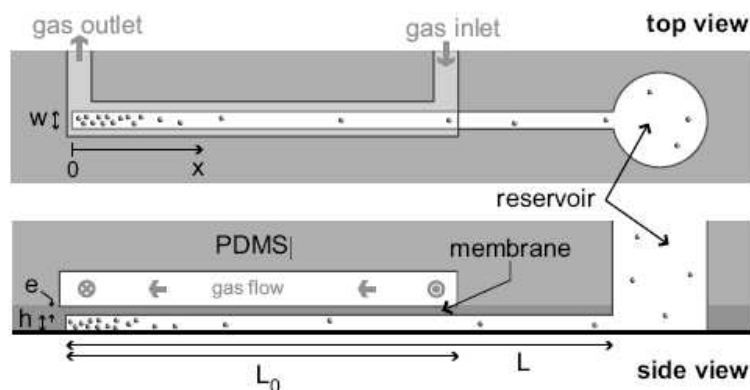
Il peut s'agir d'un milieu poreux à seulement deux dimensions comme un ensemble de piliers. Dans cette configuration, il n'est pas possible de faire sortir le liquide de la puce. L'objectif réside plutôt dans le fait de faire passer l'écoulement au travers d'une fonction d'intérêt dans le microcanal : un outil de détection ou d'analyse par exemple. Comme discuté précédemment, la loi de Lucas-Washburn suit une loi de diffusion donc l'écoulement ralentit au cours du temps. En variant certains paramètres, la force capillaire peut être augmentée pour contrebalancer la dissipation visqueuse. Par exemple, si le milieu poreux présente un gradient de taille de pores (i.e. un gradient d'espacement entre les piliers), la force capillaire augmente au cours du temps et il est possible d'obtenir une vitesse d'écoulement constante.

### L'évaporation comme moteur d'écoulement

La structure capillaire arborescente peut être simplifiée et remplacée dans un second temps par une pompe évaporative [18]. Il peut s'agir d'une pompe passive en laissant les canaux ouverts à l'air libre ou d'une pompe active générée par un flux d'air qui évacue la vapeur de solvant.

Dans une géométrie très simple de microcanal, les effets de réservoirs peuvent aussi suffire à obtenir un écoulement capillaire autonome. Le réservoir d'entrée contient une large quantité de liquide alors que la sortie est laissée libre à l'évaporation. Le taux d'évaporation agit sur le ménisque du réservoir liquide en sortie mais reste négligeable sur le large volume en entrée [19]. Le couplage transport et évaporation provoque l'accumulation des analytes [20].

Le Poly DiMéthyl Siloxane (PDMS), polymère utilisé pour la fabrication des microcanaux, est un matériau perméable aux gaz et à certains solvants. En contrôlant l'épaisseur de PDMS au-dessus d'un microcanal, un différentiel d'évaporation devient moteur de l'écoulement [21] comme le montre la figure 1.5. L'effet de concentrateur permet l'exploration de diagrammes de phases.



**Figure 1.5** – Ecoulement capillaire entretenu par la pervaporation de solvant à travers une membrane de PDMS.

## 1.2 Le support papier

Par sa structure poreuse micrométrique, le papier est un objet microfluidique. Les écoulements d'eau y sont autonomes grâce aux dimensions caractéristiques et au caractère très hydrophiles des surfaces.

### 1.2.1 Les forces capillaires dans le papier

Les interactions entre une goutte de liquide et une feuille de papier sont régies par plusieurs phénomènes [22]. L'imbibition capillaire tend à absorber le liquide à l'intérieur du milieu poreux. En parallèle, la surface hydrophile provoque un étalement de la goutte. Dans le cas du papier, il faut également tenir compte de la rugosité de surface. Enfin, le format de feuille crée de grandes interfaces libres qui soumettent le liquide à l'évaporation.

#### Imbibition capillaire dans un milieu poreux

La loi de Lucas-Wahsburn [14] décrit l'écoulement dans un microcanal grâce à la pompe capillaire, auquel s'oppose la dissipation visqueuse. En considérant le papier comme un ensemble de capillaires parallèles, cette même loi peut être utilisée pour décrire macroscopiquement l'avancée du front de liquide dans un milieu poreux.

$$l(t) = \sqrt{\frac{\gamma r \cos \theta}{4\mu} t} \quad (1.17)$$

Avec  $l(t)$  la position du front liquide en fonction du temps  $t$ ,  $\gamma$  la tension de surface,  $r$  le rayon interne des capillaires,  $\theta$  l'angle de contact et  $\mu$  la viscosité cinématique.

La loi de Lucas-Washburn décrit l'écoulement pendant le régime de mouillage, d'imbibition capillaire. Dans le cas d'un milieu poreux déjà saturé de liquide, c'est la loi de Darcy qui s'applique [23] (équation 1.18).

$$\vec{v} = \frac{-k}{\mu} \text{grad}P \quad (1.18)$$

Avec  $k$  la perméabilité du milieu poreux. Ce paramètre peut être remplacé par une matrice qui rend compte de l'anisotropie du support papier, notamment due à l'alignement des fibres de cellulose.

Le gradient de pression, dans cette configuration déjà mouillée, ne résulte plus des propriétés de mouillage et de la forme du ménisque. Il est imposé par des conditions extérieures : hydrostatique, évaporation, ...

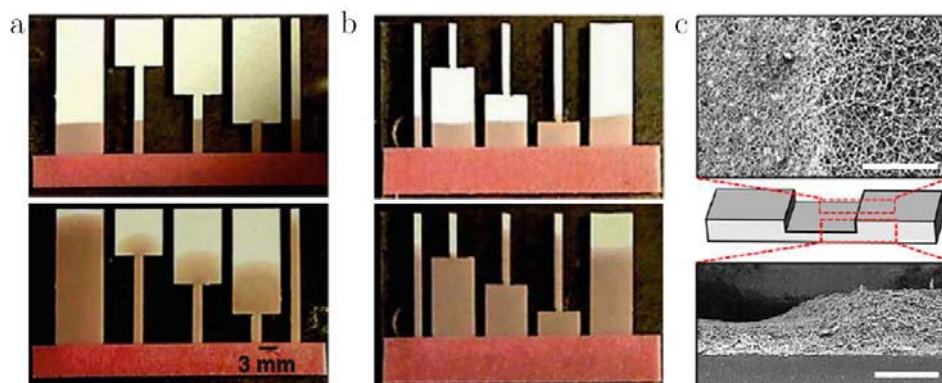
**Limites de la loi de Lucas-Washburn** Pourtant ce modèle capillaire ne prend pas en compte de nombreux paramètres. Le papier est un milieu hétérogène dont la taille de pores est loin d'être monodisperse. Le réseau de capillaires parallèles, rigides, doit être comparé à un milieu fibreux désordonné, interconnecté dont les propriétés mécaniques changent selon l'état sec ou humide [15]. Les fibres de cellulose sont susceptibles d'absorber une partie du liquide

et de gonfler, ce qui modifie la taille de pores au cours du temps. Enfin, l'évaporation via les grandes interfaces libres n'est pas prise en compte dans ce modèle [24].

Un bon historique des principaux modèles proposés dans la littérature est disponible dans la référence [25]. Le modèle de Price et al. (1953) tient compte de l'absorption dans les fibres comme un régime plus lent, suivant l'imbibition capillaire. La distribution de la taille de pores et le gonflement des fibres sont discutés par Bristow (1971). Van den Akker et Wink (1969) ont montré l'importance de la définition même de l'angle de contact suivant les pores et rugosités en surface des fibres. Oliver et Mason (1976) ont confirmé l'impact de la morphologie des fibres sur l'étalement liquide. Selon Nguyen et Durso (1983), la persistance d'écoulements de redistribution après le retrait du réservoir liquide démontre le caractère diffusif et non capillaire de l'écoulement. Cette diffusion pourrait consister en des interactions entre la vapeur d'eau et les fibres en amont du front capillaire (Salminen, 1988). Trois phénomènes semblent régir l'écoulement (Lyne, 1993) : le mouillage et l'étalement, la pénétration capillaire, la diffusion dans les fibres.

**Géométrie et vitesses d'écoulement** Malgré les nombreuses limites de la loi de Lucas-Washburn, expérimentalement c'est un bon modèle pour des écoulements dans des bandelettes de papier de quelques centimètres de long. Si ce format unidirectionnel est déjà très utile pour des applications de diagnostic (voir section 2.1), il est intéressant de pouvoir prédire et comprendre les écoulements dans des géométries plus variées.

Les concepts de restriction et d'élargissement ont été étudiés par l'équipe de P. Yager [26] dans des bandelettes de différentes largeurs. La première conséquence de la loi de Lucas-Washburn est une avancée du front liquide indépendante de la dimension de la bandelette, ce qui est vérifié expérimentalement (figures 1.6(a) et (b)). Le seul argument géométrique pris en compte est une taille de pores, ce qui est assez remarquable étant donnée la structure du papier : enchevêtrement de fibres absorbantes, créant un réseau interconnecté de pores de taille variable.



**Figure 1.6** – Écoulements dans des bandelettes présentant une restriction et/ou un élargissement.

Dans le cas d'une bandelette présentant un élargissement (figure 1.6(a)), le liquide en sortie de la partie étroite est réparti dans toutes les directions accessibles. Localement, la loi de Lucas-Washburn est respectée mais chacun de ces écoulements est orienté suivant un angle  $\theta$  qui varie de 0 à  $\pi$  ( $\frac{\pi}{2}$  étant la direction longitudinale de la bandelette). La vitesse d'avancée du front

liquide peut alors être définie comme une vitesse moyenne résultant des projections des vecteurs vitesses locaux sur la direction de propagation. La géométrie d'élargissement induit donc un facteur de retard, une déviation à la loi de Lucas-Washburn qui ralentit l'écoulement.

Dans le cas d'une restriction, c'est toujours la loi de Lucas-Washburn qui gouverne, à l'échelle du pore, l'avancée du front liquide. La partie plus large de la bandelette agit comme un réservoir liquide à partir duquel peut démarrer un nouvel écoulement capillaire. C'est donc une seconde loi de Lucas-Washburn, décalée dans le temps, qui est responsable d'une accélération par rapport à une géométrie droite (figure 1.6(b)).

En remplaçant la restriction unitaire par une réduction continue de la largeur du canal, chaque élément de papier agit comme réservoir pour l'élément suivant. C'est comme si une nouvelle loi de Lucas-Washburn démarrerait sur chaque portion de papier. Des simulations numériques permettent de trouver la forme optimale pour obtenir une vitesse constante d'avancée du front liquide [27].

Les formes de restriction et d'élargissement sont obtenues par découpage du papier dans les exemples précédents. Il est possible de générer la même géométrie mais dans l'épaisseur du papier [28] comme le montre la figure 1.6(c). En comprimant le papier, on peut soit obstruer complètement les pores du papier soit partiellement. Cette seconde configuration agit comme une restriction.

### Gouttes sur un substrat

Une goutte déposée sur un substrat va adopter la forme qui minimise les coûts énergiques causés par sa déformation et par la création d'interfaces solide-liquide / liquide-vapeur / solide-vapeur (figure 1.7(a)). Le paramètre d'étalement  $S$  rend compte de ce bilan d'énergie (équation 1.19).

$$S = \gamma_{sv} - (\gamma_{sl} + \gamma_{lv}) \quad (1.19)$$

Avec  $\gamma_{sv}$ ,  $\gamma_{sl}$  et  $\gamma_{lv}$  les tensions de surface respectives des interfaces solide-vapeur, solide-liquide et liquide-vapeur.

Si  $S$  est positif, il est plus favorable énergétiquement de créer des interfaces solide-liquide et liquide-vapeur qu'une interface solide-vapeur. La goutte va donc s'étaler complètement.

Si  $S$  est négatif, la goutte va adopter une forme intermédiaire entre la sphère et le film liquide. C'est un régime de mouillage partiel, la goutte forme un angle  $\theta$  avec le substrat. L'équilibre des forces donne la relation d'Young-Dupré (équation 1.20).

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos \theta_Y \quad (1.20)$$

**Etalement de gouttes** Dans une situation de mouillage total, les lois de Tanner [29] décrivent la cinétique d'étalement. Selon la taille de la goutte, les forces prépondérantes sont capillaires ou gravitaires. Si  $r < l_c$ , la force motrice est capillaire 1.21.

$$r(t) \sim r_0 \left( \frac{\gamma t}{\mu r_0} \right)^{\frac{1}{10}} \quad (1.21)$$

Si  $r > l_c$ , la force motrice est gravitaire 1.22.

$$r(t) \sim r_0 \left( \frac{\rho g r_0 t}{\mu} \right)^{\frac{1}{8}} \quad (1.22)$$

Avec  $l_c = \sqrt{\frac{\gamma}{\rho g}}$  la longueur capillaire et  $r_0$  le rayon initial de la goutte.

Cet étalement macroscopique est précédé d'un film précurseur d'une épaisseur de quelques nanomètres [30] (figure 1.7(b)).

Dans le cas des écoulements dans/sur le papier, cet étalement de goutte est en compétition avec l'imbibition capillaire. De plus, le support papier n'est pas un substrat lisse, il faut tenir compte d'une importante rugosité de surface.

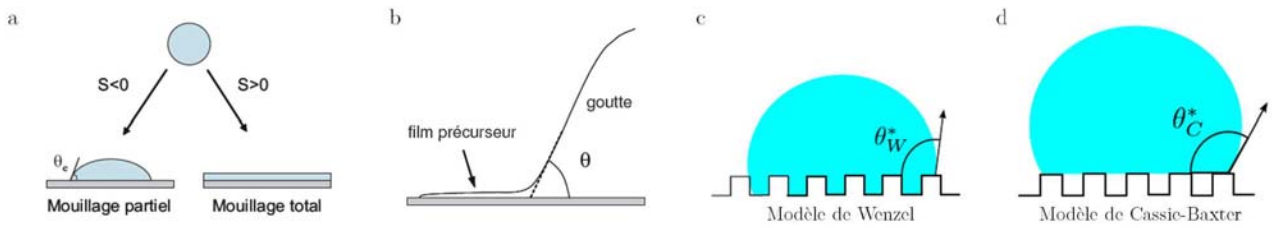


Figure 1.7 – Etalement de gouttes sur un substrat

**Lois de Cassie-Baxter et Wenzel** Lorsqu'une goutte est posée sur un substrat rugueux, elle peut soit envahir les rugosités (modèle de Wenzel [31] figure 1.7(c)) ou rester en suspension au-dessus des microstructures (modèle de Cassie-Baxter [32] figure 1.7(d)). Dans le premier cas, l'angle de contact défini par la relation d'Young-Dupré doit être corrigé par un facteur de rugosité  $r^*$  (équation 1.23).

$$\cos \theta_W = r^* \cos \theta_Y \quad (1.23)$$

L'état Wenzel accentue la mouillabilité d'une surface :

- si  $\theta_Y < \frac{\pi}{2}$  alors  $\theta_W \ll \frac{\pi}{2}$  : surface super-hydrophile,
- si  $\theta_Y > \frac{\pi}{2}$  alors  $\theta_W \gg \frac{\pi}{2}$  : surface super-hydrophobe.

Dans l'état Cassie, le liquide n'envahit pas les rugosités. C'est une situation équivalente à une goutte posée sur une surface hétérogène constituée du substrat et d'air. L'angle d'équilibre est obtenu en tenant compte des contributions de ces deux constituants, par leur fraction surfacique  $f$  (équation 1.24).

$$\cos \theta_C = f_1 \times \cos \theta_1 + f_2 \times \cos \theta_2 \quad (1.24)$$

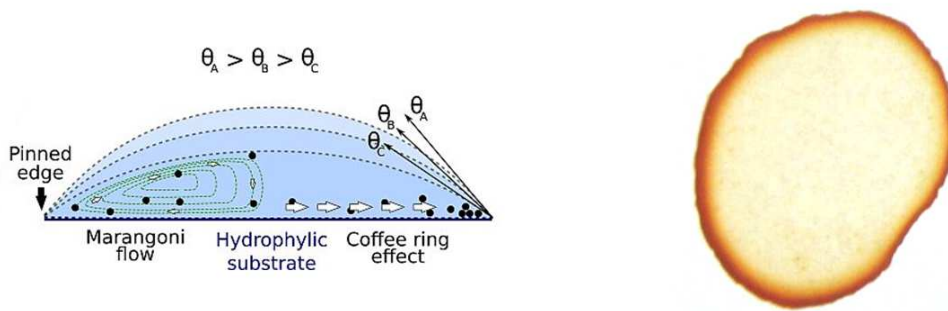
Dans le cas d'une structure poreuse, comme le papier, on a  $f_1 = 1 - f_2 = f$ ,  $\theta_1 = \theta_Y$  et  $\theta_2 = \pi$ . La relation de Cassie-Baxter devient :

$$\cos \theta_C = f (1 + \cos \theta_Y) - 1 \quad (1.25)$$

La relation de Cassie-Baxter montre que quel que soit l'angle de Young, une surface peut être rendue super-hydrophobe en réduisant sa fraction surfacique : si  $f \ll 1$ ,  $\theta_C \rightarrow \pi$ . Ce mécanisme est en compétition avec celui de Wenzel : dans le cas de surfaces hydrophiles, il est généralement énergétiquement favorable d'envahir les rugosités. Le modèle de Cassie-Baxter s'applique donc mieux aux surface hydrophobes.

### Effets de l'évaporation

Une goutte posée sur un substrat est soumise à l'évaporation. Le phénomène de taches de café illustre bien la physique particulière mise en jeu [33] (figure 1.8). La forme de la goutte, dont la ligne triple est piégée par les défauts du substrat, et l'évacuation de la vapeur d'eau par diffusion induisent une divergence d'évaporation entre le sommet de la goutte et les bords. Pour la compenser, il apparaît un flux convectif à partir du centre vers les bords de la goutte. Dans le cas du café, la suspension colloïdale est transportée par cet écoulement et s'accumule sous forme d'anneaux.



**Figure 1.8** – Effet tache de café par accumulation de particules colloïdales sur les bords d'une goutte qui s'évapore.

Une modélisation de l'absorption capillaire dans des feuilles poreuses sujettes à l'évaporation est proposée dans la littérature [24]. Des expériences complémentaires montrent l'influence des conditions extérieures sur l'écoulement [34]. Le taux d'humidité n'a pas d'impact significatif sur la vitesse d'écoulement. Au contraire, une augmentation de température induit une diminution de viscosité qui rend plus rapide la cinétique de mouillage et l'écoulement.

Dans les récents développements de la microfluidique papier (voir section 1.3.1), il peut être préférable de s'affranchir totalement de l'évaporation [35]. Des feuillets plastique, adhésifs, transparents sont positionnés sur les deux faces du papier pour isoler l'écoulement. La dépendance aux conditions extérieures est alors limitée.

Si l'évaporation est généralement considérée comme un inconvénient, elle peut être utilisée comme moteur des écoulements. Dans des puces capillaires (décrites section 1.1.3) ou directement dans le papier (voir section 2.2.3), l'évaporation remplace une pompe capillaire. L'extraction de solvant entretient l'écoulement sans disperser les analytes en solution qui se retrouvent naturellement concentrés.

### Dispositifs hybrides : micropuces et papier

A l'opposé des dispositifs microfabriqués, le papier est un milieu poreux désordonné qui bénéficie d'une pompe capillaire naturelle. L'association du papier et des puces microfluidiques permet de profiter de propriétés complémentaires.

Dans un premier exemple [16], le papier est utilisé comme interface d'introduction d'échantillon (figure 1.9(a)). La fonction de pompe capillaire qui assure le transport vers le microcanal est complétée par la propriété filtrante du papier. Il est alors possible de travailler à partir de sang total, d'en extraire le plasma par filtration et de détecter par immunoessais un marqueur cardiaque (protéine C-réactive).

La visualisation des écoulements et des résultats d'analyse peut aussi être améliorée grâce au support papier [36] (figure 1.9(b)). Une bandelette de papier qui contient les réactifs permettant une révélation colorimétrique de la réaction biologique, est placée en sortie de microcanal pour une lecture facile du test.

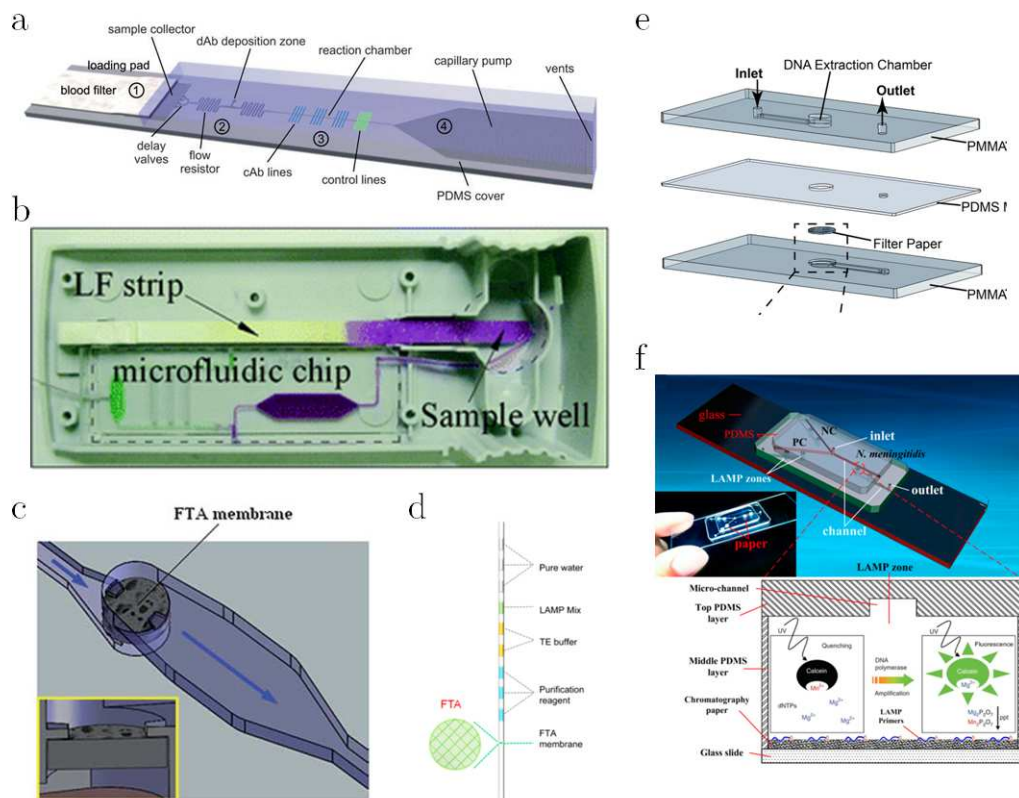


Figure 1.9 – Couplage microsystèmes et papier.

La structure poreuse du papier augmente considérablement le ratio surface/volume : les interactions de surface sont favorisées. Traitée spécialement pour la capture d'acides nucléiques, une membrane peut être insérée au sein d'un microcanal [37,38] (figure 1.9(c)). Après introduction d'un échantillon, le matériel génétique est capturé dans le milieu poreux et l'écoulement d'eau ou de solutions tampons réalise les étapes de lavage et de purification. Un même procédé a été développé sous le format d'un capillaire [39] qui contient la même membrane et un train de gouttes dans lesquelles sont stockés les solutions de lavage et les réactifs (figure 1.9(d)).



Le papier peut également être utilisé comme support de stockage selon deux applications citées ici.

D'une part, une goutte de sang séchée sur papier est une solution simple pour conserver et transporter facilement des échantillons biologiques (voir section 2.1). La microfluidique permet d'éluer les composés séchés en positionnant le papier à l'interface de deux microcanaux [40] (figure 1.9(e)). Les écoulements d'eau, de solutions tampons, de réactifs assurent les étapes de préparation d'échantillons (purification, extraction) et d'analyses.

D'autre part, cette propriété de stockage s'applique aussi aux réactifs qui sont ainsi prêts à l'emploi dans le dispositif microfluidique. Des expériences comparatives [41] montrent que des réactifs séchés dans un microcanal sont plus uniformément distribués et se conservent plus longtemps en présence de papier (figure 1.9(f)).

L'association du papier et des microsystèmes rapproche ces dispositifs des applications de diagnostic au chevet du patient : pompe capillaire, visualisation et stockage. Le développement de nouvelles techniques de fabrication fait désormais du papier une plateforme microfluidique autonome.

## **1.2.2 Propriétés physico-chimiques du papier**

Structure du papier, géométrie et états de surface définissent les propriétés de mouillage et la pompe capillaire. Mais l'implémentation de fonctions biologiques dans le papier passe aussi par un bon contrôle de la physico-chimie et les possibilités de greffages de biomolécules.

### **Cellulose et fonctionnalisation chimique**

La cellulose est composée d'un assemblage fibreux supramoléculaire de polymères. L'unité de base est un monomère de glucose, molécule cyclique portant trois groupes hydroxyles, reliés aux autres monomères par des liaisons éther-oxydes. Cette structure permet un grand nombre de liaisons hydrogène intra- et inter-moléculaires qui assurent la stabilité et les propriétés mécaniques du papier. Ces atomes d'oxygène et la mobilité des hydrogènes rendent possibles des réactions chimiques d'oxydation, d'amination, d'estérification, d'éthérification, de copolymérisation radicalaire ... [42] Le concept de plateforme bioactive [43, 44] réunit toutes les stratégies de greffages chimiques, traitements de surfaces et d'immobilisations de biomolécules dans le papier.

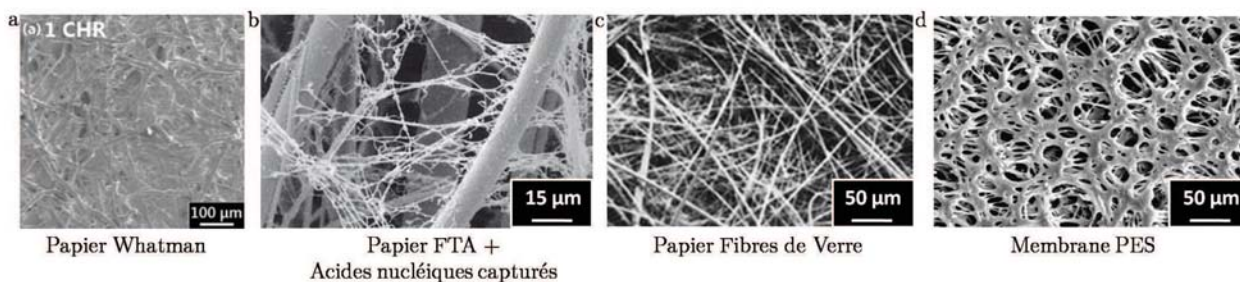
La fonctionnalisation du papier par des biomolécules peut être obtenue par adsorption passive, par liaison covalente ou par affinité biochimique [45]. Les principes d'immobilisation physique sont très simples à mettre en place mais n'offrent qu'un attachement faible et un dépôt non localisé, sans contrôle de l'orientation des biomolécules. La chimie permet un greffage précis et stable par des procédures plus complexes et présentant le risque de dégrader la fonction biologique.

Les traitements de surface ou le dépôt localisé de biomolécules peuvent être réalisés par des imprimantes [46] avec des encres biologiques. Chaque nouvelle formulation est un défi rhéologique (cavitation, gouttes satellites, bouchages, ...) mais permet la création de motifs d'ADN, de cellules, d'anticorps, d'hormones, d'enzymes ...

## Variété des substrats

Les papiers chromatographiques Whatman sont des papiers pure cellulose très utilisés dans la communauté de la microfluidique papier (figure 1.10(a)). Dans cette gamme de papiers cellulosiques, les tests de Guthrie (prélèvements séchés) sont des papiers Whatman 903, dispositifs commerciaux dont on ignore l'exacte composition. Il s'agit surtout de cellulose recouverte d'un traitement de surface assurant une distribution la plus uniforme possible des échantillons. De manière similaire, les cartes FTA sont des papiers Whatman cellulosiques recouverts d'un agent de lyse pour extraire et capturer les acides nucléiques (figure 1.10(b)).

En optant pour des matériaux non végétaux, il est possible de réduire les inhomogénéités. Par exemple, les substrats en fibres de verre (figure 1.10(c)) constituent un équivalent de papier dans lequel le diamètre des fibres est monodisperse et constant au cours du temps (pas de gonflement dû à l'absorption). Les papiers filtres en matériaux polymères s'affranchissent complètement de la structure fibreuse pour proposer une taille de pores bien définie. La composition chimique et l'état de surface sont là aussi fixés avec par exemple des membranes en Poly-Ether-Sulfone (PES figure 1.10(d)).



**Figure 1.10** – Microscopie Electronique à Balayage de différents types de papier.

Avec les membranes artificielles, le papier peut devenir un support sur mesure dont les propriétés d'écoulement, d'adsorption non-spécifique et de porosité sont bien contrôlées. Mais augmenter la complexité du papier a un coût financier et soulève la question de sa disponibilité.

## Visualisation dans le papier

D'un point de vue optique, le papier est un milieu diffusant. A chaque interface air/fibre, un rayon lumineux peut être transmis, absorbé ou diffusé. L'accumulation désordonnée des fibres sur toute l'épaisseur du papier complique la visualisation à l'intérieur du papier. Ainsi, un rayon lumineux incident peut subir de multiples diffusions avant d'être rétro-diffusé, transmis ou absorbé.

La théorie de Kubelka-Munk [47] modélise ces interactions. Un bilan des flux descendants et ascendants est mis en équation pour une épaisseur élémentaire de papier. Les propriétés d'absorption et de diffusion des fibres ainsi que l'épaisseur du papier définissent son caractère transparent, translucide ou opaque.

Dans le cas de tests colorimétriques sur papier, il faut se demander si les marqueurs présents dans toute l'épaisseur participent au signal détecté ou si seule une fraction de l'épaisseur est concernée. De plus, la répartition des réactifs et de l'échantillon influe sur l'homogénéité du signal dans l'espace. Des études comparatives permettent de sélectionner le support adapté [48–51].

## 1.3 La microfluidique papier

Pour transformer une simple feuille de papier en véritable laboratoire d'analyses, il faut contrôler la géométrie des écoulements et implémenter de nouvelles fonctions.

### 1.3.1 Techniques de fabrication

La gestion des écoulements dans le papier consiste principalement à confiner le liquide à l'intérieur d'un motif d'intérêt, et à limiter le poreux accessible. Découper le papier, boucher le milieu poreux et modifier l'état de surface sont les principales techniques de fabrication. L'assemblage de plusieurs épaisseurs de papier permet d'explorer une troisième dimension. Il est également possible d'utiliser le papier comme support en s'affranchissant complètement de sa structure poreuse ou de moduler la porosité pour contrôler les écoulements.

#### Découpe du milieu poreux

Avant même le concept de microfluidique papier, les immunoessais sur papier [52] exploitent déjà une technique de fabrication très simple : le découpage. Par le format bandelette, le liquide est confiné et s'écoule de manière unidirectionnelle alors que dans le plan d'une feuille de papier, un grand nombre de géométries sont possibles [53]. Les opérations de fabrication peuvent être manuelles ou automatisées (lame contrôlée par ordinateur).

Un laser peut aussi être utilisé pour brûler localement le papier [54]. En fonction de la puissance du laser et de sa vitesse de passage, le laser peut découper la feuille de papier ou n'atteindre qu'une fraction de l'épaisseur. Dans cette deuxième configuration, on obtient des structures creusées (figure 1.11). Les cendres qui s'accumulent sous le motif creux, bouchent le milieu poreux et créent un contraste hydrophile (papier) / hydrophobe (cendres). Ces deux actions confinent l'écoulement au sein du motif dessiné par le laser en gardant d'une seule pièce le papier.

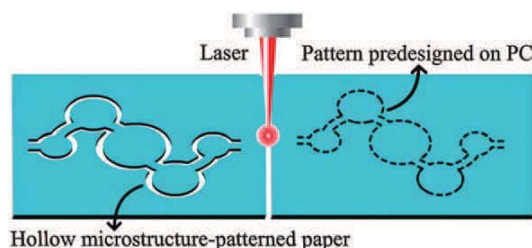
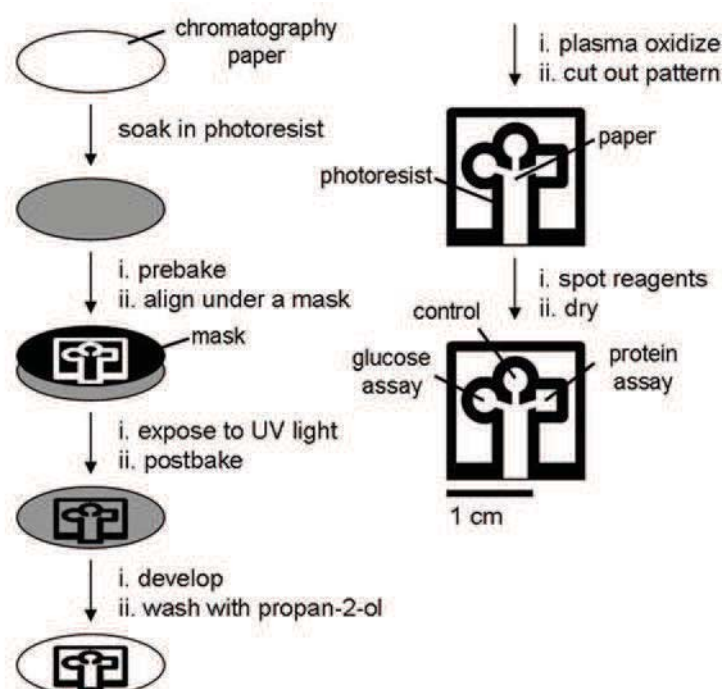


Figure 1.11 – Ecoulement dans des motifs définis par découpe laser.

### Obstruction physique

Une autre stratégie de contrôle de l'écoulement capillaire consiste à boucher localement le milieu poreux. Pour cela, les techniques de microfabrication par photolithographie ont été adaptées sur papier [13], les étapes sont décrites en figure 1.12. Le papier est plongé dans une résine photosensible. Après exposition à travers un masque, la résine est localement solidifiée. Des solutions de lavage et de développement permettent de révéler le motif transféré par le masque, en retirant la résine non solide. Ces protocoles de salle blanche peuvent être simplifiés pour être compatibles avec du matériel plus accessible [55].



**Figure 1.12** – Réticulation de résine dans le papier par photolithographie pour confiner les écoulements.

Un dépôt local de polymère réticulable [56] crée également une fonction de barrière solide sans qu'on ait à exposer l'ensemble du papier à des solutions chimiques, dont on peut douter de la biocompatibilité. Inspiré ici encore par la microfabrication, le PDMS sert d'encre pour dessiner des motifs sur le papier. Avant réticulation, son état liquide lui permet de pénétrer dans les pores du papier et d'atteindre toute l'épaisseur. Comme seule une petite quantité est déposée, il laisse libre d'autres parties du papier. Après réticulation, le polymère devient solide et imperméable aux écoulements. Le dépôt peut être manuel avec une seringue ou automatisé avec une table traçante.

### Contraste de mouillage

La pompe capillaire dépend de l'angle de contact entre le liquide et la surface du support. En utilisant cette propriété, il est possible de guider les écoulements au sein d'un motif hydrophile, entre des barrières hydrophobes (figure 1.13). Ce sont les techniques de contraste de mouillage.

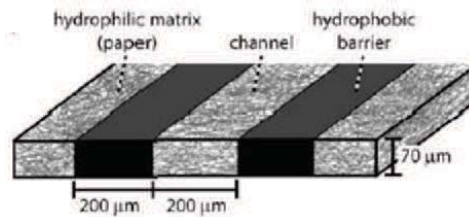


Figure 1.13 – Principe du contraste de mouillage dans le papier.

**Impression de cire** L'impression locale de cire dans le papier crée un contraste hydrophobe (cire) / hydrophile (papier) [57]. De manière similaire aux barrières en PDMS, une imprimante à jet d'encre (figure 1.14(a)) permet de déposer de petites quantités de cire en surface du papier. Une étape de cuisson (2 minutes à 150 ° C) fait fondre la cire qui peut alors pénétrer dans toute l'épaisseur du papier. A température ambiante, la cire redevient solide mais elle a recouvert les fibres de papier qui sont alors hydrophobes. La quantité de cire déposée par l'imprimante n'est généralement pas suffisante pour obstruer complètement tous les pores du papier, c'est donc bien par contraste de mouillage que les liquides sont confinés.



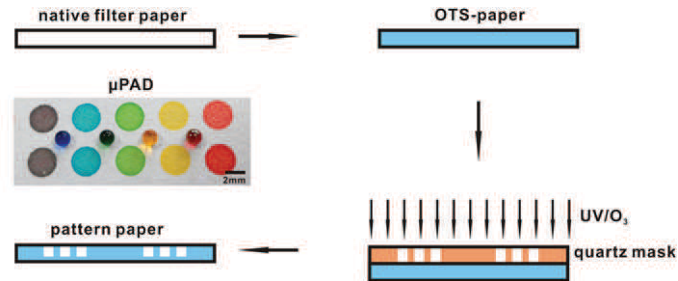
Figure 1.14 – Dispositif expérimental pour l'impression de barrières de cire et pénétration de la cire dans le papier selon la teinte imprimée.

La cire déposée en surface du papier lors de l'impression diffuse dans le papier lors de la cuisson. Cette diffusion peut être décrite suivant deux composantes : horizontalement (dans le plan de la feuille de papier), elle nuit à la résolution spatiale des motifs ; verticalement (dans l'épaisseur), elle crée la fonction de barrières imperméables. La teinte choisie pour l'impression (couleur claire ou foncée) définit la quantité de cire déposée par l'imprimante. Si la quantité de cire est faible, la diffusion ne permet pas d'atteindre toute l'épaisseur du papier et on obtient une barrière partielle. Cette propriété peut être mise à profit pour générer des écoulements tri-dimensionnels au sein d'une seule épaisseur de papier [58] (figure 1.14(b)).

Par ses propriétés hydrophobes, la cire confine les écoulements aqueux mais ne retient pas les solvants organiques notamment le méthanol, l'éthanol, le propanol et l'acétonitrile [59].

**Traitements chimiques** Les techniques de fabrication par traitement chimiques consistent à rendre tout le papier hydrophobe puis d'attaquer localement les fonctions chimiques hydrophobes à travers un masque. Une première version de ce protocole utilise l'Alkyl Ketene Dimer

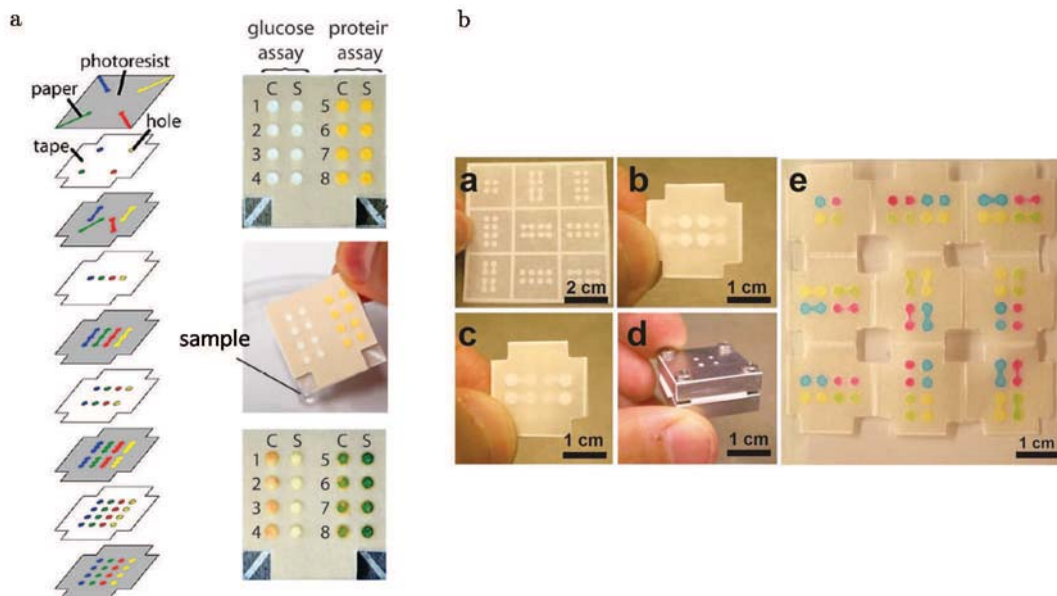
(AKD) comme agent hydrophobe et un traitement plasma à travers un masque métallique pour retrouver le caractère hydrophile du papier [60]. Dans un deuxième exemple, c'est la silanisation qui est adaptée sur papier [61], comme le montre la figure 1.15. Avec une fonction silane portant une longue chaîne carbonée, le papier est rendu hydrophobe. Un traitement UV (ultra-violet) associé à un masque en quartz et résine permet une attaque locale des fonctions greffées.



**Figure 1.15** – Fonctionnalisation chimique du papier pour modifier localement les propriétés de mouillage.

## Origami

L'origami est un art asiatique de pliage de papier. Ce loisir créatif peut être mis à profit dans la microfluidique papier pour générer des géométries d'écoulement plus complexes : le liquide peut s'écouler d'une épaisseur de papier à l'autre.



**Figure 1.16** – Dispositifs papiers multicouches fabriqués par assemblages de plusieurs feuilles ou par pliage.

Les premiers essais de dispositifs multicouches ne reposent pas vraiment sur ce principe de pliage mais consistent en un assemblage de plusieurs épaisseurs [62], comme le montre la figure 1.16(a). Des feuillets en plastique sont utilisés pour séparer et isoler les couches de papier. La connexion liquide locale entre les épaisseurs est assurée par des trous remplis de poudre de cellulose, dans les feuillets en plastique. Ce format compact est utile pour répartir un liquide

vers un grand nombre de zones ou pour que des liquides aient des trajectoires croisées sans se mélanger. Les mêmes propriétés peuvent être obtenues après pliage du papier, à partir d'un motif plan, imprimé à la cire [37] (figure 1.16(b)).

Inspiré des livres pour enfants et des cartes de vœux, les papiers "pop-up" sont des pliages qui font apparaître une structure en relief [63]. Le pliage modifie la forme et les connections fluidiques et électriques.

### Microcanaux dans le papier

Un peu à contre-courant, des équipes proposent d'utiliser le support papier pour y fabriquer des microcanaux sans utiliser la porosité naturelle ni la pompe capillaire. Pour cela, le papier est rendu complètement hydrophobe, voire omniphobe, par greffage chimique. Un laser [64], une lame de rasoir [65] ou un moule [66] peuvent être utilisés pour couper ou déformer le papier en une géométrie de microcanaux. Comme dans les microsystèmes, il faut alors une source extérieure d'énergie (contrôle en pression ou en débit) pour générer les écoulements (voir section 1.1.1). Ces dispositifs ne sont donc pas à comparer avec les puces papier mais plutôt avec les puces en verre ou en polymère. La déformabilité du papier permet la réalisation de structures à trois dimensions et l'implémentation facile de vannes par pliage.

Les principales méthodes sont rassemblées et comparées dans la figure 1.17. L'ensemble des techniques de fabrication présentées ont des résolutions similaires de l'ordre de 500  $\mu\text{m}$  (largeur minimale de barrière et de microcanal). Ce sont donc plutôt des critères de coût, d'équipements, de biocompatibilité et de résistance aux solvants qui vont guider le choix d'une technique par rapport à une autre. La notion micrométrique de la microfluidique papier provient de la structure poreuse et des forces capillaires associées. Il n'est pas nécessaire que la puce papier reste dans ces dimensions. En effet, l'écoulement doit rester visible à l'œil nu et les volumes d'échantillons manipulables avec peu d'équipements : distances millimétriques et volumes micrométriques.

Technique de fabrication	Réf.	Principe	Résolution	Automatisation	Coût
Découpe laser	Nie 2013	Limite physique du poreux	500 $\mu\text{m}$	+++	\$
Photolithographie	Martinez 2007	Limite physique du poreux	150 $\mu\text{m}$	+	\$\$
Barrières en PDMS	Bruzewicz 2008	Limite physique du poreux	1 mm	++	-
Impression de cire	Carrilho 2009	Contraste de mouillage	500 $\mu\text{m}$	+++	-
AKD - plasma	Li 2008	Contraste de mouillage	500 $\mu\text{m}$	++	\$
Silanisation - UV	Ma 2012	Contraste de mouillage	300 $\mu\text{m}$	++	\$

**Figure 1.17** – Tableau comparatif des principales techniques de fabrication.

La photolithographie atteint la meilleure résolution spatiale mais le grand nombre d'étapes de fabrication et le coût ne sont pas favorables à son utilisation pratique. Toutes les autres techniques sont plus faciles à mettre en œuvre et proposent des performances similaires. L'impression de cire apparaît comme une méthode originale et très facile d'accès.

### 1.3.2 Illustration de fonctions microfluidiques

A partir des techniques de fabrication et avec des géométries originales, il est possible d'implémenter sur papier des fonctions microfluidiques. Ces briques élémentaires pourront par la suite être combinées pour atteindre l'objectif de laboratoire sur papier.

#### Parallélisation des écoulements

Les tests bandelettes, voir section 2.1, sont des dispositifs de diagnostic sur papier très robustes qui donnent une information binaire à propos d'un biomarqueur. Dans l'esprit d'un laboratoire sur papier, le concept de multiplexage apparaît. Il s'agit de réaliser plusieurs analyses sur un même échantillon ou de traiter plusieurs échantillons en même temps. Les nouvelles techniques de fabrication de la microfluidique papier, décrites dans la section 1.3.1, permettent de nombreuses stratégies de parallélisation.

**Géométries** La version papier des plaques multipuits, en figure 1.18(a), est un réseau de disques de papier hydrophiles au sein d'une matrice hydrophobe [57]. Chaque disque devient un réservoir indépendant dans lequel des réactifs et des échantillons peuvent être déposés. Le papier n'est utilisé ici que comme support et dépend donc d'autres opérations manuelles (pipettes).

Dans une géométrie adaptée, l'écoulement capillaire peut être utilisé pour transporter et distribuer un échantillon vers plusieurs milieux réactionnels. Plusieurs exemples dans la littérature démontrent cette propriété : l'analyse d'urine sur papier avec des motifs en résine [13] (figure 1.18(b)) ou plusieurs tests bandelettes en parallèle sur papier découpé [53] (figure 1.18(c)).

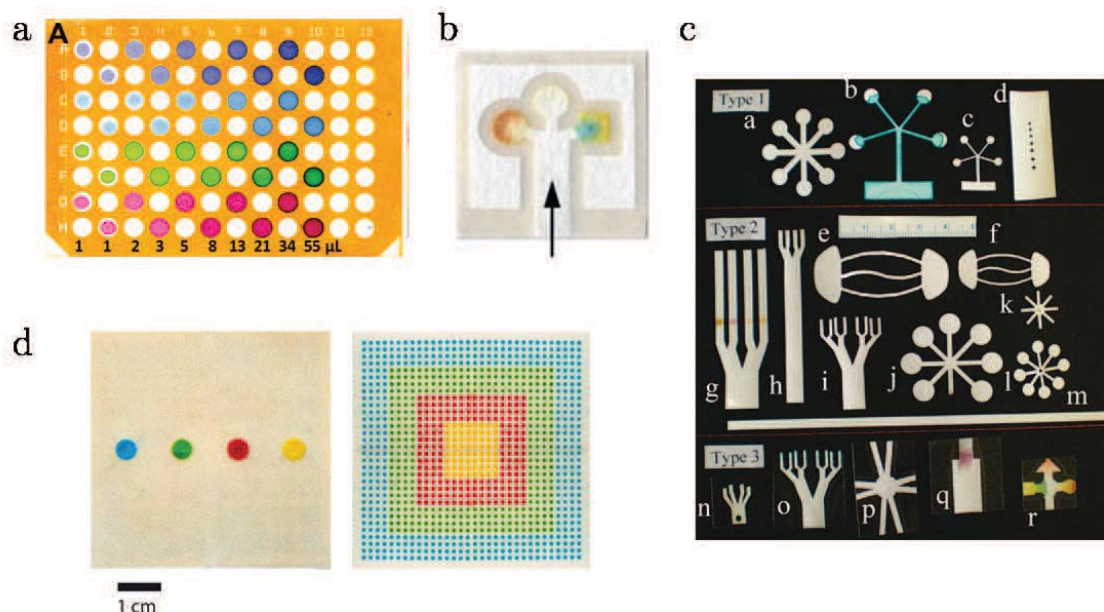


Figure 1.18 – Parallélisation des analyses sur papier.



**Dispositifs multicouches** Une feuille de papier permet déjà une grande variété de motifs pour diverses applications de diagnostic. En exploitant la troisième dimension, le principe d'origami décuple les performances de la microfluidique papier. Il a notamment été démontré la réhydratation parallélisée de 1024 zones grâce à ces écoulements d'une épaisseur de papier à l'autre [62] comme le montre la figure 1.18(d). Après l'écoulement, le dispositif papier peut être ré-ouvert et déplié si besoin [58].

### Mélange et séparation

La laminarité des écoulements microfluidiques n'est pas favorable aux mélanges qui dépendent de la diffusion. Selon la longueur considérée, les temps de diffusion peuvent être longs. En superposant deux bandelettes de papier, la diffusion se produit sur toute la largeur des canaux papier. Le mélange est total lorsque la longueur de diffusion est égale à l'épaisseur de papier (typiquement 200  $\mu\text{m}$ ) [67]. Dans une géométrie papier en T, seuls quelques centimètres sont nécessaires pour observer un bon mélange. De plus, comme la vitesse de l'écoulement dépend de sa distance au réservoir, la proportion de chaque composant du mélange peut être modulée par la distance de chaque entrée. En jouant sur le contraste de diffusion de deux espèces, il est possible d'extraire l'espèce la plus mobile du mélange. C'est le concept du filtre H qui peut être recréé sur papier.

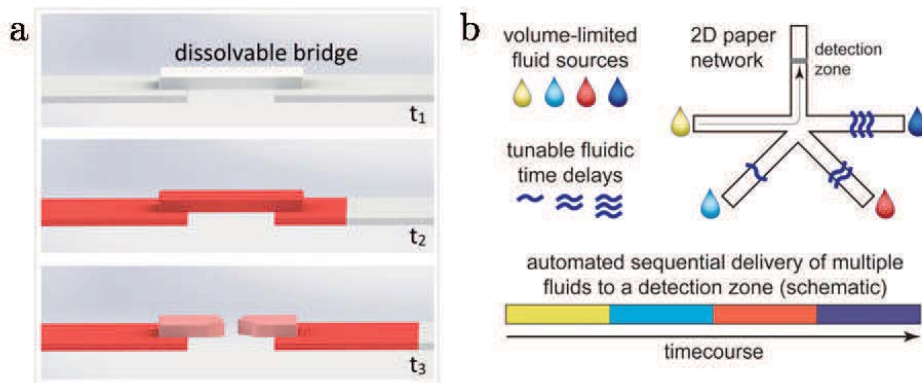
Par sa structure poreuse, le papier limite l'écoulement de particules plus grandes que la taille de pores. Cette structure est également à l'origine d'une augmentation du rapport surface/volume qui implique plus d'adsorption non spécifique et de rétention chromatographique que dans un équivalent non poreux. Les composants d'un mélange sont donc naturellement séparés dans un support papier. Ces propriétés de séparation peuvent être mises à profit dans la préparation d'échantillons biologiques, comme décrit dans la section 2.2.2.

### Vannes

Grâce à la pompe capillaire, les écoulements dans le papier sont spontanés et indépendants de sources d'énergie extérieures. Cette autonomie est obtenue au détriment du contrôle. Quand le liquide est au contact du papier, la pompe capillaire démarre et suit la loi de Lucas-Washburn (voir section 1.2.1). Dans une configuration simple, les seuls éléments qui peuvent stopper l'écoulement sont : une saturation de tout le papier accessible ou l'assèchement du réservoir. Dans l'idée d'ajouter de nouvelles fonctionnalités au papier, il apparaît nécessaire de créer des systèmes de vannes pour actionner sur demande l'écoulement.

**Pliages** L'action de plier/déplier une puce papier multicouche [62] est déjà une action mécanique de vannes. En déplaçant un morceau de papier, l'opérateur coupe/rétablit la connexion fluidique. Cette fonction est particulièrement utilisée pour fonctionnaliser les zones de papier avec des réactifs. Dans la configuration ouverte, les zones de papier sont indépendantes et des réactifs différents peuvent être déposés dans chacune d'elles. Après séchage, le dispositif est replié, les réactifs sont alors prêts à l'emploi mais ne diffusent pas dans le reste de la puce papier puisqu'ils sont secs. Seul l'apport d'un échantillon liquide démarre l'écoulement.

**Dissolution** Pour arrêter un écoulement, il faut briser la trajectoire qui relie le réservoir liquide et l'extrémité de papier. Les opérations manuelles consistent à couper ou déplier le papier. Cette fonction peut être automatisée grâce à un milieu poreux éphémère [68]. Un simple morceau de sucre est un milieu poreux dans lequel le liquide s'écoule comme dans le papier, mais au cours du temps, le sucre est dissout dans le liquide. Cette dissolution détruit le milieu poreux jusqu'à rompre la connexion fluide, comme le montre la figure 1.19(a). Selon la taille et les propriétés de dissolution de cet élément, la vanne arrête l'écoulement après un temps donné.



**Figure 1.19** – Principes de vannes par dissolution de pores.

Ce concept de dissolution peut également être utilisé pour retarder l'arrivée d'un liquide [69] (figure 1.19(b)). Par exemple, pour voir l'arrivée séquencée de quatre réactifs, les auteurs utilisent quatre réservoirs de taille finie et placent sur chaque trajet une quantité différente de sucre. Plus cette quantité est importante, plus le réactif est ralenti. Dans cette situation, le mécanisme d'action n'est pas évident puisque chaque terme de l'équation de Lucas-Washburn est modifié : les propriétés d'interface (tension de surface et angle de contact), la taille des pores et la viscosité de la solution. Des expériences complémentaires indiquent que le paramètre prédominant est le changement de viscosité.

Le principal défaut de ces systèmes de dissolution est que la composition du liquide change au cours du temps. Cela ajoute également la contrainte d'un élément dissolu qui n'interfère pas avec la réaction biologique. En pratique, la notion de délai peut être obtenue par différentes longueurs de trajectoires papier. D'autres stratégies consistent à modifier localement le milieu poreux qui peut être partiellement obstrué [70] ou comprimé [28].

**Actionneurs** Une vanne peut aussi être obtenue par un déplacement mécanique pour connecter/déconnecter des canaux papier. Ce type d'actionneur, schématisé en figure 1.20(a), a été réalisé avec un matériau qui peut gonfler au contact du liquide comme une éponge [71]. Lorsque l'actionneur est connecté à un réservoir liquide, son expansion provoque le déplacement mécanique d'un canal papier principal. Selon la géométrie, cette fonction provoque la connection / déconnection de deux canaux ou un changement de trajectoire. Le principe de cet actionneur sur une épaisseur différente et avec son réseau de connection fluide est l'équivalent papier des vannes pneumatiques microfabriquées [72]. Cette version papier reste cependant à usage unique.

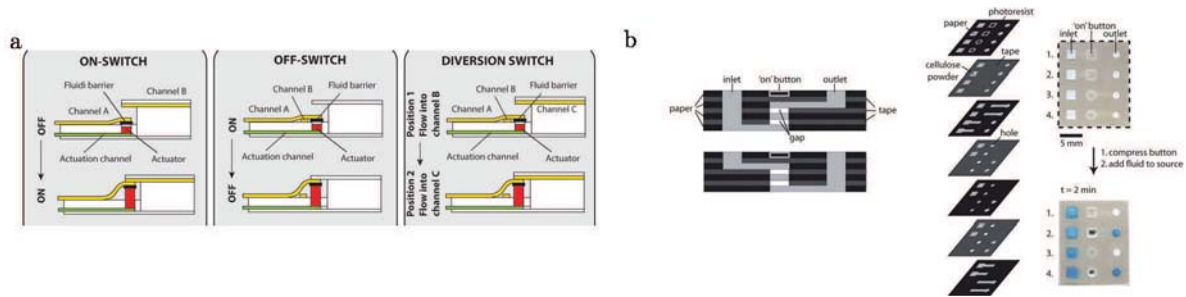


Figure 1.20 – Actionneurs obtenus par déplacement ou déformation du papier.

La déformabilité du papier peut assurer la fonction de vanne pour démarrer sélectivement un écoulement. En insérant un espace libre (d'air) au sein d'un dispositif multicouche, on brise la connexion fluide [73] (figure 1.20(b)). Une simple pression type bouton ON déforme le papier localement et rétablit la pompe capillaire.

## 1.4 Limites du support papier

S'il est possible d'implémenter de nombreuses fonctions sur une puce papier, les propriétés naturelles du support sont responsables de certaines limites. D'une part, le grand volume mort du milieu poreux et la pompe capillaire contribuent à disperser spatialement l'échantillon, ce qui n'est pas favorable à la détection. D'autre part, les écoulements dans le papier sont encore peu décrits dans la littérature.

### 1.4.1 Seuil de détection

Le milieu poreux qui constitue le papier a une taille de pores micrométriques qui en fait un objet microfluidique. Contrairement aux puces issues de la microfabrication dont la géométrie et le volume des microcanaux sont définis à la demande, la structure du papier est très désordonnée.

La résolution millimétrique des techniques de fabrication par lesquelles l'écoulement peut être confiné, ne permet pas d'atteindre les dimensions d'un microcanal unique. Le principal inconvénient qui en découle est un volume mort non négligeable. L'association de ce volume mort et de la pompe capillaire provoque la dispersion spatiale autonome de n'importe quel échantillon déposé sur le papier.

Ainsi, les analytes présents dans le liquide ne sont plus définis par leur concentration dans le liquide mais selon leur répartition spatiale dans le milieu poreux. Cette dernière peut être inhomogène par effet chromatographique ou stérique, selon les affinités chimiques avec les surfaces du milieu poreux.

L'écoulement qui tend à répartir l'échantillon le transporte en surface et en volume dans le milieu poreux. Les propriétés diffusantes sont néfastes à la détection optique dans le papier. Tous ces phénomènes contribuent à un seuil de détection faible dans le papier.

### 1.4.2 Description de la physique des écoulements

Le modèle de Lucas-Washburn décrit une avancée de front liquide de manière macroscopique, sans rendre compte de profil de vitesses locaux. Les mécanismes complexes d'écoulement font l'objet de peu de mesures expérimentales.

D'une part, la structure désordonnée du papier rend difficile la visualisation dans le papier. D'autre part, les nombreuses variations physico-chimiques des supports papier sont autant de configurations différentes.

## 1.5 Ce qu'il faut retenir

**Support papier** La dénomination "papier" regroupe une grande variété de milieux poreux. Depuis un enchevêtrement hétérogène de fibres de cellulose jusqu'aux filtres dont la taille de pores est bien contrôlée, les comportements physico-chimiques et les écoulements peuvent y être bien différents.

L'état de surface du papier définit ses propriétés de mouillage et les affinités chromatographiques des espèces en solution. La fonctionnalisation chimique est possible par adsorption physique ou greffage covalent, de manière globale ou locale.

**Physique des écoulements** Dans un cas de mouillage total, une goutte posée sur une surface lisse s'étale selon les dynamiques modélisées par les lois de Tanner. Pour des situations de mouillage partiel et en présence de rugosité comme celle du papier, les lois de Wenzel et Cassie-Baxter décrivent des comportements extrêmes (super-hydrophobe / super-hydrophile) dus à la texture.

En parallèle de ces interactions de surface, l'imbibition capillaire du milieu poreux suit la loi de Lucas-Washburn : l'avancée du front liquide est proportionnelle à la racine du temps. Ce modèle, local à l'échelle du pore, s'applique à des configurations unidirectionnelles de bandelettes de largeur constante. Un élargissement ou une restriction induit une déviation à la loi de Lucas-Washburn.

**Fonctions microfluidiques** A partir de la simple bandelette de papier, il est possible de créer un objet microfluidique complexe. Pour cela, des techniques de fabrication permettent de prédéfinir les trajectoires liquides dans le milieu poreux. L'impression de barrières de cire apparaît comme une innovation robuste, personnalisable et très accessible.

Selon la géométrie des motifs et par assemblage de plusieurs épaisseurs de papier, les fonctions de parallélisation des expériences, de mélange, de vannes sont intégrées dans les puces papier.

---

 Applications de diagnostic médical sur papier
 

---

**Table des matières**


---

2.1	Le papier dans les sciences analytiques . . . . .	<b>37</b>
2.1.1	Exemples de dispositifs papiers . . . . .	37
2.1.2	Les tests bandelettes . . . . .	38
	Fonctionnement . . . . .	38
	Application à la détection de troponine . . . . .	39
2.1.3	Prélèvements séchés sur papier . . . . .	40
2.2	Préparation d'échantillons biologiques . . . . .	<b>41</b>
2.2.1	Protocoles standard en laboratoire . . . . .	41
	Extraction d'acides nucléiques . . . . .	42
2.2.2	Exemples de préparations sur papier . . . . .	42
	A partir de fluides corporels . . . . .	42
	Application au sang total . . . . .	43
2.2.3	Purification d'acides nucléiques sur papier . . . . .	44
	Extraction . . . . .	44
	Procédés de concentration . . . . .	45
2.3	Détection de pathogènes directe/indirecte . . . . .	<b>46</b>
2.3.1	Microscopie et culture cellulaire . . . . .	46
2.3.2	Tests de biologie moléculaire . . . . .	47
	Polymerase Chain Reaction . . . . .	47
	Amplifications isothermes . . . . .	48
	Problèmes de biocompatibilité . . . . .	49
2.3.3	Immunoessais . . . . .	50
2.3.4	Comparaison des trois méthodes . . . . .	51
	Performances . . . . .	51
	Fenêtre de diagnostic . . . . .	52
2.4	Tests de biologie moléculaire sur papier . . . . .	<b>53</b>

---

2.4.1	Détection d'acides nucléiques sur papier . . . . .	53
	Couplage immunoessais et acides nucléiques . . . . .	53
	Dispositifs de type chromatographique . . . . .	54
	Format zones de dépôts . . . . .	55
	Détection sous écoulement . . . . .	56
2.4.2	Amplification d'acides nucléiques sur papier . . . . .	57
	Compatibilité amplification et papier . . . . .	57
	Dispositifs papiers multi-étapes . . . . .	58
2.5	Enjeux de cette thèse . . . . .	<b>60</b>
2.5.1	Utiliser la physique des écoulements pour améliorer la limite de dé- tection . . . . .	60
	Imbibition capillaire et étalement de goutte . . . . .	61
	Focalisation spatiale d'échantillons . . . . .	61
2.5.2	Développer les performances des systèmes standard . . . . .	61
	Revisiter les tests bandelettes . . . . .	61
	La microfluidique pour éluer les prélèvements séchés . . . . .	61
2.5.3	De nouvelles solutions de diagnostic pour le virus Ebola . . . . .	62
	Etudes de la biologie moléculaire sur papier . . . . .	62
	Confrontation aux conditions de terrain . . . . .	62
2.6	Ce qu'il faut retenir . . . . .	<b>63</b>

---

LE papier est une plateforme microfluidique intéressante par ses propriétés d'écoulement, de filtration, de stockage et par la diversité des états de surface (cellulose, membranes, greffages chimiques). Ces fonctions sont déjà mise à profit dans certains outils des sciences analytiques. Mais pour transformer le papier en support de laboratoire sur puce, il faut démontrer que ce substrat est compatible avec les analyses de laboratoire : depuis l'échantillon brut jusqu'au résultat du test. Traiter des matrices biologiques complexes et en extraire les analytes d'intérêt sont les enjeux de la préparation d'échantillons. Le diagnostic de maladies infectieuses consiste à détecter la présence du pathogène soit directement soit par une réponse spécifique du corps humain. Parmi les trois principales voies de diagnostic, la culture cellulaire est le procédé le plus fiable mais requiert un délai de culture non compressible (plusieurs heures voire jours). Les immunoessais combinés au papier sont déjà largement documentés sous le format de tests bandelettes. Enfin, les tests d'amplification d'acides nucléiques sur papier ouvrent de nouvelles perspectives pour un diagnostic de terrain, précoce, sensible et spécifique.

L'analyse bibliographique de la préparation d'échantillons sur papier et de la compatibilité du papier avec l'amplification et la détection d'acides nucléiques fait l'objet d'un article de revue pour le journal *Lab on a Chip* en cours de révision.

## 2.1 Le papier dans les sciences analytiques

Le papier possède de nombreuses propriétés d'intérêt pour des applications de diagnostic au laboratoire ou sur le terrain. Le milieu poreux facilite le stockage sous forme séchée. S'il s'agit de réactifs, ils rendent le papier fonctionnel et prêt à l'emploi. Dans le cas d'échantillons biologiques, le papier facilite leur conservation et transport. La pompe capillaire assure la migration d'analytes alors que la porosité peut servir de milieu filtrant. Une de ces propriétés peut être amplifiée par rapport aux autres selon la composition et la structure du papier. Il n'existe donc pas un papier universel mais un grand nombre de supports celluloseux et autres membranes.

### 2.1.1 Exemples de dispositifs papiers

Le papier pH est un outil de sciences analytiques dans lequel est stocké un indicateur coloré séché. Au contact d'un liquide, sa coloration indique le pH de la solution. S'il existe une large gamme de papiers pH, une plus grande précision est obtenue en utilisant des bandelettes sur lesquelles plusieurs indicateurs colorés sont stockés dans des petites zones indépendantes. Ce même principe a permis le développement de bandelettes urinaires : jusqu'à 11 réactions colorimétriques séchées sur papier qui informent sur la composition de l'urine.

Le papier est utilisé en chromatographie. Selon leur interaction avec le substrat, les composants d'un mélange migrent à différentes vitesses dans le papier.



### 2.1.2 Les tests bandelettes

Les tests bandelettes sont des dispositifs réalisant des immunoessais (voir section 2.3.3) sur papier [52]. Ils sont connus du grand public par l'exemple du test de grossesse disponible en pharmacie et réalisable par la femme elle-même. Dans cet exemple, la bandelette de papier permet la détection d'une hormone spécifique de la grossesse, la protéine  $\beta$ -hCG (Hormone Chorionique Gonadotrope), dans l'urine.

#### Fonctionnement

Le principe de fonctionnement le plus classique repose sur la formation de complexes antigènes-anticorps dans le format sandwich comme décrit dans la figure 2.1. L'antigène est reconnu par deux anticorps : l'un dit de capture est greffé dans une zone de papier, le second dit de détection est mobile et porte un marqueur détectable. Tous les réactifs sont stockés au sein de la bandelette. Au contact de l'échantillon, l'écoulement capillaire spontané transporte les anticorps de détection jusqu'à la ligne de capture et au-delà. Si l'antigène est présent, la formation du complexe permet de retenir l'anticorps de détection au-dessus de cette ligne. Une seconde ligne est fonctionnalisée par des anticorps capables de capturer l'anticorps de détection seul. Elle agit comme contrôle pour s'assurer du bon transport des anticorps de détection par l'échantillon.

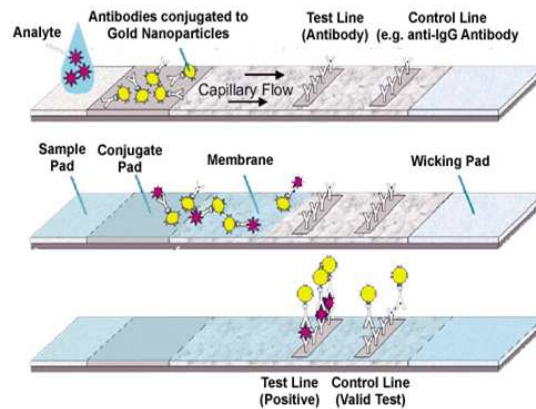


Figure 2.1 – Immunoessais sur bandelettes

La bandelette et les réactifs sont conservés à température ambiante et restent prêts à l'emploi. Le protocole d'utilisation est accessible à des opérateurs non qualifiés puisqu'il s'agit simplement de tremper la bandelette dans l'échantillon biologique. Dans le cas du test de grossesse, aucune préparation d'échantillon (l'urine) n'est nécessaire.

L'interprétation du résultat est simple :

- seule la ligne de contrôle est visible : test négatif,
- les deux lignes sont visibles : test positif,
- seule la ligne de test est visible : test non valide,
- aucune des lignes n'est visible : test non valide.

Le signal peut être visuel si des particules colloïdales sont greffées aux anticorps de détection [52]. Il existe également des dispositifs portables de lecture de fluorescence [74] pour

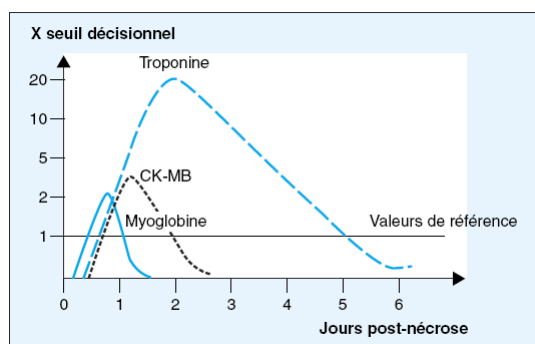
mesurer le signal de fluorochromes. Une analyse semi-quantitative est possible mais il s'agit généralement d'une lecture binaire selon le seuil de détection.

En pratique, les bandelettes ne sont pas simplement constituées de papier. Il s'agit d'un assemblage de membranes de nitrocellulose aux différentes propriétés. Un premier élément assure la filtration de l'échantillon ("loading pad"). Il est en contact avec un deuxième matériau poreux qui contient les anticorps de détection ("conjugate pad"). L'élément principal de la bandelette est une membrane de nitrocellulose sur laquelle sont greffées les deux lignes d'anticorps (de test et de contrôle). L'écoulement liquide le long de la bandelette est entretenu par un dispositif absorbant ("wicking pad") positionné à l'extrémité.

La spécificité des complexes anticorps-antigènes permet d'adapter les tests bandelettes à une grande variété de cibles biologiques. On trouve notamment la détection de virus (HIV et grippe) [75, 76], de maladies sexuellement transmissibles (Syphilis) [77], de bactéries (Staphylocoque) [78], de biomarqueurs cardiaques [79], de stupéfiants (morphine) [80].

### Application à la détection de troponine

La troponine est un biomarqueur cardiaque associé au diagnostic des infarctus du myocarde [81]. Il n'est ni le seul ni le plus précoce des marqueurs libérés dans l'organisme mais sa spécificité et sa persistance en font une excellente cible (figure 2.2).



**Figure 2.2** – Quantités libérées de biomarqueurs cardiaques au cours d'un infarctus du myocarde.

Dans la littérature [82], de nombreux outils de détection de la troponine sont décrits et comparés. Tous reposent sur un test immunologique éventuellement associé à une activité enzymatique ou des nanoparticules d'or. Les systèmes de détection varient (colorimétrie, fluorescence, électrochimie, ...) ainsi que les durées d'analyses : de cinq minutes à plus de trois heures. Une limite de détection record à 0,2 pg/mL est annoncée [83]. Cependant le matériel requis pour l'analyse à l'échelle de la molécule unique éloigne la perspective d'un test rapide au chevet du patient. En pratique, il existe des dispositifs commerciaux (Abbott i-STAT, Alere Triage, Roche Diagnostics, ...) qui atteignent des limites de détection de l'ordre de 10 pg/mL. Tous fonctionnent sur le principe de cartouches à usage unique associées à un lecteur dont le coût dépasse US\$ 10 000.

Depuis les tests bandelettes, la microfluidique papier s'est appropriée les immunoessais. Deux principales stratégies sont mises en place pour tenter d'améliorer les performances de diagnostic : une géométrie simple associée à un protocole complexe (figure 2.3(a) [84]) ou une géométrie

complexe associée à un protocole simple (figure 2.3(b) [85]). Dans le premier cas, ce sont de simples disques de papier qui servent de support réactionnel. Cinq opérations manuelles sont nécessaires pour apporter successivement chaque réactif. Avec ce dispositif, le diagnostic reste long (70 minutes) et peu sensible ( $10 \mu\text{g/mL}$ ). Le second exemple démontre une puce papier dont l'utilisation reste similaire au test bandelette (format dipstick). Les trajectoires liquides y sont plus complexes de sorte à retarder l'arrivée de certains réactifs par rapport à d'autres. Dans cette configuration, la détection atteint une limite de détection de  $5 \text{ ng/mL}$  en 15 à 30 minutes.

Pour comparaison, un test bandelette conventionnel a une limite de détection à  $1 \text{ ng/mL}$  et plus exceptionnellement  $10 \text{ pg/mL}$  [86]. En ce qui concerne les immunoessais, l'avantage des récents développements de la microfluidique papier sur les précédents dispositifs n'est pas encore démontré.

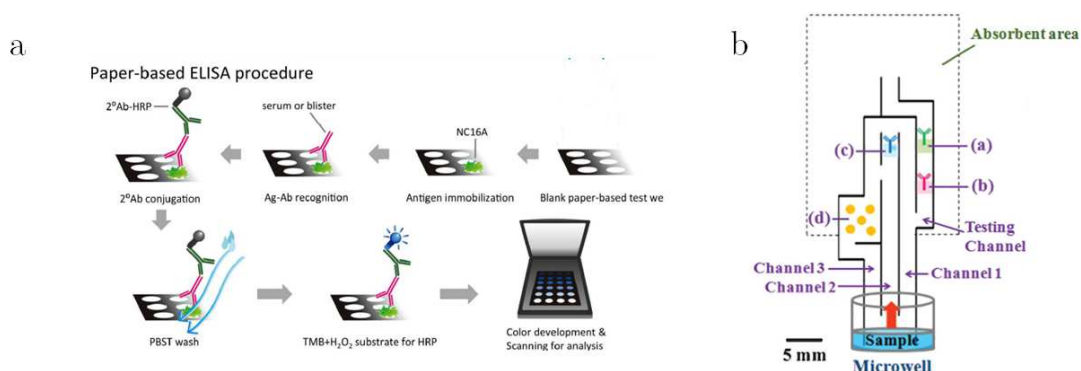


Figure 2.3 – Immunoessais sur des dispositifs de la microfluidique papier.

### 2.1.3 Prélèvements séchés sur papier

Rapporté dans la littérature depuis 1963 [87], le papier est un support intéressant pour le stockage d'échantillons biologiques. Le principe est qu'une goutte de sang mise au contact d'un papier "buvard" est absorbée par la pompe capillaire (figure 2.4). En laissant sécher ce prélèvement, il peut être conservé et transporté facilement avant d'être analysé. Cette technique est communément appelée "Test de Guthrie" ou "Dried Blood Spot" (DBS). Il est aujourd'hui réalisé en routine chez les nouveau-nés pour lesquels une prise de sang standard est très invasive contrairement à une goutte de sang obtenue par une aiguille dans le talon ou au bout du doigt. La simplicité d'utilisation associée à la possibilité de transport rend également cette technique particulièrement avantageuse dans les régions de désert médical.

L'analyse de ces prélèvements séchés est utilisée pour des applications de diagnostic individuel et pour le suivi de biomarqueurs à l'échelle de la population. Plus de 45 analytes sont susceptibles d'être analysés à partir de ces échantillons séchés [88]. Dans le domaine du diagnostic, plusieurs articles proposent et démontrent la possibilité de tests de biologie moléculaire, pour la détection d'HIV réalisés directement sur l'éluat du test de Guthrie [89–93]. D'autres maladies peuvent également être détectées comme les hémoglobinopathies, les dystrophies musculaires, les fibroses kystiques [89].



**Figure 2.4** – Prélèvement de sang pris au talon d'un nourrisson et séché sur papier.

Au laboratoire, l'analyse de ces prélèvements séchés est précédée d'une étape d'élution [94]. Le papier est perforé de sorte à obtenir un disque de diamètre 5mm, contenant l'échantillon. Le disque est placé au fond d'un microtube ou d'une plaque multipuits pour des analyses parallélisées. Environ 200  $\mu\text{L}$  d'une solution tampon phosphate sont ajoutés et il faut attendre plusieurs heures d'élution passive avant de récupérer l'éluat. Chaque éluat peut être dilué et aliquoté pour permettre plusieurs tests sur un même échantillon. Il existe de nombreuses variations de ce protocole intégrant des étapes d'incubation, d'agitation et de centrifugation [95]. Tous nécessitent plusieurs heures d'élution et des opérations manuelles.

## 2.2 Préparation d'échantillons biologiques

L'étape de préparation d'échantillons est indispensable pour rendre accessible la cible du diagnostic et limiter la présence d'inhibiteurs qui peuvent compromettre la qualité du test. Dans la démarche d'outils utilisables au chevet du patient, le test doit pouvoir analyser des échantillons issus de prélèvements les moins invasifs possibles. De plus, leur préparation doit respecter les mêmes contraintes logistiques et pratiques : autonomes en énergie, peu chers, faciles d'utilisation.

### 2.2.1 Protocoles standard en laboratoire

Au laboratoire, la préparation d'échantillons dépend à la fois du type d'analyses considérées et de la matrice biologique de départ. Les principales étapes consistent à diluer l'échantillon dans un milieu réactionnel, à mélanger et séparer différentes phases avec des instruments de routine (vortex et centrifugeuse). Dans ces conditions, les immunoessais peuvent être réalisés à partir d'une grande variété d'échantillons bruts : extraits cellulaires, sang total, urine, salive [96]. Pour la culture cellulaire, il est souvent nécessaire de filtrer de grands volumes d'échantillons (de quelques millilitres à plusieurs litres) pour capturer les cellules d'intérêt avant de réaliser la culture.

## Extraction d'acides nucléiques

Les tests de biologie moléculaire nécessitent une préparation d'échantillon plus complexe pour extraire et purifier les acides nucléiques. Il existe deux principales stratégies : d'abord isoler les cellules d'intérêt (souvent un simple filtre), puis les lyser pour libérer les acides nucléiques ou alors lyser directement tout l'échantillon biologique et procéder à une étape de capture des acides nucléiques. Il existe de nombreux protocoles de lyse qui consistent à casser la membrane cellulaire par des principes chimiques (choc osmotique), biologiques (digestion enzymatique), thermiques, mécaniques (billes, ultrasons, ...) ou une combinaison de ces procédés. La capture des acides nucléiques repose souvent sur les principes d'hybridation à partir de billes magnétiques traitées en surface.

Il existe déjà un certain nombre de technologies commerciales pour la purification d'acides nucléiques dans un contexte de terrain. Des auteurs en proposent une comparaison appliquée à la détection d'HIV à partir de plasma humain [97]. Le système le plus reconnu à l'heure actuelle est le GeneXpert. L'échantillon est chargé dans une puce microfluidique, une première étape de filtre isole les cellules d'intérêt. La lyse cellulaire est réalisée par des ultrasons. Enfin, des étapes de lavage, de purification et de concentration des acides nucléiques précèdent l'amplification. Pourtant, ce dispositif reste cher, dépendant en énergie et il contient une plateforme thermique sophistiquée pour laquelle la maintenance et la logistique ne sont pas adaptées aux contraintes de terrain. Parmi les autres procédures étudiées par les auteurs, le support papier apparaît comme une solution pertinente. Les membranes FTA agissent comme des filtres imprégnés d'une solution brevetée qui lyse et capture les acides nucléiques. Le protocole contient 10 étapes (contre une moyenne de 18,5 étapes pour l'ensemble des procédures comparées), nécessite peu d'instrumentation (perforatrice et centrifugeuse) et des réactifs additionnels non réfrigérés, peut être réalisé par un opérateur peu qualifié. Le coût par analyse reste accessible (£1,76) mais c'est le protocole le plus long (plus de 120 minutes)

### 2.2.2 Exemples de préparations sur papier

Le concept de laboratoire sur papier consiste à combiner toutes les étapes d'analyses dans une même puce papier. Pour que les arguments de coûts et de simplicité d'utilisation restent valides, il faut que l'échantillon soit simple à collecter et que les étapes de préparation soient incluses dans le dispositif.

#### A partir de fluides corporels

Pour démontrer le potentiel du papier microfluidique, il faut illustrer la grande variété des tests biologiques et travailler à partir de différents échantillons bruts.

Puisque l'urine est beaucoup moins visqueuse que la plupart des fluides biologiques (sang, salive, selles), elle ne nécessite pas de préparation particulière. Sa coloration légère est favorable aux tests colorimétriques comme dans le cas des bandelettes urinaires. Dans un papier à écoulements confinés (barrière de cire ou résine), la première démonstration d'application de diagnostic a été l'analyse d'urines : détection simultanée et semi-quantitative (colorimétrie) des taux de glucose et de BSA (Bovine Serum Albumin) [13]. Cependant, cette démonstration illustrée en figure 2.5(a) n'a été faite que sur des urines artificielles, c'est-à-dire de simples

solutions aqueuses contenant les analytes d'intérêt à différentes concentrations. Pour simuler des conditions réelles, de la poussière est ajoutée et n'impacte pas la détection mais aucune information n'est apportée sur la possible présence d'inhibiteurs dans l'urine naturelle. De plus, les tests urinaires sont contestés à cause de la variabilité de la concentration des analytes au cours du temps [98].

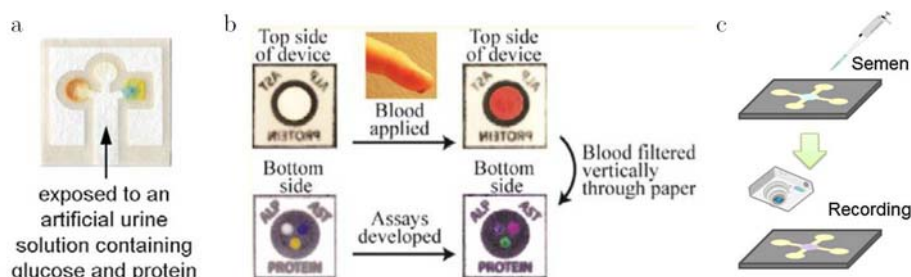


Figure 2.5 – Analyse de fluides corporels sur papier.

La détermination du taux salivaire de nitrite a été démontrée sur papier [99] avec de la salive artificielle. Des tests de confirmation avec des prélèvements salivaires humains sont également décrits. Les auteurs ne donnent aucun détail sur la viscosité des échantillons et des conséquences sur l'écoulement. Le diagnostic oral par prélèvement salivaire intéresse de plus en plus la communauté du diagnostic [100]. D'une part, son caractère non invasif est particulièrement adapté aux dispositifs au chevet du patient. D'autre part, il apporte des informations non accessibles par l'analyse du sérum : suivi journalier ou mensuel par la fluctuation de taux hormonaux par exemple.

Un des premiers dispositifs papier réalisant une analyse parallélisée à partir de sang total est un système multicouche [101] (figure 2.5(b)). Une première épaisseur filtre l'échantillon obtenu par prélèvement au bout du doigt. Le plasma est alors distribué vers trois zones réactionnelles qui quantifient par colorimétrie trois biomarqueurs caractérisant les fonctions hépatiques. La démonstration avec des biomarqueurs dilués dans des échantillons de sang a été complétée par une validation clinique de terrain [102] : panel de 600 patients et interprétation colorimétrique par deux opérateurs indépendants. Les prélèvements de sang capillaire (au bout du doigt) offrent des performances de diagnostic similaires au sang veineux [103].

Le papier peut aussi servir de support pour des analyses de fertilité [104] comme le montre la figure 2.5(c). La coloration de réactifs biologiques associée à des mesures de distance de diffusion permet de remonter à la quantité de spermatozoïdes ainsi qu'à leur mobilité. Une simple étape de dilution est nécessaire pour liquéfier les échantillons bruts.

### Application au sang total

L'association papier et sang total remonte à 1963 par Guthrie [87] : une goutte de sang prélevée au bout du doigt ou dans le talon est séchée sur papier (figure 2.6(a)), décrit dans la section 2.1. Malgré cette simplicité de prélèvement, le délai d'attente jusqu'au résultat d'analyse reste long [105, 106] puisque toujours dépendant du laboratoire (figure 2.6(b)).

Le sang est un fluide vital et complexe par sa composition : globules rouges, globules blancs, plaquettes et biomolécules en solution aqueuse. Cette suspension colloïdale est très visqueuse

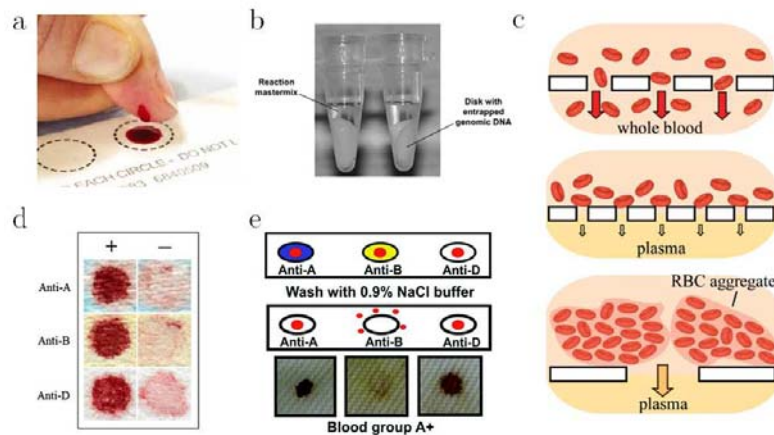


Figure 2.6 – Combinaisons papier et sang total.

et sa couleur rouge est principalement due aux globules rouges. Plusieurs dispositifs papier utilisent deux propriétés du papier : le filtre et la pompe capillaire. Selon la taille de pores, les cellules sont retenues alors que le plasma sanguin est extrait et transporté par la pompe capillaire [107] (figure 2.6(c)).

Des anticorps spécifiques provoquent la coagulation des globules rouges. Dans cet état agglutiné, ils ne peuvent plus s'écouler dans le papier, la coloration rouge est concentrée en un point et seul le plasma - transparent - est extrait. À l'inverse, en l'absence d'agglutination, le sang est réparti quasi-uniformément. Cette propriété associée à des anticorps caractéristiques de chaque groupe A-B-O +/- permet une détermination visuelle et rapide du type sanguin sur papier [108–110]. Deux dispositifs sont présentés en figure 2.6(d) et (e).

### 2.2.3 Purification d'acides nucléiques sur papier

Dans le contexte de la biologie moléculaire, l'extraction et la purification des acides nucléiques sont des étapes indispensables. L'extraction rend disponible (hors de la cellule) le matériel génétique alors que la purification retire les inhibiteurs et agit comme une pré-concentration.

#### Extraction

Un procédé multi-étapes mais très simple d'extraction d'acides nucléiques est présenté en figure 2.7(a) et a été mis au point pour la détection d'une infection sexuellement transmissible : *Chlamydia trachomatis*. Les auteurs utilisent les propriétés filtrantes du papier en alternant les états précipités et dilués de l'ADN [111]. L'échantillon est d'abord mélangé à une solution de lyse cellulaire qui provoque la précipitation de l'ADN. Ce mélange est versé dans un cône de pipette dont l'extrémité est obturée par du papier compressé. En pressurant ce réservoir, le liquide est évacué alors que l'ADN reste en surface du milieu poreux. Plusieurs étapes de lavage sont possibles avant d'ajouter une solution d'éluion pour remettre en solution l'ADN. Cette technique a l'inconvénient de nécessiter plusieurs étapes manuelles et d'utiliser une instrumentation de pressurisation.

De manière similaire mais avec un dispositif uniquement en papier [112], l'ADN de *Salmo-*

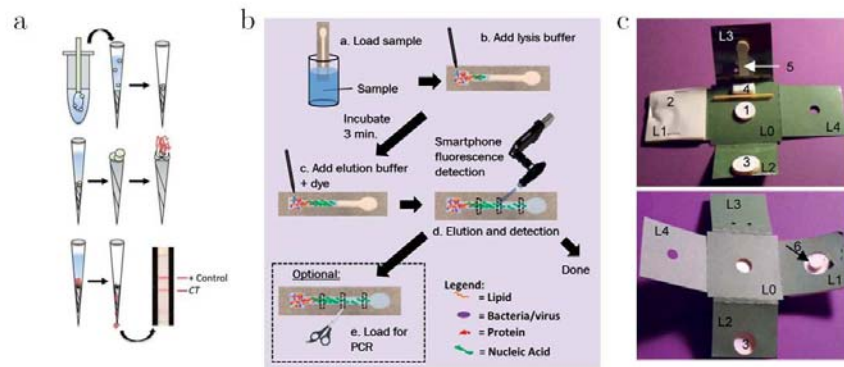


Figure 2.7 – Extraction d'acides nucléiques sur papier.

nelle peut être extrait et purifié à partir de prélèvements variés : emballages alimentaires, sang, selles... Dans chaque cas, l'échantillon est mélangé avec une solution de lyse puis déposé sur papier (figure 2.7(b)). La pompe capillaire transporte et disperse spatialement les composés selon leur taille (filtration par le milieu poreux) et leurs interactions avec le papier (effet chromatographique). Expérimentalement, les composés cellulaires, les protéines, les lipides restent proches de la zone de dépôt alors que les acides nucléiques sont transportés sur une plus grande distance dans le microcanal. La comparaison de différents substrats montre que la cellulose extrait mieux que la nitrocellulose (limite de détection plus basse) mais transporte moins loin.

Comme discuté dans la section 1.3.1, plier-déplier un dispositif papier multicouche agit comme une vanne. Il devient possible de réaliser séquentiellement les étapes de préparation d'échantillon : dilution, lyse, extraction, lavage, élution. L'extraction d'ADN bactérien a été réalisée dans un origami présenté en figure 2.7(c), à partir d'échantillons visqueux [113]. Tous les réactifs sont conservés sous forme séchée dans le papier et il suffit de les réhydrater séquentiellement par pliages pour réaliser chaque opération.

### Procédés de concentration

Une fois que les acides nucléiques sont extraits, la pompe capillaire est responsable d'une dispersion spatiale qui rend faible la concentration locale. Des étapes de préconcentration consistent à focaliser les analytes vers une zone d'accumulation grâce à l'évaporation.

Une bandelette de papier plongeant dans une solution diluée est chauffée à l'autre extrémité par un dispositif local [114] (figure 2.8(a)). Alors que l'évaporation favorise l'extraction de solvant, la pompe capillaire transporte continuellement l'échantillon dilué. Au fil du temps, il y a accumulation d'échantillon près de la zone de chauffage.

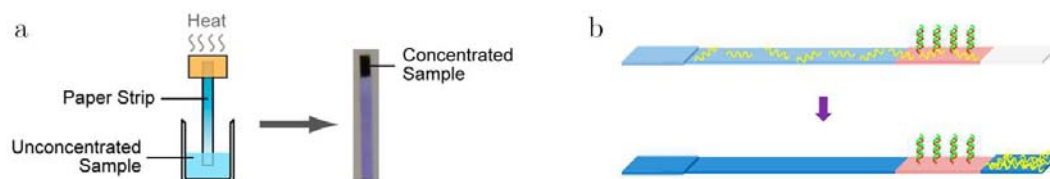


Figure 2.8 – Concentration d'analytes sur papier.



Toujours dans le format bandelettes, un dispositif similaire permet la concentration et la purification d'ADN cible [115]. Une zone de papier est greffée par des oligonucléotides de capture, complémentaires de la cible du diagnostic comme le montre la figure 2.7(b). Ici encore, la pompe capillaire et l'évaporation transportent et concentrent les analytes : ceux d'intérêt sont capturés dans la zone de capture, les analytes non spécifiques s'accumulent en fin de bandelette. Par simple découpe, il est possible de récupérer uniquement les analytes piégés dans la zone de capture.

Pour obtenir un dispositif analytique performant, l'étape de préparation d'échantillon est essentielle. Par ses propriétés filtrantes, de stockage, de pompe capillaire, il est possible d'analyser des échantillons bruts variés sur papier : sang total, salive, urine, sperme. Toutes les étapes d'extraction et de purification d'acides nucléiques ont été démontrées et permettent d'envisager de nouvelles stratégies de détection de pathogènes sur papier.

## 2.3 Détection de pathogènes directe/indirecte

La détection de pathogènes regroupe le diagnostic biologique d'agents infectieux comme les parasites, les virus, les bactéries. Les techniques directes consistent à rechercher l'agent pathogène (culture cellulaire, microscopie) ou un de ses composants (antigène, génome) [116]. Dans les techniques indirectes, c'est la réponse de l'hôte à l'infection qui est analysée (biomarqueurs ou anticorps spécifiques).

### 2.3.1 Microscopie et culture cellulaire

L'identification directe d'un pathogène dans un fluide biologique est possible par observation microscopique et à l'aide de réactifs colorés spécifiques : coloration de Gram, de Ziehl-Neelson, de Giemsa ... Ces techniques fonctionnent pour une grande variété d'échantillons (sang, urine, biopsies, ponctions, ...) avec une préparation minimale. Mais le diagnostic repose essentiellement sur une observation visuelle. Le matériel de laboratoire requis, le personnel compétent et des analyses fastidieuses rendent cette technique incompatible avec les contraintes du terrain. L'observation directe du pathogène permet une grande spécificité : tous les diagnostics positifs correspondent à des échantillons infectés. En revanche, un résultat négatif n'est pas une information fiable à 100%, la sensibilité est faible.

La culture cellulaire consiste à isoler le pathogène et à lui permettre de se multiplier sur un milieu nutritif. Cette amplification facilite la détection et améliore la sensibilité du diagnostic, mais la multiplication cellulaire requiert des délais incompressibles qui se comptent en heures voire jours dans des conditions bien contrôlées.

Dans tous les cas, la manipulation et d'autant plus la multiplication de pathogènes soulèvent des questions de bio-sécurité pour le personnel exposé. Minimiser ces risques est possible notamment en lysant les cellules cibles et analysant par d'autres composants leur présence.

### 2.3.2 Tests de biologie moléculaire

Les tests de biologie moléculaire consistent en une reconnaissance ciblée d'une partie du génome contenu dans un échantillon biologique. D'une part, l'hybridation de brins d'acides nucléiques complémentaires assure cette opération d'identification spécifique de la séquence d'intérêt. D'autre part, la duplication exponentielle de ces brins cibles confère au test une grande sensibilité (détection de très petites quantités). Les Tests d'Amplification d'Acides Nucléiques (NAAT) sont utilisés pour le diagnostic de maladies infectieuses, l'identification de mutations génétiques, le suivi de la progression clinique et de l'efficacité d'un traitement et dans le suivi réglementaire du don du sang (éviter les contaminations).

#### Polymerase Chain Reaction

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est la technique historique d'amplification d'ADN [117]. Son fonctionnement suivant des cycles thermiques répétés est présenté en figure 2.9.

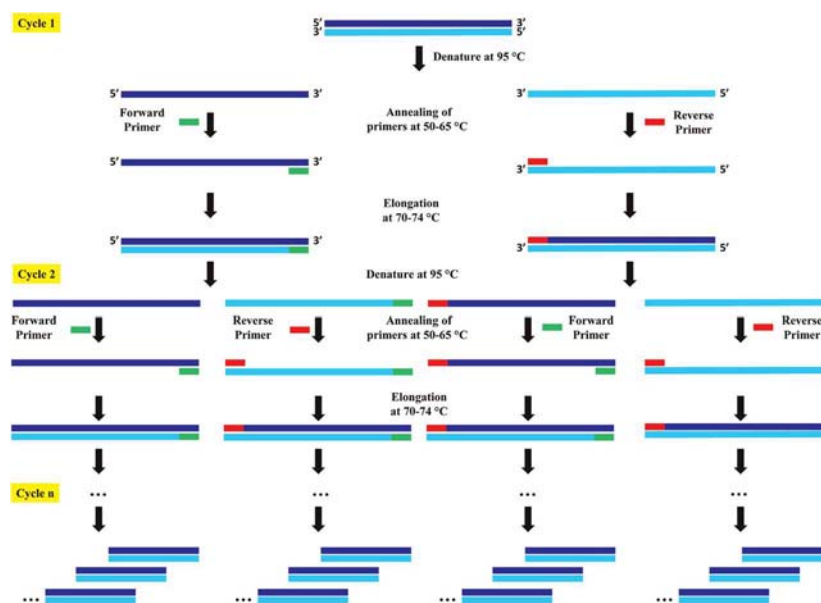


Figure 2.9 – Schéma de la PCR

Une première phase de dénaturation thermique (à 95 °C) favorise la configuration simple brin des acides nucléiques. La phase d'hybridation (entre 56 et 64 °C) assure l'appariement des primers avec la région d'ADN cible qui leur est complémentaire. Enfin, la phase d'élongation (à 72 °C) permet le travail des polymérases qui répliquent le brin d'ADN cible. A la fin de chaque cycle, le nombre de brins d'ADN est multiplié par deux (sous hypothèse de rendement total), c'est une croissance exponentielle.

L'amplification des brins d'ADN peut être précédée d'une étape de transcription inverse (RT - Reverse Transcription) à partir d'ARN. Une enzyme synthétise un brin d'ADN complémentaire de l'ARN. Toutes les stratégies d'amplification peuvent inclure une étape préliminaire de transcription inverse.

## Amplifications isothermes

L'idée principale liée au développement des amplifications isothermes est de remplacer les cycles thermiques de la PCR par une structure originale des primers. Cette dernière doit faciliter la configuration simple-brin et permettre de travailler à température constante.

La LAMP (Loop-mediated isothermal AMPlification) [118] fonctionne entre 60 et 65 °C et contient une association de 4 primers complémentaires de 6 séquences cibles, comme le montre la figure 2.10(a). Le repliement des primers sous forme de boucle permet d'associer bout à bout chaque brin d'ADN répliqué. Il faut donc ajouter à l'amplification exponentielle caractéristique de la PCR, des brins d'ADN de plus en plus longs (figure 2.10(b)). Grâce à l'importante quantité de matériel génétique produite, la détection est possible par turbidité avec l'ajout d'une solution précipitante [119], en fluorescence avec des intercalants d'ADN [118], par des indicateurs colorés de changement de pH [120,121] ou sur des bandelettes immunochromatographiques [122] (détails en section 2.4).

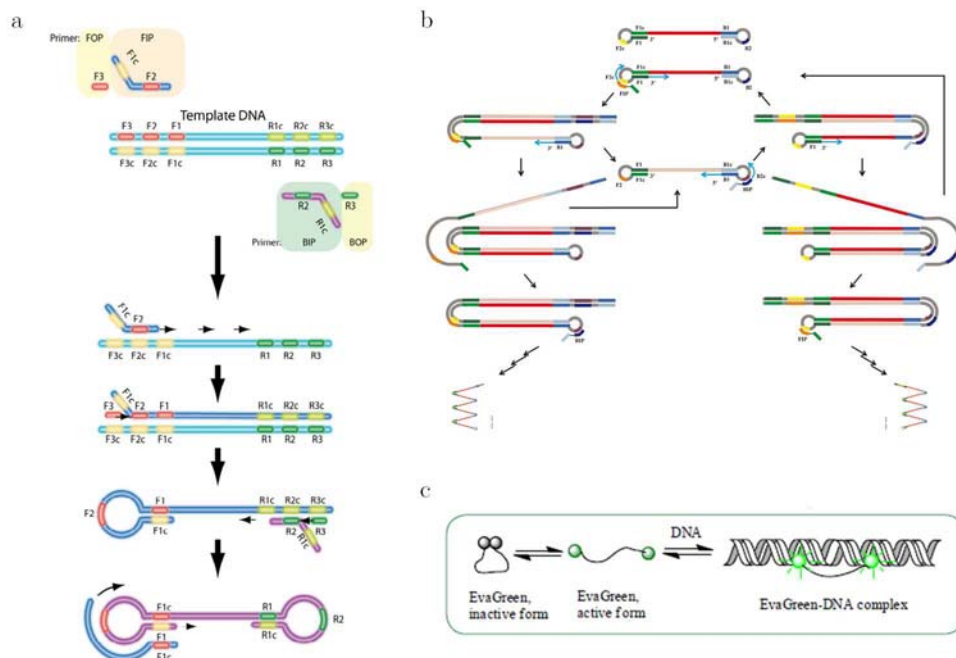
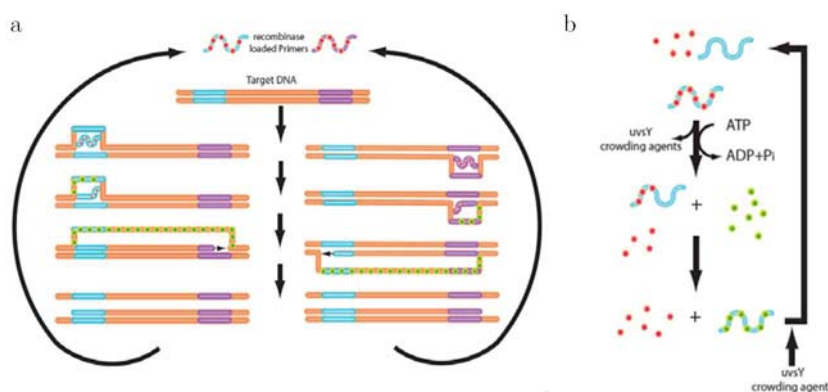


Figure 2.10 – Schéma de la LAMP et des molécules intercalantes.

Les intercalants d'ADN sont des espèces chimiques qui se lient aux acides nucléiques de manière non covalente [123]. Le changement de conformation entre la forme libre et la forme liée est responsable d'un signal de fluorescence qui rend compte quantitativement de la quantité d'ADN (figure 2.10(c)).

Comme dans le cas de la PCR, l'amplification d'ADN dans la méthode RPA (Recombination Proteins Amplification) consiste en l'hybridation de primers sur l'ADN cible et en leur élongation par une polymérase (figure 2.11(a)). Mais l'étape de dénaturation thermique est remplacée par des protéines recombinantes capables de stabiliser la forme simple brin et donc de favoriser les interactions ADN-primers [124] comme le montre la figure 2.11(b). Fonctionnant à 40 °C, le résultat d'amplification peut être détecté par migration sur Western Blot, par une sonde associée à un inhibiteur de fluorescence et dont le signal est libéré par l'activité d'une nucléase

dans la configuration double-brins, ou sur des bandelettes immunochromatographiques (détails en section 2.4.1). La spécificité des séquences ADN permet de cibler une grande variété d'agents biologiques comme démontré pour un panel de virus [125] (Ebola, Sudan, Marburg, Rift Valley fever, ...). Appliqué au diagnostic du virus Ebola, une récente publication [126] compare les performances de la RT-RPA avec la RT-PCR. Les auteurs annoncent une sensibilité à 97% et une spécificité à 97% de la RT-RPA. Cette amplification isotherme fonctionnant à 40 ° C à partir de réactifs lyophilisés devient compétitive de la méthode considérée comme une référence. Comme discuté dans l'annexe A, la comparaison d'un test diagnostique avec une référence, qui n'est pas un Gold Standard, peut sous-estimer les performances.



**Figure 2.11** – Schéma de la RPA.

D'autres méthodes d'amplification isothermes travaillant à 30 et 65 ° C sont aujourd'hui développées pour des applications de diagnostic au chevet du patient [127]. La technique HDA (Helicase Dependant Amplification) [128] utilise des enzymes hélicase pour séparer les double-brins d'ADN comme le modèle naturel de réplication d'ADN *in vivo*. L'amplification NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) [129] cherche également à reproduire un mécanisme biologique : la réplication rétrovirale. La RCA (Rolling Circle Amplification) [130] produit de très longs brins d'ADN à partir de la réplication d'un ADN circulaire.

La biologie moléculaire permet d'atteindre une très grande sensibilité de diagnostic mais ces tests sont complexes et nécessitent une quinzaine d'étapes par un opérateur qualifié, plus de 4 heures d'analyse sans compter le prélèvement et le transport de l'échantillon, des coûts d'instrumentation (de US\$20 000 à US\$120 000) et de réactifs (de US\$50 à US\$100) [97]. Ces contraintes rendent souvent les tests de biologie moléculaire inaccessibles aux régions les plus pauvres, dans lesquelles la prévalence des maladies infectieuses est pourtant la plus forte.

### Problèmes de biocompatibilité

Définir le concept de biocompatibilité est particulièrement important dans le cadre de la biologie moléculaire. Les plateformes microfluidiques sont trop souvent déclarées "biocompatibles" sans discuter les précautions d'usage. Selon Williams [131], cette propriété est très contextuelle et application-dépendante. Il la définit comme "l'aptitude d'un matériau à adopter une réponse d'hôte appropriée pour une application spécifique" et la place notamment dans le contexte

des implants. Parmi les variables importantes, il souligne l'impact de la structure des matériaux (porosité nanométrique, micrométrique, macrométrique), leur composition chimique, et l'absorption non-spécifique.

Dans le cas de la biologie moléculaire, de nombreux articles listent les composés source d'inhibition d'amplification d'acides nucléiques [132]. Les mécanismes d'inhibitions ne sont pas encore bien compris et peuvent apparaître à trois niveaux : pendant la préparation d'échantillons (mauvaise purification), par une dégradation des acides nucléiques ou sur l'activité des enzymes. Chaque réaction d'amplification peut avoir sa propre liste d'inhibiteurs et il n'est pas évident d'extrapoler les résultats de la PCR vers les nouvelles amplifications isothermes. Dans le cas de la RPA, une étude révèle l'impact défavorable d'ADN non cible du diagnostic, sur l'amplification [115]. Le développement de dispositifs microfluidiques d'amplification a donné lieu à des études systématiques sur l'influence des matériaux [133, 134]. Quels que soient les supports, un traitement à base de BSA, connu pour limiter l'adsorption non spécifique, améliore les résultats. Par exemple, la compatibilité de trois cires (caractérisées par leur température de fusion 56 ; 60 ; 80 ° C) avec la PCR a été analysée. Les deux premières sont responsables d'une forte dégradation du signal d'amplification alors que la dernière affecte peu la réaction biologique.

Malgré cette forte dépendance vis à vis de l'environnement, plusieurs articles proposent des protocoles d'amplification plus robustes [135] : réaction de RT-PCR sur des échantillons bruts de serum [136] ou LAMP sur du sang total chauffé [137].

### 2.3.3 Immunoessais

Les immunoessais sont des tests de diagnostic, de dépistage, de suivi ou de pronostic d'une maladie, qui fonctionnent à partir de la formation de complexes très spécifiques antigène-anticorps. Un antigène est un biomarqueur étranger à l'organisme qui déclenche une réponse immunitaire. Un anticorps est une protéine complexe sécrétée par le système immunitaire et dont la fonction est de neutraliser un antigène particulier.

Il existe différents formats d'immunoessais comme présentés en figure 2.12 selon la cible du diagnostic : antigène ou anticorps. La plupart des tests impliquent deux sites distincts pour la formation des complexes anticorps-antigène. Cette double reconnaissance permet d'une part la fixation en un lieu spécifique (au fond d'une plaque multipuits, sur une ligne d'un test bandelette), d'autre part la détection (par un fluorochrome, une nanoparticule, une activité enzymatique ...).

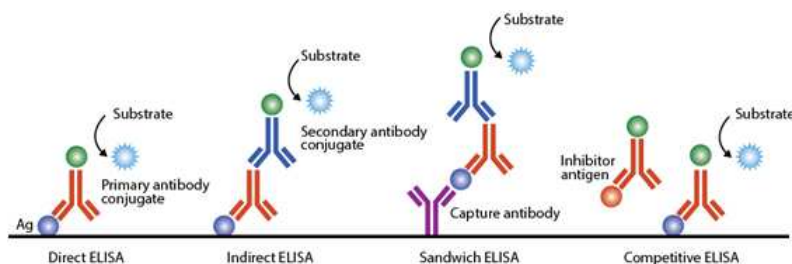


Figure 2.12 – Différents formats d'immunoessais avec amplification enzymatique de signal.

Appliqué à la détection de pathogènes, les immunoessais peuvent cibler directement une protéine membranaire spécifique ou un biomarqueur cellulaire après une étape de lyse. S'il est possible d'identifier ces antigènes, il faut s'assurer de leur spécificité vis à vis du pathogène considéré. Ce problème peut être contourné en exploitant la spécificité du système immunitaire : détection des anticorps produits par l'organisme. Cette technique indirecte ne permet pas un diagnostic précoce (délais dans la réponse immunitaire) et rend seulement compte de la présence actuelle ou passée du pathogène.

Il existe de nombreux dispositifs de diagnostic rapide compatibles avec les applications au chevet du patient : agglutinations de particules, immunochromatographie sur membrane (tests bandelettes décrits en section 2.1). L'avantage principal de cette technique réside dans la possibilité d'analyses sans préparation d'échantillons.

### 2.3.4 Comparaison des trois méthodes

Le choix du test diagnostique approprié dépend de la cible biologique, du moment du diagnostic et des moyens à disposition. Parce qu'elle est très complémentaire des immunoessais, la biologie moléculaire réalisable sur le terrain répond à un vrai besoin.

#### Performances

La validité d'un test diagnostique est à analyser suivant des indicateurs de performances (sensibilité, spécificité, prévalence, ...) et d'un ensemble de critères rassemblés dans la grille STARD ([www.stard-statement.org](http://www.stard-statement.org)). Les détails relatifs à ces éléments sont présentés en annexe A.

Selon la cible du diagnostic, un test peut être préféré à un autre suivant des critères de préparation d'échantillons, de durée d'analyse, de sensibilité et spécificité. Les trois principales techniques - microscopie cellulaire, amplification d'acides nucléiques, immunoessais - sont comparées dans la figure 2.13.

Tests diagnostiques	Microscopie et culture cellulaire	Amplification d'acides nucléiques	Immunoessais
Cible biologique	Direct	Direct	Direct / Indirect
	Pathogène	ADN / ARN	Biomarqueurs Anticorps
Préparation d'échantillon	Simple	Complexe	Simple
Durée d'analyse	2 - 7 jours	2 heures	20 minutes
Sensibilité	+	+++	++
Spécificité	-	+++	++

Figure 2.13 – Comparaison des tests diagnostiques.

Par l'identification cellulaire ou par son matériel génétique, le pathogène est directement détecté. Les immunoessais permettent de cibler des biomarqueurs caractéristiques ou des pro-

téines membranaires. Il s'agit alors également de tests directs mais s'assurer de la spécificité du diagnostic est moins évident.

Les immunoessais ont l'avantage d'être rapides à partir d'une préparation d'échantillons minimale. La biologie moléculaire est souvent définie comme Gold Standard (test de référence) grâce à ses très bonnes performances en termes de sensibilité et spécificité. Cependant, il est plus pertinent de discuter de la fenêtre temporelle de diagnostic.

### Fenêtre de diagnostic

Lors d'une infection par un agent pathogène, dans les premières heures, il se multiplie activement dans l'organisme. Pour un virus par exemple, la charge virale dans le sang augmente exponentiellement dans les premiers jours. Durant cette période, l'organisme n'a pas encore construit sa réponse immunitaire, qui peut prendre quelques jours. Si cette dernière est efficace, la quantité de pathogènes dans l'organisme va décroître significativement. Les tests directs sont donc bien adaptés pour un diagnostic précoce alors que les tests indirects deviennent pertinents dans les infections à plus moyen-long terme (figure 2.14(a)).

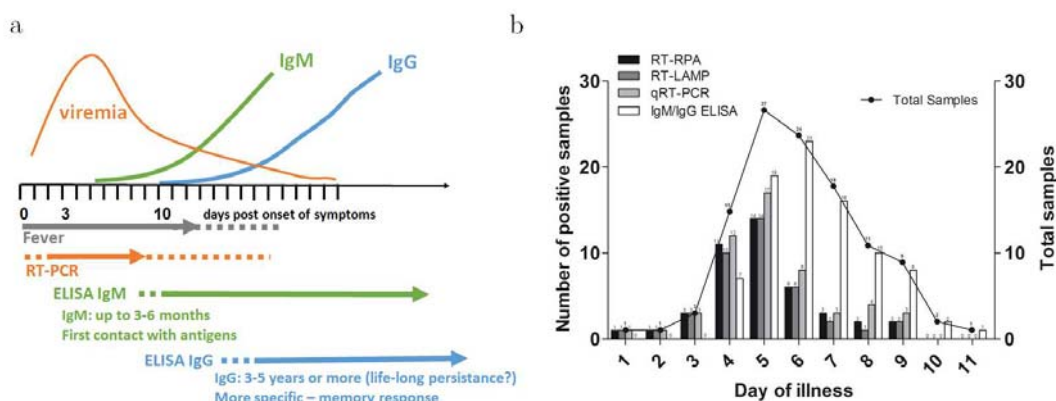


Figure 2.14 – Comparatif entre la biologie moléculaire et la sérologie.

Une étude comparative de différents outils de diagnostic en fonction du moment de l'infection est proposée dans la littérature [138] et en figure 2.14(b). Les auteurs comparent les performances de diagnostic pour le virus de la Dengue, en fonction du nombre de jours suivant l'infection, avec la RT-PCR, la RT-LAMP, la RT-RPA et les immunoessais sur les anticorps de la réponse immunitaire. L'avantage de la biologie moléculaire apparaît clairement pour un diagnostic très précoce alors que les immunoessais indirects donnent leurs premiers résultats à partir du quatrième jour post-infection.

Dans le cas d'une épidémie comme Ebola, la première mesure à prendre est de limiter la propagation virale en isolant les patients infectieux et les cas suspects. On comprend rapidement la nécessité d'un diagnostic rapide et fiable dès l'arrivée des premiers symptômes. La dernière épidémie (2014) a sévi principalement dans trois pays (Guinée - Sierra Leone - Liberia) dont les services de santé ne sont pas équipés pour faire face à une telle catastrophe sanitaire. La solidarité internationale et les ONG ont déployé des laboratoires mobiles et des solutions de terrain. Dans ce contexte, apparaît le besoin de développer l'équivalent des tests bandelettes (immunoessais) pour la biologie moléculaire.

## 2.4 Tests de biologie moléculaire sur papier

Si les immunoessais sur bandelettes existent depuis longtemps et permettent de détecter sur le terrain de nombreuses cibles biologiques (voir section 2.1), la biologie moléculaire est restreinte aux laboratoires d'analyses. Avec le concept de laboratoire sur papier, il devient possible de l'envisager sur papier [139].

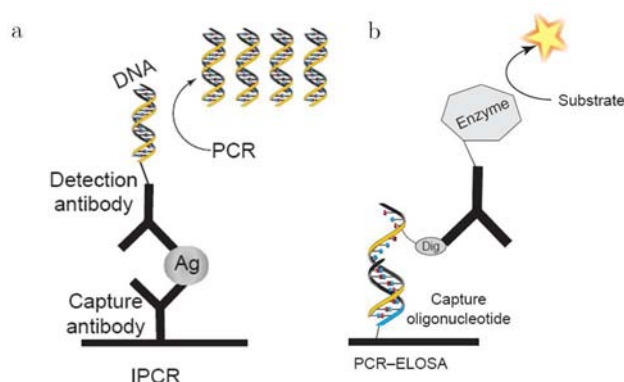
### 2.4.1 Détection d'acides nucléiques sur papier

La détection d'acides nucléiques sur papier repose principalement sur deux propriétés : l'hybridation spécifique de brins complémentaires et la possibilité de greffages chimiques locaux dans le substrat papier. Il existe pourtant une grande variété de combinaisons de ces deux éléments.

#### Couplage immunoessais et acides nucléiques

Comme décrit dans la section précédente 2.3.3, les immunoessais et les tests d'amplification d'acides nucléiques assurent un diagnostic très spécifique (couplage antigène-anticorps *vs* hybridation des primers) et très sensible (amplification enzymatique ou par nanoparticules *vs* réplication des brins d'ADN). L'association de ces deux techniques ouvre de nouvelles perspectives.

Le concept d'immuno-PCR est décrit dans la littérature [140] et prend de multiples formes. Il peut s'agir d'un immunoessai ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) dans lequel l'amplification enzymatique est remplacée par la réplication d'un brin d'ADN greffé à l'anticorps de capture (figure 2.15(a)). Dans une seconde configuration, un brin d'ADN est capturé par hybridation puis détecté par amplification enzymatique (figure 2.15(b)).

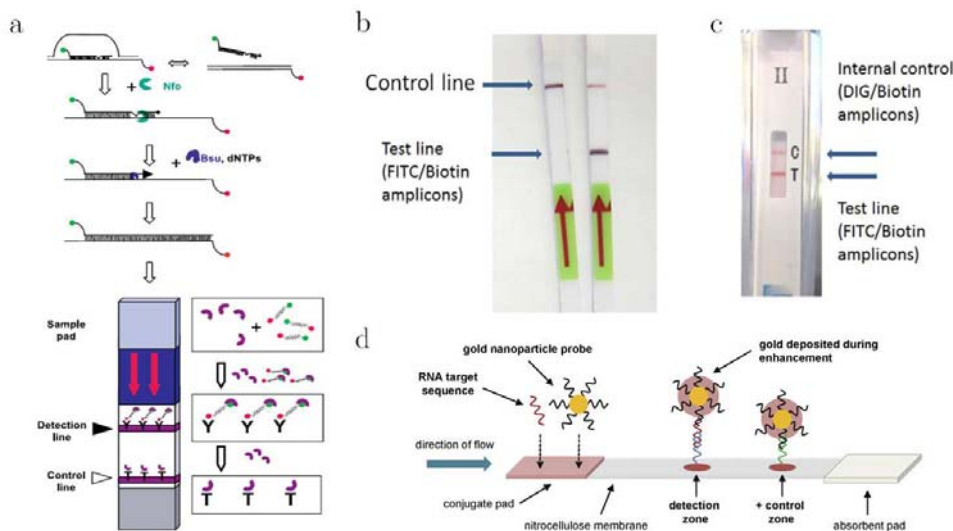


**Figure 2.15** – Exemples de couplage entre immunoessais et amplification.

Le format des tests bandelettes décrit dans la section 2.1 peut être adapté à la détection d'acides nucléiques comme le montre la figure 2.16(a). Pour cela, des biomolécules (par exemple : biotine et carboxyfluorescéine) sont greffées aux primers [124]. Sans amplification, chaque primer porte une biomolécule mais elles ne sont pas associées. En cas d'amplification, les amplicons - les brins d'ADN amplifiés - s'associent en doubles-brins complémentaires portant à chaque



extrémité une biomolécule. Le test bandelette fonctionne alors avec les anticorps anti-biotine (capture) et anti-carboxyfluorescéine (détection). Il existe déjà des produits commerciaux compatibles par exemple avec la détection d'HIV après amplification par LAMP [141] (figure 2.16(b) et (c)).



**Figure 2.16** – Tests bandelettes pour la détection d'acides nucléiques.

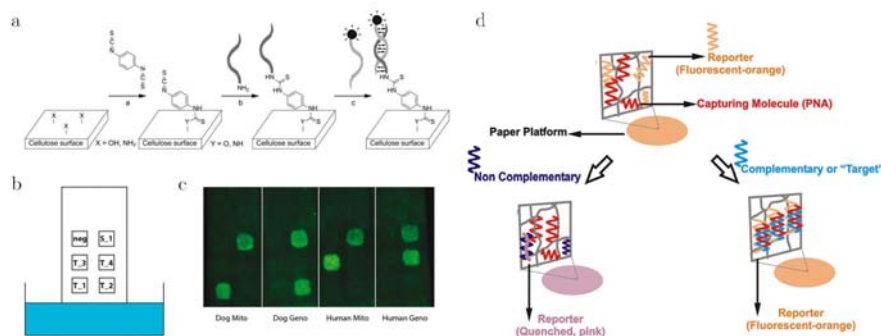
Une stratégie très similaire aux tests bandelettes mais qui repose uniquement sur l'hybridation de brins complémentaires est décrite dans la référence [142] et illustrée dans la figure 2.16(d). Des oligonucléotides complémentaires d'une extrémité de l'ADN cible sont greffés en surface de nanoparticules qui peuvent circuler sous écoulement dans la membrane. La zone de capture est fonctionnalisée par des oligonucléotides complémentaires de l'autre extrémité de l'ADN cible. Ainsi, l'hybridation immobilise seulement les nanoparticules dans la zone de capture seulement en présence de la cible biologique. La zone de contrôle permet l'hybridation systématique des nanoparticules.

### Dispositifs de type chromatographique

Le format bandelette qui plonge dans une solution rappelle les protocoles de chromatographie sur couche mince. Mais dans le cas des acides nucléiques, la détection n'est pas liée à la rétention chromatographique.

Des traitements chimiques permettent de greffer des oligonucléotides complémentaires (figure 2.17(a)). Si les acides nucléiques cibles portent une sonde détectable (fluorophore, nanoparticule, ...), il suffit d'une simple migration dans le papier pour capturer la cible par hybridation [143] (figure 2.17(b)). Les procédés de greffages chimiques peuvent être localisés, ce qui permet la détection simultanée de plusieurs séquences comme le montre la figure 2.17(c). Le dispositif peut contenir des zones de contrôles (positif et négatif) et les auteurs ont démontré les performances jusqu'à huit régions cibles et une détection visuelle [144].

Les micro-ARN sont des acides nucléiques non-codants, d'une vingtaine de paires de bases. Leur implication dans la régulation des gènes et l'activité cellulaire les rend intéressants comme



**Figure 2.17** – Détection d'acides nucléiques par migration dans un papier fonctionnalisé.

biomarqueurs pour la détection de cancers. Sur papier, la visualisation de ces micro-ARN est possible en associant un ARN complémentaire de la cible biologique et un marqueur fluorescent [145] (figure 2.17(d)). Les conformations duplex (sans l'ARN cible) ou triplex (avec l'ARN cible) impliquent un changement de couleur.

### Format zones de dépôts

Suite au format bandelettes, les nouvelles techniques de fabrication (voir section 1.3.1) permettent, entre autres, le développement des "plaques multipuits version papier" [146]. Dans cette configuration, le papier est surtout utilisé comme un substrat, avec des propriétés de stockage et de parallélisation des expériences. En n'exploitant pas la pompe capillaire, ces dispositifs nécessitent encore de multiples opérations manuelles (pipettes).

Par exemple, le résultat d'amplification isotherme (LAMP) ciblant l'ARN du virus de Dengue peut être transféré dans des zones individuelles de papier [147] (figure 2.18(a)). Des étapes de lavage et l'ajout d'un marqueur fluorescent permettent de visualiser sur papier le résultat d'analyse. Dans cet article, l'utilisation du papier ne présente pas d'avantage clair : il nécessite de multiples opérations de pipetages et des équipements de laboratoire. La même équipe de recherche a proposé une version colorimétrique de ce protocole mais les changements de couleur sont si faibles qu'ils doivent être mesurés par un scanner [148]. Les expériences mettent cependant en avant les interactions possibles entre le support et l'intercalant d'ADN utilisé pour la détection. Dans certaines configurations, le signal de fluorescence sur papier est inversé par rapport au microtube : sans ADN, l'intercalant émet un fort signal de fluorescence dans le papier ; en présence d'ADN, ce même signal décroît.

L'assemblage de plusieurs couches de papier [62] qui peuvent être pliées ou dépliées apporte la fonction de vannes : on peut connecter ou déconnecter sur demande différentes parties de papier comme décrit dans la section 1.3.2. Ce principe d'origami combiné à une plaque multipuits papier assure la parallélisation des réactions en réduisant le nombre d'opérations manuelles. Ce système est mis en place pour la détection d'acides nucléiques par hybridation compétitive avec des oligonucléotides partiellement complémentaires portant un fluorochrome ou un quencher [149]. La figure 2.18(b) montre comment chaque réactif est alors stocké dans une épaisseur différente de papier. Plier et réhydrater sont les seules étapes nécessaires pour déclencher la réaction.

Ces systèmes de détection avec des sondes sont bien plus sensibles en fluorescence qu'en

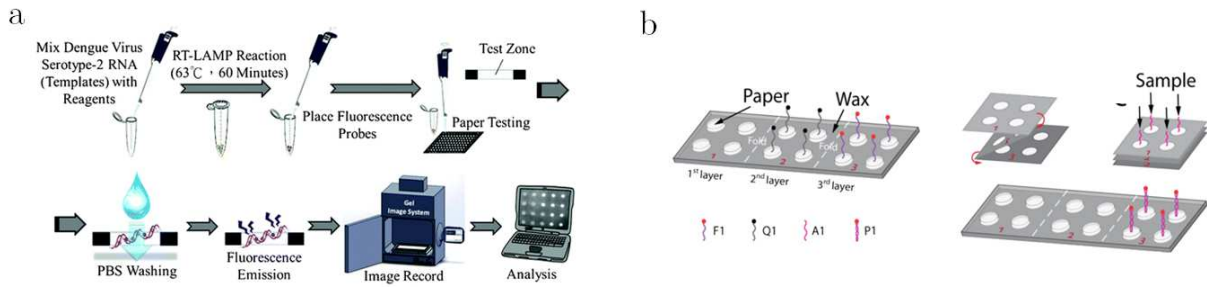


Figure 2.18 – Détection d'acides nucléiques dans des plaques multipuits papier.

colorimétrie. Mais dans le but de se rapprocher d'un dispositif au chevet du patient, autonome et peu cher, la lecture du résultat d'analyse doit rester visuelle. De nouvelles stratégies atteignent cet objectif en exploitant la pompe capillaire.

### Détection sous écoulement

Le mécanisme moléculaire de l'amplification isotherme LAMP (voir section 2.3.2) donne des produits de réaction très longs : les ADN sont répliqués de manière exponentielle mais aussi associés bout à bout. Il est possible d'exploiter cette propriété pour visualiser si l'amplification a eu lieu ou non. Pour cela, des billes magnétiques sont mélangées au milieu réactionnel [150]. Sans nécessiter de champ magnétique, la présence de longs brins d'ADN provoque l'agrégation des billes qui est visible sur le papier comme l'illustre la figure 2.19(a). Sans agrégation, les billes sont dispersées par la pompe capillaire et la coloration reste uniforme. Ce concept est similaire à l'agglutination de globules rouges en présence d'anticorps, comme décrit dans la section 2.2.2.

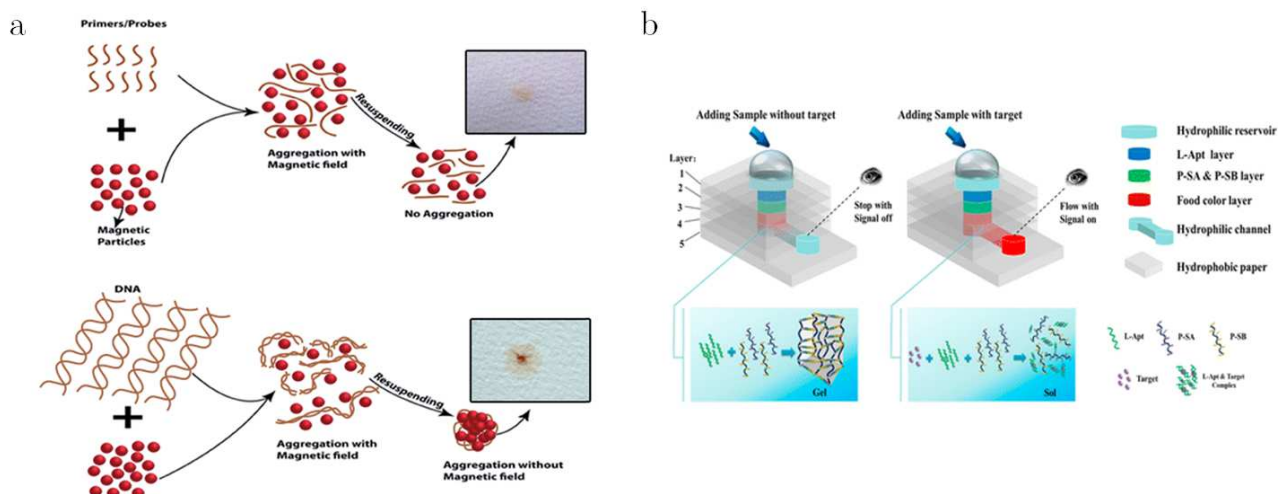


Figure 2.19 – Visualisation d'acides nucléiques par écoulements dans le papier.

Un autre procédé de détection sous écoulement a été développé sous le terme "régulateur d'écoulement" ("flow regulator") [151]. Dans un dispositif multicouche (figure 2.19(b)), un hy-

drogel réticulé par des aptamères empêche l'écoulement liquide. Une autre épaisseur de papier contient un colorant séché. Seule la présence du biomarqueur peut casser l'hydrogel grâce aux interactions préférentielles avec les aptamères, et permettre l'écoulement. Le colorant est alors transporté vers la sortie et donne un signal visuel qui notifie la présence du biomarqueur. Les auteurs ont démontré un système parallélisé qui détecte simultanément quatre éléments (l'eau, le plomb, la cocaïne, l'adénosine), chacun associé à une couleur, à partir d'un même échantillon. En remplaçant les interactions aptamères-ligand par des hybridations, il est possible d'envisager un dispositif similaire pour la détection d'acides nucléiques.

Il existe une grande variété de systèmes papier détectant la présence d'acides nucléiques. Cependant, tous reposent sur une étape préalable d'amplification. Les récents progrès en amplification isotherme à partir de réactifs lyophilisés ouvrent la voie de l'amplification sur papier.

### 2.4.2 Amplification d'acides nucléiques sur papier

Avant d'explorer le concept de laboratoires sur puce réalisant des tests de biologie moléculaire, les premiers essais ont consisté à vérifier la compatibilité avec le support.

#### Compatibilité amplification et papier

Dans la littérature, le premier exemple d'amplification d'acides nucléiques sur papier est encore à l'interface entre papier et microtube [152]. L'extrémité du papier trempant dans le tube (figure 2.20(a)) est fonctionnalisée par un microgel contenant l'ADN complémentaire d'un morceau seulement de l'ADN cible. Après contact avec l'échantillon, un second ADN est ajouté, complémentaire de l'autre extrémité de l'ADN cible. L'excès de liquide est retiré de sorte que seuls les éléments capturés par hybridation dans le papier restent dans le milieu réactionnel. Enfin, les réactifs de RCA sont ajoutés pour procéder à l'amplification isotherme du second ADN de capture. Ce dernier n'est présent que si l'ADN cible l'est aussi. Ici le papier est utilisé comme support de capture et montre la compatibilité bio-chimique entre papier et amplifications.

L'utilisation du papier seul pour l'amplification et la détection d'acides nucléiques a été réalisée dans le format des plaques multipuits papier [153] (figure 2.20(b)). Les auteurs n'ont pas eu recours à un procédé classique d'amplification isotherme mais ont développé leur propre construction moléculaire, capable de reproduire les fonctions cellulaires ribosomales. Tous les réactifs sont lyophilisés et stockés dans le papier jusqu'à réhydratation par des extraits d'ARN. Après deux heures d'incubation, le dispositif produit un signal colorimétrique ou fluorescent.

De manière à séquencer les étapes de préparation d'échantillons, d'amplification isotherme (LAMP) et de détection, des auteurs ont imaginé un système à glissières qui déplace un disque de papier dans différentes positions [154], comme le montre la figure 2.20(c). Initialement, le papier est en contact avec un papier absorbant : la pompe capillaire assure l'évacuation de tous les composés cellulaires (possibles inhibiteurs) excepté les acides nucléiques qui sont capturés par le disque de papier. Les positions suivantes plus isolées permettent l'ajout de solutions tampons, de réactifs et de l'intercalant pour l'amplification et la détection des acides nucléiques. Ce dispositif, publié en 2015, est pionnier dans le domaine de la biologie moléculaire de terrain incluant la préparation d'échantillons. Cependant, il nécessite plusieurs opérations manuelles

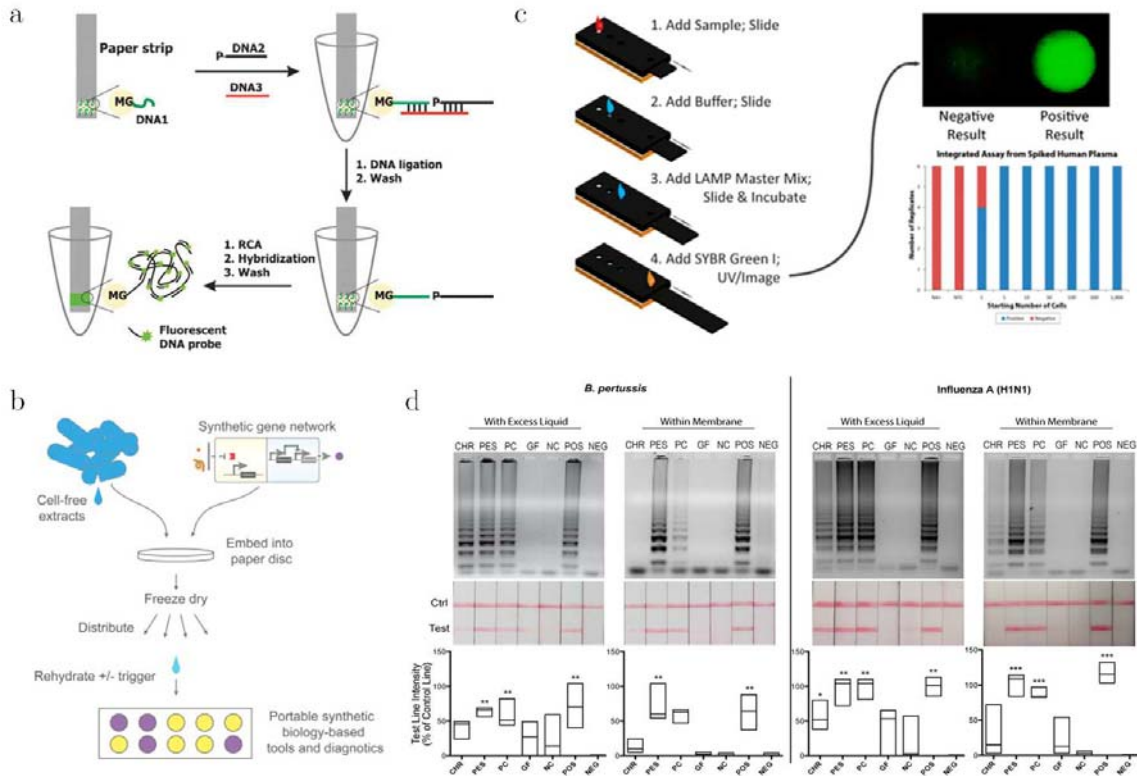


Figure 2.20 – Amplification d'acides nucléiques sur papier.

et les réactifs ne sont pas prêts à l'emploi.

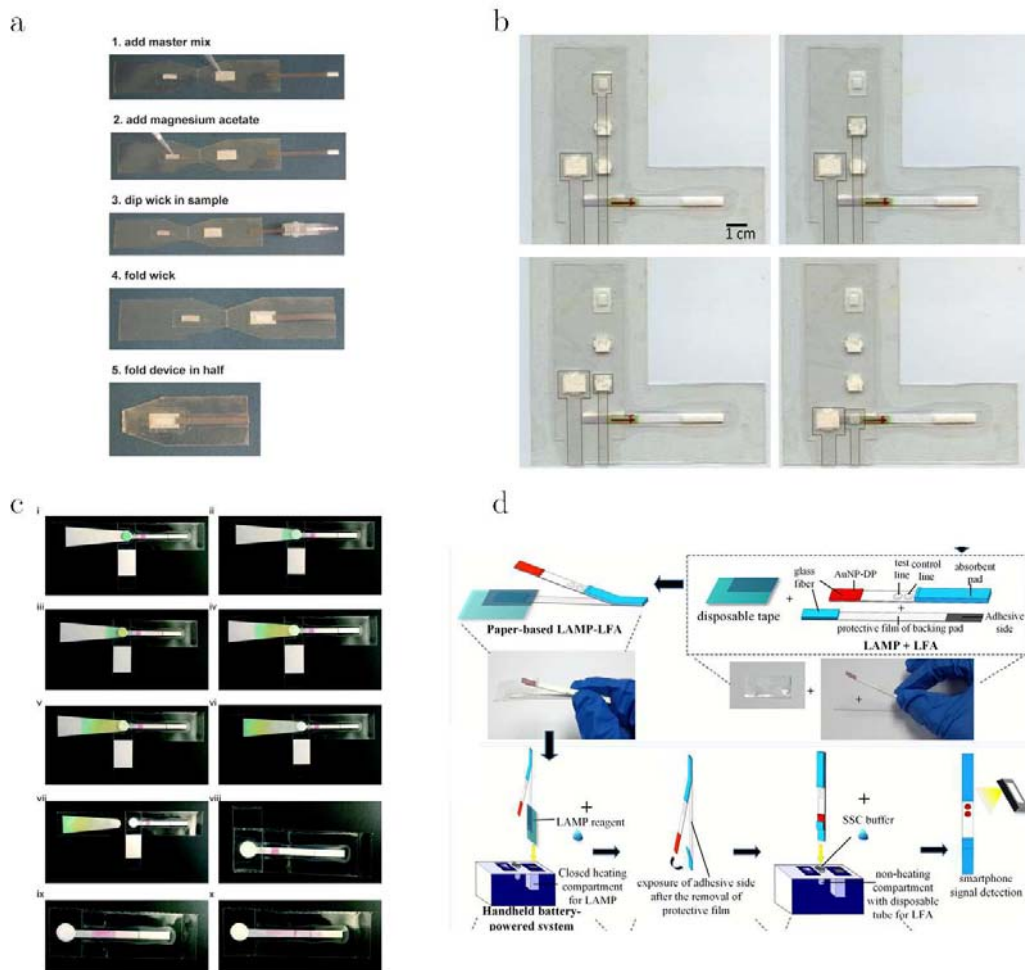
La grande diversité des techniques d'amplifications, des cibles biologiques et des substrats papier rend le diagnostic moléculaire sur papier compliqué à comparer. Une étude systématique très utile a été menée pour comparer cinq membranes, deux amplifications isothermes et quatre cibles biologiques [155] (figure 2.20(d)). Les expériences montrent que les données obtenues par PCR ne permettent pas de prédire les propriétés des amplifications isothermes. Cependant, une membrane en PES apparaît comme le meilleur candidat support d'amplification.

Ces quatre articles posent les bases de la biologie moléculaire sur papier. Depuis la préparation d'échantillons, la capture des acides nucléiques, la compatibilité entre amplification et substrat papier, jusqu'à la détection, toutes ces fonctions peuvent être associées au sein d'un même dispositif papier. Pourtant les exemples précédents n'exploitent presque pas la pompe capillaire et restent dans un format de disque de papier simple.

### Dispositifs papiers multi-étapes

Des géométries plus originales de puces papier ont été développées pour réaliser séquentiellement toutes les étapes d'un test d'amplification d'acides nucléiques. Ces dispositifs utilisent le pliage comme vanne on-off et la pompe capillaire pour déplacer l'échantillon et les réactifs.

Un assemblage de papier et de plastique permet la détection d'ADN HIV par réaction RPA [156]. Le principe d'origami est exploité pour mettre en contact successivement trois épaisseurs de papier, contenant les réactifs et l'échantillon. L'utilisation pratique de ce système



**Figure 2.21** – Dispositifs multi-étapes pour l'amplification et la détection d'acides nucléiques sur papier.

n'est pas évidente puisque les réactifs ne sont pas stockés dans le papier. La même équipe de recherche a créé un dispositif similaire dans lequel les opérations manuelles de pipetage sont remplacées par un système coulissant [157]. L'étape d'amplification est suivie d'une migration sur test bandelettes pour une révélation visuelle du résultat d'analyse. Si ce protocole semble plus compatible avec des conditions de terrain et des opérateurs non qualifiés, l'ensemble des réactifs doit pourtant être conservé au frais avant d'être fraîchement pipeté sur le papier.

Un exemple similaire de puce papier [158] rassemble les trois étapes principales : purification d'ADN à partir d'une matrice biologique complexe, amplification et détection visuelle sur bandelette. Le protocole compte pas moins de dix étapes élémentaires (pliages, pipetages, décoller un adhésif plastique ...) et les réactifs ne sont pas stockés dans le papier. Mais les expériences sont réalisées à partir d'échantillons réels et illustrent la compatibilité d'une préparation d'échantillons sur papier avec la LAMP, même si certains prélèvements (liquide cervical) sont très invasifs.

Un dernier système [159] composé de deux bandelettes parallèles connectées sur demande illustre également la combinaison LAMP sur papier et tests bandelettes.

La figure 2.22 rassemble dans un tableau, les performances des tests d'amplification réalisés sur papier. Concernant l'échantillon biologique, sa préparation est rarement intégrée dans le

Ref.	Rodriguez 2016	Choi 2016	Connelly 2015	Rohrman 2012	Cordray 2015	Ali 2009	Pardee 2014	
Echantillon	Préparation	X		X				
	Cible	ADN	ADN	ADN	ADN	ADN	ARN	
	Pathogène	Papillomavirus Humain	Dengue	Escherichia coli	HIV	Plasmodium	Oligonucléotides	Ebola
	Fluide	Liquide cervical	Synthétique	Sang	Sang	Synthétique	Synthétique	Synthétique
Diagnostic	Sans équipement	X			X	X		X
	Réaction	LAMP	LAMP	LAMP	RPA	RPA	RCA	Biologie moléculaire
	Limite de détection	100 copies/ $\mu$ L	3000 copies/ $\mu$ L	1 copie/ $\mu$ L	1 copie/ $\mu$ L	5 copies/ $\mu$ L	10 fM	30 nM
	Stockage							X
	Nombre d'opérations	10	4	4	6	8	4	1
	Détection	Visuelle	Visuelle	Fluorescence	Visuelle	Visuelle	Fluorescence	Visuelle
Substrat	Papier	PES	Fibre de verre Nitrocellulose	FTA	Fibre de verre	Whatman	Papier filtre	Papier filtre
	Format	Disque Bandelette	2 bandelettes	Disque	Disque Bandelette	Disque Bandelette	Bandelette	Disque

**Figure 2.22** – Comparaison des performances des dispositifs d'amplification sur papier.

dispositif papier et il s'agit souvent de brins synthétiques d'ADN. Si d'excellentes sensibilités sont atteintes avec les techniques d'amplification (LAMP, RPA, RCA et construction moléculaire), un seul protocole permet le stockage des réactifs. L'utilisation du support papier sans équipements externes est obtenue au détriment du nombre de manipulations. Enfin, une grande variété de supports papier semblent compatibles avec la biologie moléculaire mais leur format reste très standard (disque et/ou bandelette).

## 2.5 Enjeux de cette thèse

### 2.5.1 Utiliser la physique des écoulements pour améliorer la limite de détection

Le développement d'outils de diagnostic sur papier nécessite des performances de détection compétitives avec le laboratoire d'analyses. Or la structure poreuse désordonnée et la pompe capillaire sont responsables d'une dispersion spatiale de l'échantillon et les propriétés optiques empêchent une visualisation efficace dans le papier.

L'impression de barrières de cire permet de confiner les écoulements au sein de motifs personnalisables. Par des géométries adaptées, il est possible contrôler les phénomènes physiques d'écoulement et la répartition spatiale d'un échantillon. Pour cela, la diffusion de la cire après impression sur papier est étudiée, notamment dans l'épaisseur d'une feuille, dans le chapitre 3.

### **Imbibition capillaire et étalement de goutte**

Les dimensions caractéristiques d'une feuille de papier la placent à mi-chemin entre un milieu poreux tri-dimensionnel et une surface rugueuse. Les écoulements sont donc régis par deux principaux phénomènes : l'imbibition capillaire en volume et l'étalement de goutte sur la surface.

Le confinement géométrique imposé par des barrières de cire permet une mise en évidence de ces deux effets et un contrôle de la prédominance de l'un par rapport à l'autre. La répartition spatiale d'un échantillon dépend alors des propriétés d'écoulement et de ses interactions chromatographiques avec le papier.

### **Focalisation spatiale d'échantillons**

La concentration d'échantillon peut être obtenue suivant plusieurs principes physiques. Dans tous les cas, l'évaporation permet l'extraction de solvant et agit comme moteur d'écoulement en complément de la pompe capillaire.

L'accumulation locale d'analytes non volatils peut être obtenue dans les conditions de transport ou de rétention chromatographique selon la nature des interactions répulsives ou attractives avec le papier. L'objectif des concentrateurs est d'amplifier l'un de ces comportements pour provoquer une focalisation de l'échantillon dans un petit volume.

## **2.5.2 Développer les performances des systèmes standard**

Le papier est déjà largement utilisé dans les sciences analytiques. La microfluidique doit permettre de compléter certaines fonctions et d'améliorer les performances actuelles.

### **Revisiter les tests bandelettes**

La fabrication par assemblage de plusieurs membranes et le format unidirectionnel des tests bandelettes peuvent être remplacés par une puce papier aux motifs imprimés en cire.

Dans le chapitre 5, des principes de concentration sont appliqués à un immunoessai pour la détection d'un biomarqueur cardiaque, la troponine.

### **La microfluidique pour éluer les prélèvements séchés**

Par la fonction de stockage de fluides biologiques, le papier assure la transition entre les tests rapides de terrain et les laboratoires d'analyses. Cette fonction assure une continuité dans le circuit de diagnostic.

L'élution, dans des microcanaux, de ces composés séchés dans le papier, est étudiée dans le chapitre 4. L'objectif est de comprendre la cinétique d'élution pour différents composés biologiques et de quantifier les performances d'élution selon l'écoulement.

La compatibilité du papier avec des géométries microfluidiques de production de gouttes est démontrée. L'influence du papier est étudiée par les diagrammes de phase décrivant les différents régimes d'écoulement.



### 2.5.3 De nouvelles solutions de diagnostic pour le virus Ebola

L'état de l'art sur l'amplification d'acides nucléiques dans le papier démontre la possibilité de réaliser des tests de biologie moléculaire dans une matrice papier et de les combiner avec une étape préalable de préparation d'échantillon. Peu d'exemples dans la littérature rapportent des expériences sur des échantillons réels. De même, les puces papier sont rarement complètement prêtes à l'emploi - notamment avec des réactifs stockés dans le papier. Enfin, malgré les nombreuses possibilités de gestion des écoulements rendues possibles par les techniques de fabrication, les possibilités de parallélisation des expériences ne sont pas explorées ni pour gérer plusieurs échantillons simultanément ni pour détecter plusieurs cibles biologiques à partir d'un même échantillon.

#### Etudes de la biologie moléculaire sur papier

Dans le chapitre 6, des expériences de biologie moléculaire sur papier permettent d'analyser la biocompatibilité des réactions biologiques avec les puces papier. Ces dernières sont rarement constituées uniquement de papier. Des feuillets adhésifs en plastique et la cire (ou autre composé de contrôle d'écoulement) complètent le milieu poreux. La question de la biocompatibilité de cet assemblage de matériaux est essentielle pour estimer la faisabilité d'un test biologique sur papier. Contrairement aux surfaces inertes et lisses des microtubes en Teflon, les puces papier proposent un environnement physico-chimique complexe, souvent responsable d'une dégradation des performances de diagnostic.

Cette étude conduit au développement d'un prototype de test de diagnostic rapide dont les principales caractéristiques sont de stocker des réactifs prêts à l'emploi et d'inclure des contrôles de fonctionnement. Plusieurs dispositifs sont proposés et permettent d'envisager la parallélisation des réactions avec un minimum d'opérations manuelles. Plusieurs cibles de diagnostic sont étudiées, notamment le virus Ebola, la Dengue et HIV.

#### Confrontation aux conditions de terrain

L'utilisation concrète du support papier comme outil de diagnostic repose sur des performances biologiques et une adéquation pratique avec les conditions d'utilisation.

Malgré le nombre grandissant de preuves de concept sur des systèmes modèles, peu de dispositifs papier accèdent aux étapes de validation sur le terrain. Pourtant, confronter le papier aux réalités pratiques d'échantillons cliniques, de conservation, de transport et d'utilisation est essentiel et soulève souvent de nouveaux problèmes.

Les développements expérimentaux en laboratoire, sur le diagnostic du virus Ebola sur papier, ont été suivis d'expériences en Guinée sur des extraits ARN de patients. Les résultats obtenus donnent une meilleure visibilité des performances de diagnostic avec des échantillons réels et des puces papier fabriquées en France, un mois avant. Ces expériences ont nécessité le développement d'une instrumentation transportable pour s'adapter à des conditions d'un laboratoire d'analyse de terrain.

## 2.6 Ce qu'il faut retenir

**Détection de pathogènes** Un test diagnostique est l'ensemble des étapes nécessaires entre la collection d'un échantillon biologique et un résultat d'analyse.

Les étapes de préparation d'échantillons sont essentielles au bon déroulement du test. Elles permettent de simplifier la matrice biologique si elle est trop visqueuse ou inhomogène (particules de différentes tailles). La lyse assure la libération du matériel cellulaire qui devient alors accessible à la détection. Des étapes de purification permettent d'isoler la cible du diagnostic, évitant ainsi des effets inhibiteurs de la part de l'environnement biochimique.

Parmi les trois principaux tests de diagnostic, l'identification cellulaire directe du pathogène par microscopie ou culture cellulaire, est une technique longue, manuelle et nécessitant un savoir-faire. Les immunoessais sur bandelette sont déjà largement documentés et constituent un outil de diagnostic rapide efficace pour la détection de biomarqueurs. L'amplification d'acides nucléiques, par sa grande sensibilité et spécificité, est un test de référence pertinent de manière très précoce au cours d'une infection. Encore restreinte à l'environnement de laboratoire, la biologie moléculaire connaît de récents développements qui simplifient le protocole opératoire, notamment en fonctionnant à température constante et peu élevée.

**Diagnostic sur papier** Au travers des différents dispositifs papier mis en place pour des applications de préparation d'échantillons et/ou de diagnostic, de nombreuses fonctions du papier sont exploitées.

Le milieu poreux constitue un réservoir de stockage tant pour un échantillon biologique, comme l'exemple du prélèvement sanguin séché du nourrisson, que pour des réactifs qui rendent un dispositif prêt à l'emploi (papier pH, test bandelette, ...).

Le caractère filtrant du support papier est un atout principalement pour la préparation d'échantillons. Après filtration, il est possible de continuer le diagnostic sur des cellules ou particules d'intérêt retenues ou, au contraire, sur les analytes dissous ayant traversé le milieu poreux. Cette fonction peut également être mise à profit dans des systèmes de détection utilisant l'agglutination spécifique de particules. Selon l'état dispersé ou agglutiné, les propriétés d'écoulement sont différentes.

La pompe capillaire permet le transport d'échantillons entre différents espaces réactionnels, le mélange ou la dilution de composés, la parallélisation des expériences. Ces écoulements en milieu poreux sont nécessairement soumis à des interactions chromatographiques. Elles peuvent être exploitées pour une fonction de séparation sur des critères chimiques et non stériques, notamment dans la préparation d'échantillons.

La combinaison de ces nombreuses propriétés avec la biologie moléculaire permet déjà le développement de nouveaux outils de diagnostics rapides comme pour celui de maladies infectieuses.



## Deuxième partie

# Développement de nouvelles fonctions microfluidiques à partir du support papier



---

 Concentration d'échantillons par des écoulements capillaires confinés
 

---

**Table des matières**


---

3.1	Conditions expérimentales . . . . .	<b>69</b>
3.1.1	Dispositifs papier . . . . .	69
	Impression de cire . . . . .	69
	Géométries imprimées . . . . .	70
3.1.2	Visualisation des écoulements . . . . .	70
	Etat sec ou humide du papier . . . . .	70
	Effets chromatographiques entre les échantillons et le papier . . . . .	71
	Outils de visualisation . . . . .	72
3.1.3	Conditions extérieures . . . . .	73
	Contrôle de l'hygrométrie ambiante . . . . .	73
	Chauffage du dispositif papier . . . . .	74
3.2	Analyse des effets du confinement sur les écoulements capillaires . . . . .	<b>77</b>
3.2.1	Etude de la diffusion de la cire . . . . .	77
	Observation des surfaces imprimées . . . . .	77
	Mesure de la diffusion de la cire dans l'épaisseur du papier . . . . .	79
3.2.2	Mise en évidence des contributions de l'imbibition capillaire et de l'étalement de goutte aux écoulements dans le papier . . . . .	82
	Etude de l'influence d'une barrière de surface . . . . .	82
	Analyse des effets de la géométrie . . . . .	84
3.3	Exploitation des propriétés du papier pour concentrer des échantillons . . . . .	<b>86</b>
3.3.1	Démonstration d'un concentrateur par rétention spatiale . . . . .	86
	Accumulation d'échantillons dans une microzone . . . . .	86
	Effets d'une barrière de surface sur la rétention d'échantillons . . . . .	88
	Mesure des temps de séchage sur papier . . . . .	89
3.3.2	Concentration par focalisation hydrodynamique . . . . .	90
	Analogie avec la pervaporation microfluidique . . . . .	91

	Mesure des performances d'amplification de signal . . . . .	92
	Concentration transversale dans l'épaisseur du papier . . . . .	96
3.3.3	Optimisation de la focalisation hydrodynamique par rétention chromatographique . . . . .	97
	Effets d'un traitement local par le polymère PAH . . . . .	97
	Focalisation hydrodynamique dans une géométrie de type buse . . .	98
3.4	Ce qu'il faut retenir . . . . .	<b>100</b>

---

LA littérature de la microfluidique papier est fortement orientée vers les applications de diagnostic médical. Peu d'équipes s'intéressent aux écoulements dans le papier et aux nouvelles fonctions réalisables par les techniques de fabrication. Dans cette partie, des expériences simples d'écoulement dans un microcanal droit papier mettent en avant la compétition entre les phénomènes d'imbibition capillaire et d'étalement de goutte. La distinction de ces effets de volume et de surface a des conséquences sur les vitesses d'écoulement et de transport dans le papier. A partir de l'étude de la technique d'impression de cire, de nouvelles géométries pour la concentration d'analytes non volatils sont démontrées et contribuent à améliorer la limite de détection dans le papier.

La réalisation de dispositifs papier présentant une barrière de cire en surface et le procédé de focalisation spatiale d'échantillon ont fait l'objet du dépôt de deux brevets : n° FR1360985 et FR1360987 - enregistrement le 8 novembre 2013 et extension à l'international le 6 novembre 2014.

L'étude de la diffusion de la cire et les essais de concentration par focalisation transverse ont été réalisés en collaboration avec Claire Albert, en stage de Master au laboratoire.

## 3.1 Conditions expérimentales

### 3.1.1 Dispositifs papier

Le support le plus couramment utilisé dans la littérature de la microfluidique papier est le papier à chromatographie Whatman Grade n° 1. Il est constitué de 98% de cellulose et de moins de 0.06% de cendres. Parmi les caractéristiques techniques du fournisseur, on trouve une épaisseur à 180  $\mu\text{m}$ , une porosité de 0.66, une taille de pores à 11  $\mu\text{m}$  et une vitesse de mouillage à 130 *mm* / 30 *min*.

#### Impression de cire

Les puces papier sont fabriquées par la technologie d'impression de cire qui a l'avantage d'être simple et rapide à partir d'équipements commerciaux.

Les motifs sont conçus en dessin vectoriel à l'aide du logiciel CleWin7. L'usage d'une bibliothèque de symboles permet la réutilisation d'une partie d'un motif dans d'autres géométries. Le contenu du fichier CleWin (.cif) est exporté dans un format compatible avec Adobe Illustrator CS3 (.eps) pour faciliter la communication avec l'imprimante à jet de cire (Xerox ColorQube 8580). Quatre couleurs de cire sont disponibles dans l'imprimante (Cartridge-Free ColorQube Ink) : cyan, magenta, jaune et noir. La combinaison de ces couleurs associée à la couleur blanche du substrat donne accès à toutes les teintes. Dans Adobe Illustrator CS3, les teintes sont définies par la fonction "Couleurs dynamiques en CMJN" et variées de la plus claire à la plus foncée



selon un pourcentage de 0 à 100%.

L'imprimante dépose des gouttes de cire en surface du papier suivant la forme du motif et ses couleurs. A température ambiante, la cire est solide. Une étape de cuisson (1 minute à 150 ° C sur une plaque chauffante) liquéfie la cire qui diffuse alors dans le papier. A partir du point de dépôt, la diffusion se fait dans toutes les directions accessibles. Si la quantité de cire et le temps de cuisson sont suffisants, la cire atteint toute l'épaisseur du papier. Le transfert des motifs en surface à toute l'épaisseur de la feuille, s'accompagne d'une réduction de la résolution spatiale à cause de la diffusion.

### Géométries imprimées

Plusieurs géométries, décrites en figure 3.1, sont imprimées :

- un nuancier constitué de carrés de différentes teintes, au contour noir,
- des plaques multipuits en papier,
- des anneaux aux différentes largeurs de traits et couleurs,
- des canaux droits associés à une zone de dépôt de goutte,
- des variations de canaux droits : extrémité pointue, forme de buse, largeur, carrés de cire.

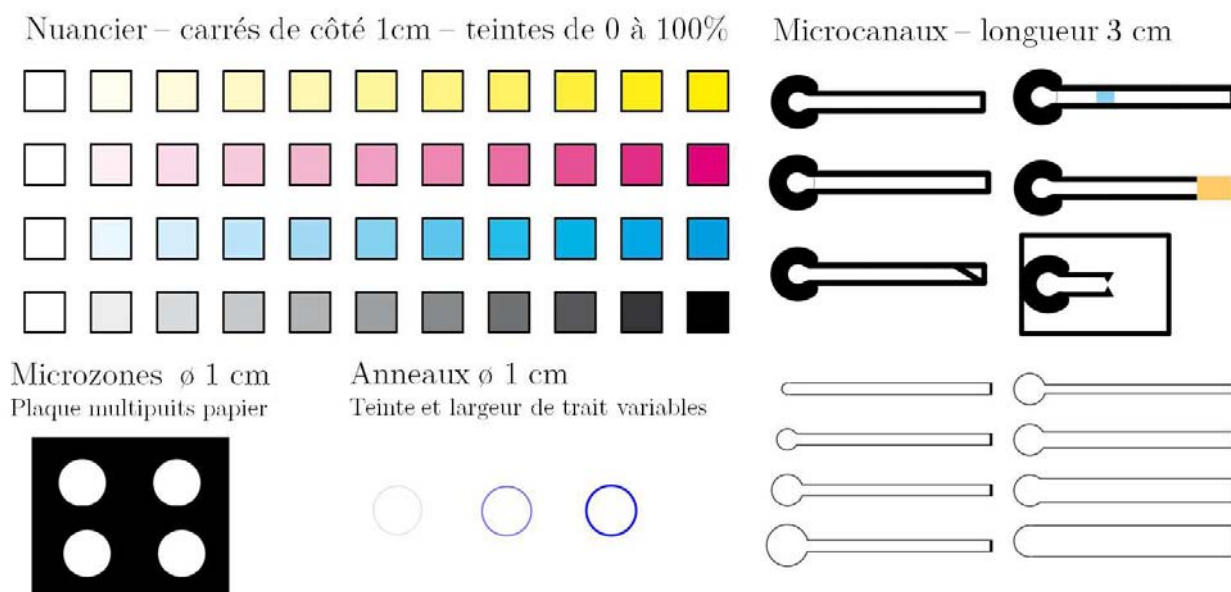


Figure 3.1 – Motifs des puces papier.

### 3.1.2 Visualisation des écoulements

#### Etat sec ou humide du papier

Les écoulements dans le papier sont obtenus en déposant, avec une micropipette, un volume connu d'eau. Il peut s'agir d'eau pure ou d'un mélange à une concentration connue de fluorescéine ou de bleu de méthylène. L'observation macroscopique s'effectue par la mesure de l'avancée du front liquide au cours du temps, grâce à la différence d'indice entre les états sec et humide (figure 3.2).

Le caractère sec ou humide du papier est défini par comparaison de l'intensité de signal de la zone d'intérêt avec un morceau de papier sec. Le suivi au cours du temps permet de remonter au temps de séchage.

Pour isoler l'écoulement de la paillasse, le papier est utilisé sur un support qui surélève le papier de quelques millimètres.

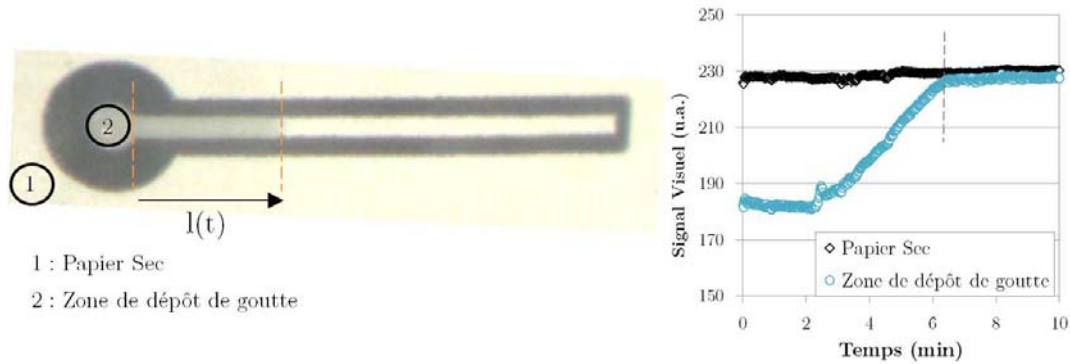


Figure 3.2 – Avancée du front liquide et mesure du temps de séchage sur papier.

### Effets chromatographiques entre les échantillons et le papier

Un écoulement liquide dans le papier est un dispositif chromatographique. La porosité de la phase stationnaire - le papier - est responsable de grandes surfaces d'interaction avec la phase mobile - le liquide. Au sein de cet écoulement, chaque analyte présent dans le liquide migre à une vitesse qui dépend de ses interactions physico-chimiques avec le papier. Dans les cas extrêmes, un analyte peut ne présenter aucune interaction avec la phase stationnaire ou être complètement retenu. Dans le premier cas, l'analyte migre à la même vitesse que le front de solvant. Dans le deuxième cas, l'analyte est capturé par adsorption dans le milieu poreux.

Les expériences de ce chapitre sont réalisées avec deux colorants qui ont des comportements chromatographiques très différents : la fluorescéine et le bleu de méthylène. Comme le montre la figure 3.3, la fluorescéine avance quasiment à la même vitesse que le front d'eau alors que le bleu de méthylène est retenu sur la zone de dépôt de goutte.

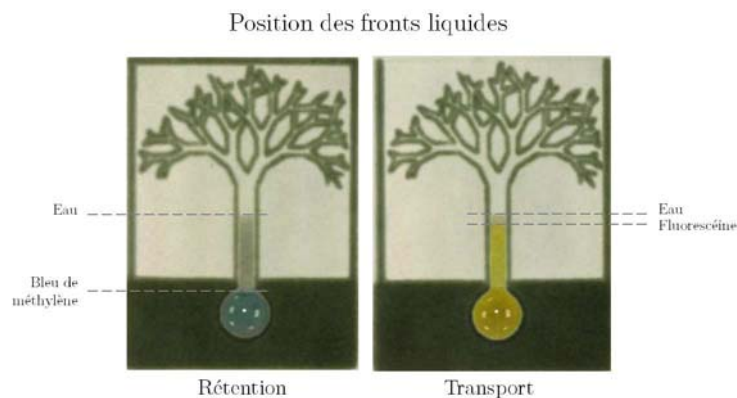
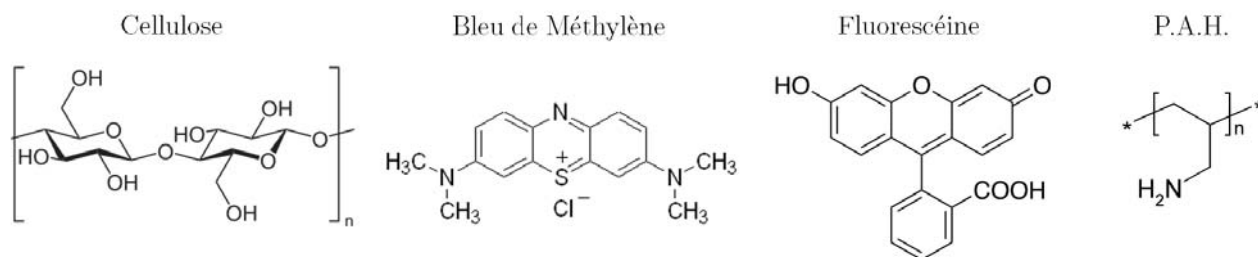


Figure 3.3 – Effets chromatographiques dans le papier avec le bleu de méthylène et la fluorescéine.

Ces propriétés sont principalement dues aux charges portées par chacune des molécules dessinées en figure 3.4. La cellulose porte de nombreux atomes d'oxygène électronégatifs, notamment dans des fonctions alcool. La charge globale de ce polymère est donc négative. Le bleu de méthylène est un ion positif, via l'élément soufre. L'interaction ionique explique la forte adsorption de ce colorant. A l'inverse, la fluorescéine porte, comme la cellulose, des atomes d'oxygène électronégatifs. Les interactions entre la fluorescéine et la cellulose sont répulsives.



**Figure 3.4** – Formule semi-développée des molécules de cellulose, du bleu de méthylène, de la fluorescéine et du PAH.

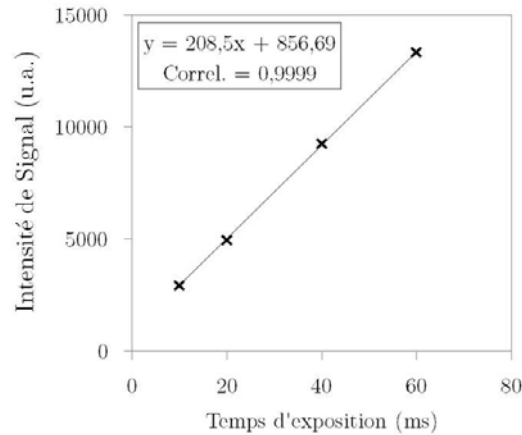
Le PAH (Poly(Allylamine Hydrochloride)) est un polymère chargé positivement via sa fonction Amine. Il est utilisé en sous-section 3.3.3 pour modifier l'état de surface de la cellulose.

### Outils de visualisation

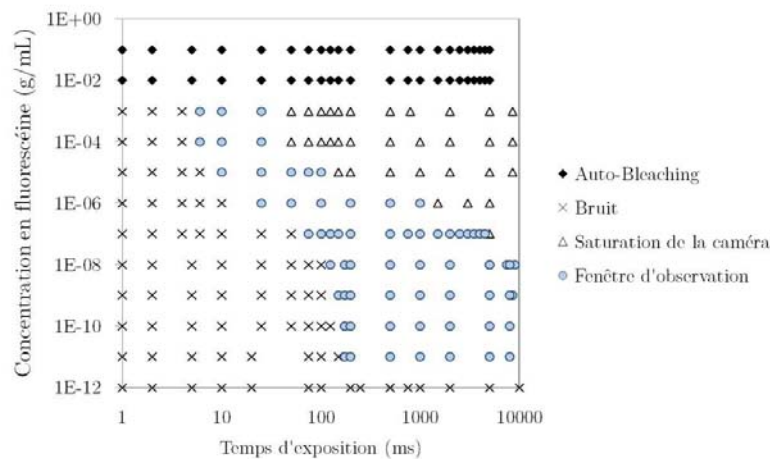
Les photos et vidéos sont obtenues avec un macro-objectif et une caméra PixelInk Couleur. Des observations sur un microscope Leica DMI6000B ont été effectuées, en lumière blanche et en fluorescence, avec une caméra Hamamatsu EM-CCD C900-13. La fluorescence est observée grâce à une lampe UV (Leica EL 6000) et un filtre GFP (longueur d'onde d'excitation  $470\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ ; miroir dichroïque :  $500\text{ nm}$ ; longueur d'onde d'émission  $525\text{ nm} \pm 25\text{ nm}$ ) Les images sont analysées avec le logiciel de traitement ImageJ.

L'étude de la fluorescence sur de larges gammes de concentrations est réalisée en travaillant à intensité incidente constante mais avec des temps d'exposition de la caméra variables. Les faibles signaux de fluorescence sont détectés aux temps d'exposition longs ce qui permet d'accumuler un nombre de photons suffisants. Pour les forts signaux de fluorescence, il faut un temps d'exposition très court pour éviter la saturation du détecteur. La linéarité du signal avec le temps d'exposition est vérifiée expérimentalement et présentée en figure 3.5. Un même dépôt de  $5\text{ }\mu\text{L}$  d'une solution de fluorescéine ( $c = 10^{-7}\text{ g/mL}$ ) sur papier est observé à différents temps d'exposition de la caméra. La relation linéaire montre qu'il est possible de comparer des mesures faites dans différentes conditions, puis de normaliser les données.

Pour les mesures en fluorescence à partir de différents temps d'exposition, un diagramme de fonctionnement du dispositif peut être établi (figure 3.6). Aux fortes concentrations en fluorescéine, un phénomène de blanchiment dû à la sur-concentration empêche toute mesure. Pour des temps d'exposition et des concentrations élevés, le détecteur arrive à saturation. Pour des temps d'exposition et des concentrations faibles, la fluorescence intrinsèque du papier limite la détection. Entre ces deux régimes, la fenêtre d'observation permet la mesure de toute la gamme de concentration en adaptant le temps d'exposition.



**Figure 3.5** – Vérification de la linéarité du signal en fonction du temps d'exposition de la caméra.



**Figure 3.6** – Diagramme de fonctionnement de la détection en fluorescence selon le temps d'exposition et la concentration en fluorescéine.

### 3.1.3 Conditions extérieures

Aux interfaces liquide-vapeur, les changements d'état (évaporation-condensation) se produisent jusqu'à atteindre l'équilibre thermodynamique. Cet équilibre est déterminé par un flux de chaleur nul et une pression partielle égale à la pression de vapeur saturante. D'une part, l'humidité ambiante modifie les conditions initiales de vapeur d'eau dans l'air. D'autre part, une variation de température impacte directement la viscosité du liquide et la valeur de la pression de vapeur saturante. Les conditions extérieures d'hygrométrie et de température sont donc des paramètres importants à considérer pour les écoulements et l'évaporation de liquides dans le papier.

#### Contrôle de l'hygrométrie ambiante

Les écoulements dans le papier à hygrométrie contrôlée sont réalisés dans un caisson isolant (figure 5.10). La variation de deux débits d'airs sec et humide permet d'atteindre une large

gamme de taux d'humidité. L'air humide est produit par un humidificateur (Banc Générateur Humidité - Calibrage). Un cristallisoir est utilisé pour augmenter le confinement et atteindre plus rapidement l'état stationnaire.



Figure 3.7 – Dispositif expérimental de contrôle de l'hygrométrie.

Une étape de calibration préliminaire, présentée en figure 3.8, consiste à mesurer le taux d'humidité au cours du temps pour un débit humide de vapeur d'eau imposé. Les temps de stabilisation du taux d'humidité sont de l'ordre de 1 à 2 heures. Un flux d'air sec permet d'atteindre des taux d'humidité plus bas que celui de l'air ambiant. La combinaison des deux flux d'air (sec et humide) donne accès à toute la gamme de taux d'humidité de 0 à 100%.

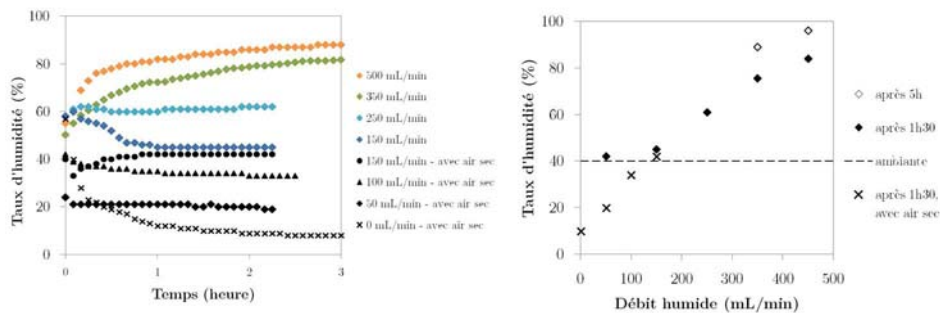
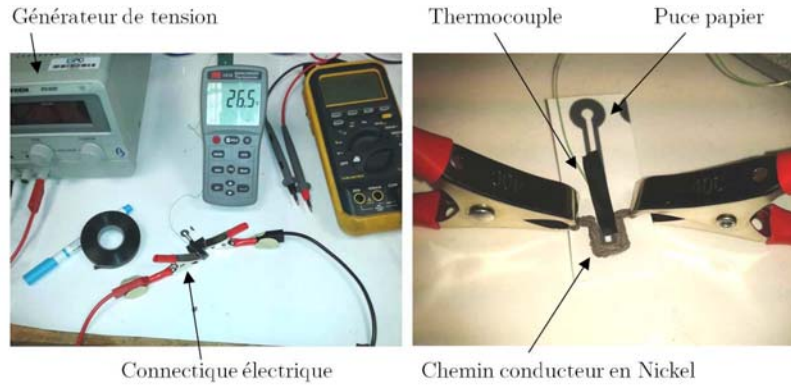


Figure 3.8 – Calibration des flux d'air pour une hygrométrie contrôlée.

### Chauffage du dispositif papier

Un dispositif chauffant est mis en place localement, sur le papier, autour du motif en cire (figure 3.9). Il s'agit d'une conversion électro-thermique par effet Joule. Une ligne conductrice est tracée grâce à un stylo au nickel (CircuitWorks Nickel Conductive Pen) sur le papier, autour du motif en cire. Les extrémités de ce chemin conducteur sont connectées à un générateur de tension qui impose une différence de potentiel. La résistance de cette ligne est déterminée par sa géométrie (épaisseur, longueur, largeur) et par la conductivité du nickel.



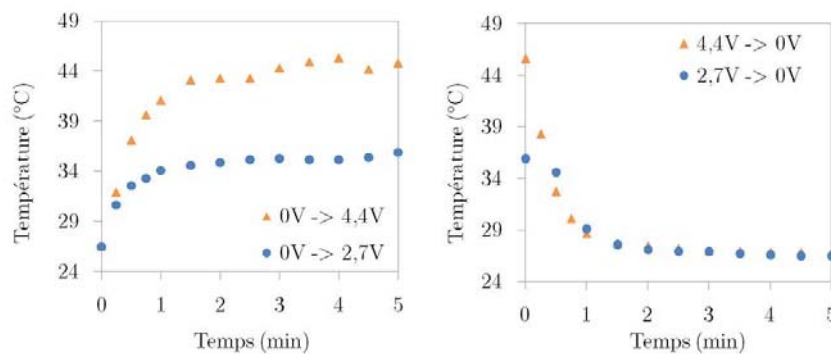
**Figure 3.9** – Dispositif expérimental de chauffage local.

La dissipation par effet Joule (équation 3.1) détermine la relation entre la température, la différence de potentiel et la résistance. La température sur le papier est mesurée par un thermocouple.

$$T = T_{amb} + \frac{R_{th}}{R_{elec}} U^2 \quad (3.1)$$

Avec  $T$  la température mesurée localement sur le papier,  $T_{amb}$  la température ambiante,  $R_{th}$  la résistance thermique du système,  $R_{elec}$  la résistance électrique du nickel,  $U$  la différence de potentiel aux bornes du circuit conducteur.

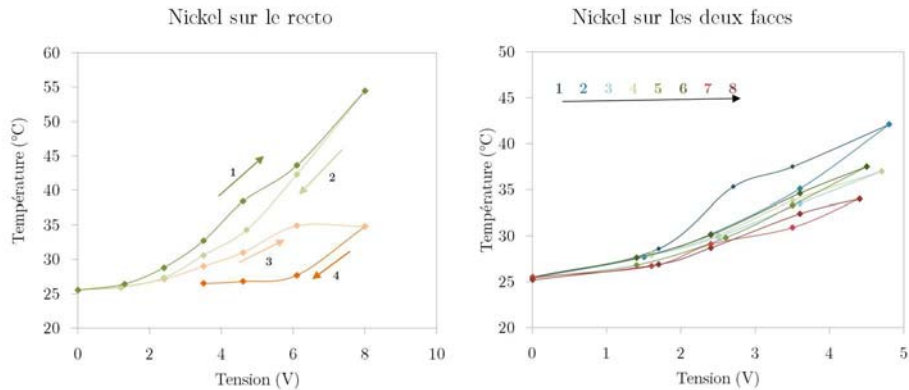
La calibration du dispositif chauffant consiste d'abord à évaluer les temps d'établissement des régimes stationnaires comme le montre la figure 3.10. Une variation de tension de  $\pm 4V$  induit un changement de température sur le papier de  $15^\circ C$  en moins de 3 minutes.



**Figure 3.10** – Régimes transitoires de mise en température selon la tension appliquée.

La robustesse du dispositif est étudiée en appliquant successivement des tensions croissantes et décroissantes (voir figure 3.11). Pour chaque mesure de température à tension fixée, un délai de plusieurs minutes est observé pour laisser s'établir le régime stationnaire. Pour des grandes variations de tension (jusqu'à 8 V) et avec un dépôt de nickel sur une seule face du papier, le dispositif chauffant est rapidement dégradé. Une non-reproductibilité des mesures est observée dès le deuxième aller-retour en tension. En réduisant les variations de tension (jusqu'à 5 V) et

avec un dépôt de nickel sur chacune des faces du papier, le dispositif chauffant présente une meilleure reproductibilité même après plusieurs aller-retours en tension.

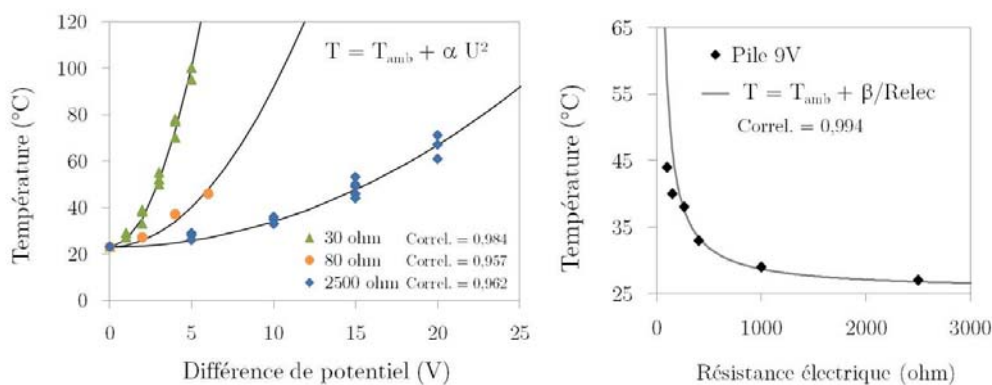


**Figure 3.11** – Température sur le papier en fonction de la tension aux bornes du Nickel au cours de cycles successifs.

Selon l'équation 3.1, pour un chemin conducteur donné, la température croît linéairement avec le carré de la différence de potentiel (équation 3.2). A différence de potentiel fixée, la température croît linéairement avec la conductance électrique (équation 3.3). Ces deux relations sont vérifiées expérimentalement (voir figure 3.12) pour plusieurs systèmes chauffants dont on mesure avec un multimètre la résistance électrique.

$$(T - T_{amb}) \sim U^2 \quad (3.2)$$

$$(T - T_{amb}) \sim \frac{1}{R_{elec}} \quad (3.3)$$



**Figure 3.12** – Evolution de la température en fonction de la tension appliquée et de la résistance électrique du dispositif.

Selon la résistance du chemin conducteur, une température de 37 ° C peut être atteinte grâce à une tension inférieure à 9 V. Ce dispositif de chauffage permet donc d'envisager des applications biologiques portables.

## 3.2 Analyse des effets du confinement sur les écoulements capillaires

Avant d'observer les propriétés d'écoulement à l'intérieur de différentes géométries définies par des barrières de cire, l'impression et la diffusion de la cire sont étudiées. L'objectif est de mieux comprendre la répartition des motifs hydrophobes avant et après l'étape de cuisson. Les résultats obtenus font émerger des configurations utiles à la distinction des propriétés d'écoulement : imbibition capillaire et étalement de goutte.

### 3.2.1 Etude de la diffusion de la cire

L'impression et la diffusion de la cire dans le papier sont observées au microscope pour différentes teintes, dans une géométrie de nuancier. Des mesures en fluorescence permettent également une mesure de la pénétration de la cire dans l'épaisseur du papier.

#### Observation des surfaces imprimées

Les dépôts de cire sur papier Whatman sont observés au microscope en lumière blanche (figure 3.13). Au grossissement  $\times 5$ , les fibres de papier et les gouttelettes de cire déposées par l'imprimante sont visibles. Le diamètre mesuré des fibres est d'environ  $15\ \mu\text{m}$  et celui des gouttes de cire de  $150\ \mu\text{m}$ . L'observation montre que seules les couleurs cyan et jaune ont été imprimées avec un seul bloc de cire : les teintes de magenta et de gris sont obtenues par mélange. Les images illustrent également la distribution du nombre de gouttelettes de cire en fonction de la teinte claire ou foncée. En effet, à partir de la couleur du bloc de cire, une nuance plus claire est obtenue par le dépôt d'une faible densité de gouttelettes. L'œil fait alors la synthèse entre la cire et la couleur blanche du substrat papier.

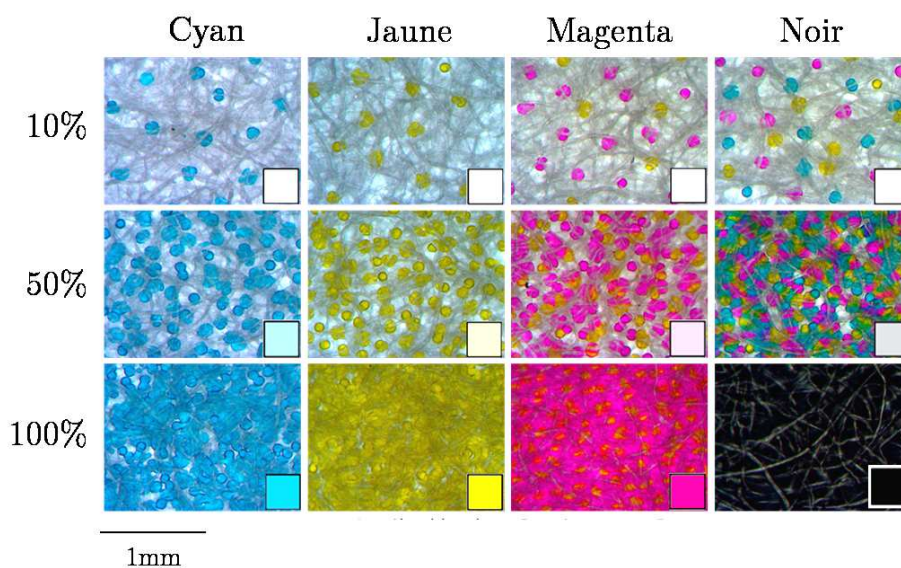


Figure 3.13 – Observation microscopique ( $\times 5$ ) du nuancier avant diffusion de la cire.



Pour les teintes claires (< 50%), les gouttes de cire sont éparpillées : leur décompte peut être corrélé à la teinte. La figure 3.14 présente le nombre de gouttes par unité de surface pour chaque nuance et présente un profil linéaire. Pour les teintes plus foncées (> 50%), le chevauchement des dépôts de gouttes rend difficile le décompte.

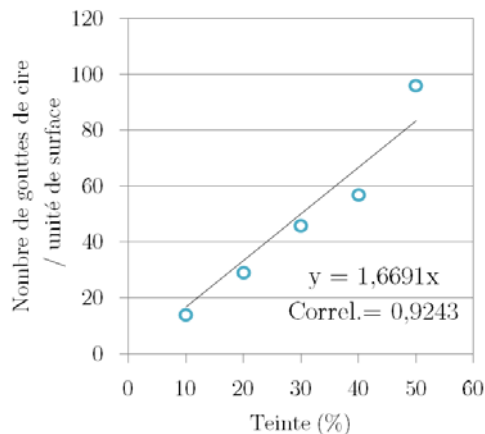


Figure 3.14 – Représentation de la densité de gouttes de cire en fonction de la teinte.

Pour la suite de l'étude, seules les teintes cyan et jaune sont conservées puisqu'elles ont l'avantage de ne pas être issues d'un mélange de cires.

Le dépôt de cire par l'imprimante est localisé à la surface du papier. Le confinement d'écoulements capillaires est obtenu après une étape de cuisson (1 minute à 150 °C) qui permet à la cire de diffuser dans toute l'épaisseur du papier. La même observation en lumière blanche a été réalisée avant et après ce traitement thermique (figure 3.15). Pour une teinte à 10%, la quantité de cire déposée est tellement faible, qu'elle ne suffit pas à recouvrir la surface, même après diffusion. A 50%, l'étape de cuisson rend plus uniforme la répartition de la couleur. Pour la teinte la plus dense (100%), les gouttes de cire avant diffusion forment déjà un dépôt homogène. L'étape de cuisson permet alors une pénétration de la cire dans l'épaisseur du papier.

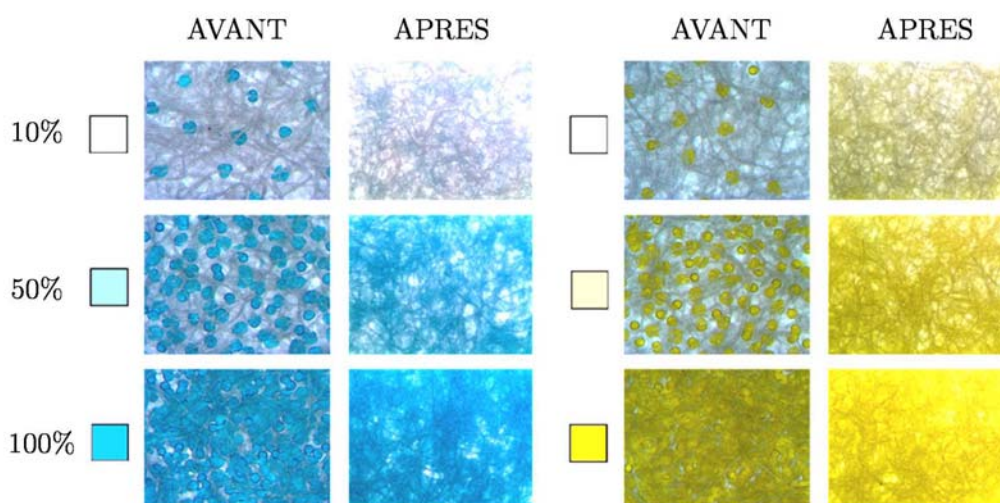
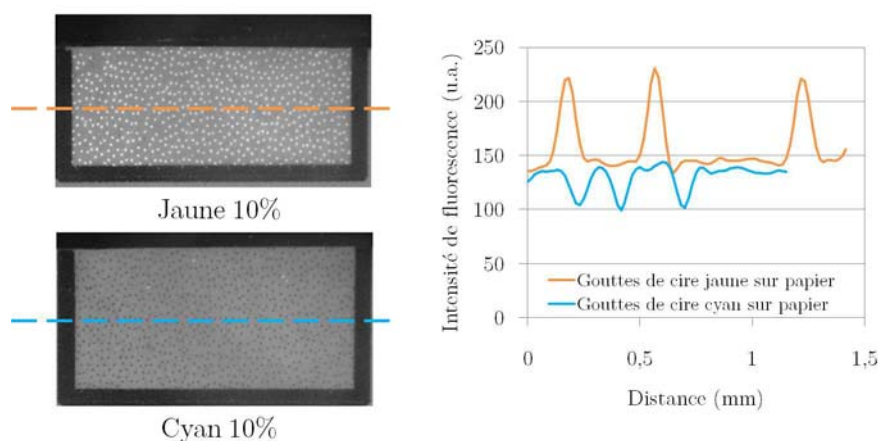


Figure 3.15 – Observation microscopique (x5) du nuancier avant et après diffusion de la cire.

Les gouttes de cire déposées par l'imprimante concentrent toute la couleur à l'endroit du dépôt. Le contraste visuel entre le papier et la goutte est suffisant pour la détection. Après l'étape de diffusion, la cire fondue migre le long des fibres et se distribue sur une plus grande surface et en profondeur dans le papier. Cette dispersion spatiale nuit à la détection colorimétrique. Les propriétés de fluorescence des cires peuvent être utilisées pour améliorer la visualisation. Des images en fluorescence des teintes 10% des couleurs cyan et jaune, montrent des contrastes entre la fluorescence de chaque cire et celle du papier (figure 3.16).



**Figure 3.16** – Microscopie de fluorescence des teintes 10% cyan et jaune.

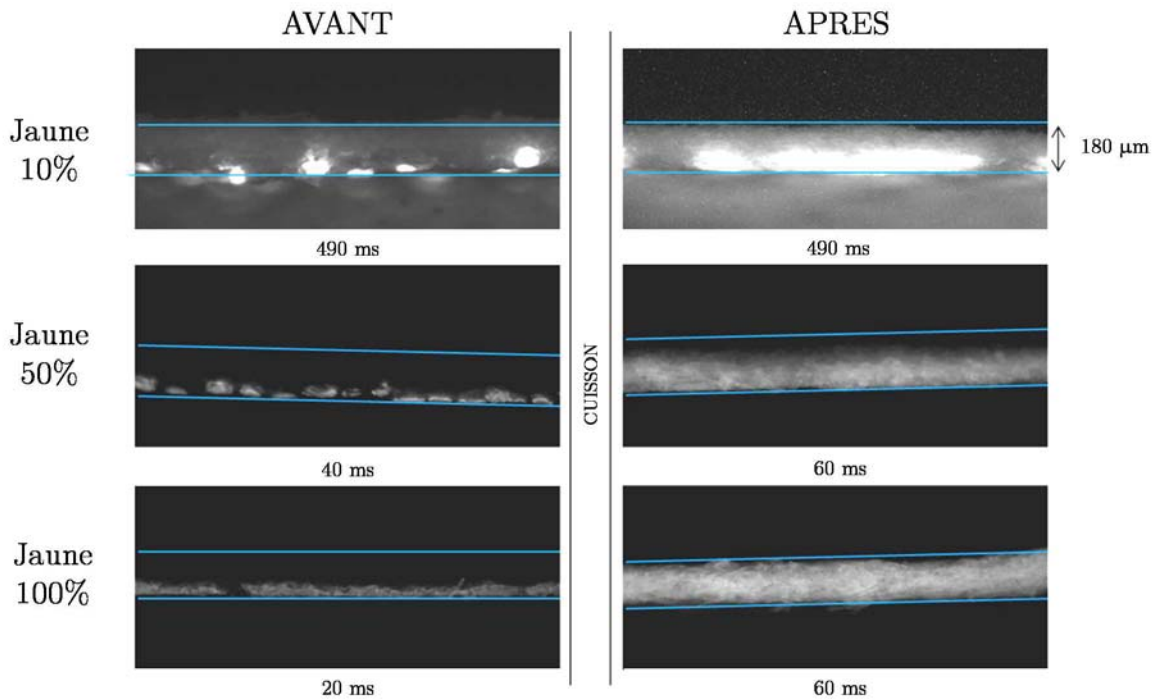
Aux longueurs d'onde de la GFP, la cire cyan n'émet aucun signal alors que le papier présente une légère fluorescence intrinsèque. Les dépôts cyan peuvent donc être détectés par diminution du signal dû au papier, mais le contraste est faible. À l'inverse, la cire jaune est très fluorescente par rapport au bruit de fond du substrat.

### Mesure de la diffusion de la cire dans l'épaisseur du papier

Pour confiner les écoulements capillaires, les barrières de cire doivent atteindre toute l'épaisseur de la feuille de papier. C'est la diffusion de la cire fondue, à partir du dépôt de l'imprimante, qui réalise cette fonction. Or, selon la teinte imprimée, la quantité de cire et sa répartition spatiale varient. Des observations en fluorescence dans l'épaisseur du papier (sur la tranche) permettent de caractériser la pénétration de la cire.

Pour cela, un carré jaune du nuancier est coupé en deux et positionné sous le microscope sur le côté. Les gouttes de cire avant cuisson et la répartition de la cire fondue après cuisson sont observées par fluorescence (figure 3.17). Il n'a pas été possible de réaliser une visualisation dynamique expérimentale de la diffusion à cause du blanchiment thermique (thermo-bleaching). Lors de la cuisson, la cire liquide ne fluoresce plus. Seules des images avant/après cuisson ont permis de caractériser l'épaisseur atteinte par la cire.

Les traits bleus positionnent les extrémités du papier, d'après une autre image en lumière blanche. Pour chaque configuration, les images ont été prises à différents temps d'exposition selon la quantité de cire et son état concentré dans les gouttes (signal fort avant cuisson) ou dispersé dans le papier (signal plus faible après cuisson).



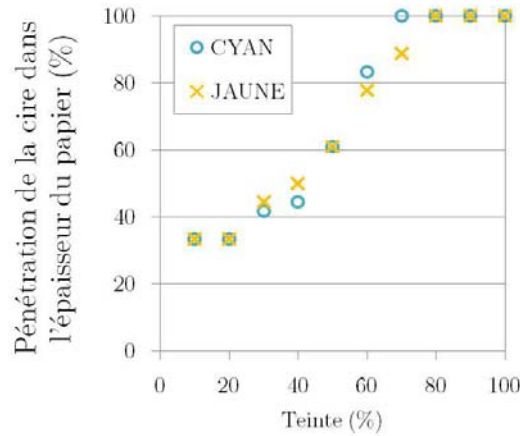
**Figure 3.17** – Microscopie de fluorescence dans l'épaisseur du papier avant et après cuisson pour différentes teintes de jaune.

Ce second point de vue sur les teintes jaunes 10%, 50% et 100% illustre à nouveau la distribution des gouttes de cire après impression : très éparées pour les teintes claires, denses pour les teintes foncées. La cuisson modifie la répartition de la cire. Dans le cas du jaune 10%, chaque goutte de cire est un point source de la diffusion. D'une part, l'orientation des fibres de papier dans le plan de la feuille donne une direction préférentielle à la diffusion qui n'atteint alors qu'une fraction de l'épaisseur du papier. D'autre part, l'éloignement initial des gouttes de cire ne permet pas un recouvrement homogène de la surface, même après cuisson. Le dépôt plus dense de cire avec le jaune 50% assure un recouvrement total de la surface après diffusion, mais ne pénètre que dans une moitié de l'épaisseur de la feuille de papier. La grande quantité de cire dans la couleur jaune 100% permet une diffusion de la cire dans tout le papier accessible. Ces teintes illustrent trois configurations réalisables par impression de cire : un dépôt poreux (jaune 10%), une barrière de surface (jaune 50%), une barrière dans toute l'épaisseur (100%).

Des mesures similaires mais indirectes peuvent être réalisées avec la cire cyan. Comme cette dernière n'est pas fluorescente, il est possible de déduire sa localisation dans le papier par la mesure de la fluorescence du papier, ou d'un composé qui ne s'écoule pas au contact de la cire. Expérimentalement, il s'agit des mêmes carrés de nuancier mais avec la cire cyan. 5  $\mu\text{L}$  d'une solution de fluorescéine ( $c = 10^{-3}$  g/mL) sont ajoutés au verso de la feuille de papier (le recto correspond à la face imprimée) et laissés sécher. Puis le papier est coupé et positionné sur la tranche sous le microscope. Cette opération est réalisée sur toutes les teintes de cyan, dans le cas de papiers cuits ou non. L'épaisseur de la cire est obtenue par déduction de l'épaisseur atteinte par la fluorescéine de l'épaisseur totale.

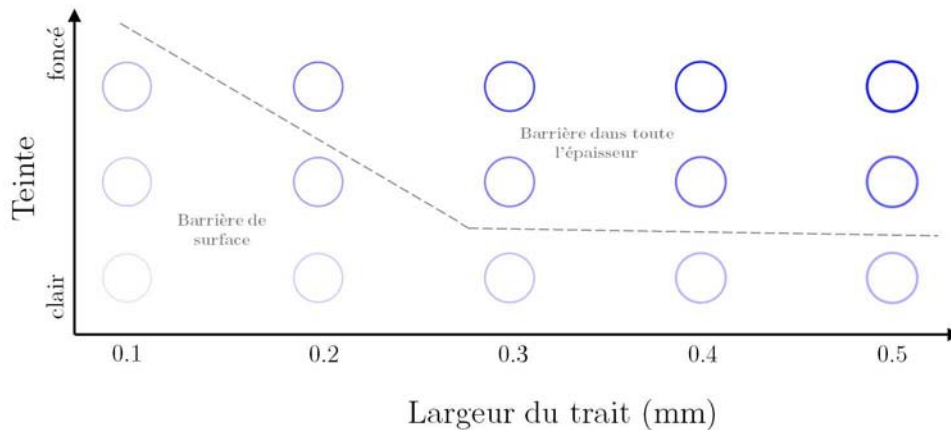
Ces deux configurations donnent accès à une estimation de l'épaisseur de pénétration de la

cire dans le papier en fonction de la quantité de cire imprimée. Les résultats sont rassemblés dans la courbe présentée en figure 3.18. Les teintes les plus foncées forment des barrières dans toute l'épaisseur alors que les plus claires atteignent seulement un tiers de la feuille.



**Figure 3.18** – Profondeur de diffusion de la cire, normalisée par l'épaisseur du papier.

Le nuancier a permis une étude dans une géométrie carrée. Pourtant, dans la microfluidique papier, les dépôts de cire sont plus souvent utilisés sous forme de traits qui confinent l'écoulement. La combinaison des effets de la teinte et de la largeur du trait a été réalisée dans un motif d'anneaux. Les anneaux (diamètre 1 cm) sont constitués d'un trait de cire d'une largeur allant de 0.1 à 0.5 mm, pour trois teintes de bleu (figure 3.19).



**Figure 3.19** – Résistance à l'écoulement d'anneaux en cire de différentes largeurs et teintes.

Un dépôt de 40  $\mu\text{L}$  d'eau est réalisé dans chaque anneau. Ce volume est suffisamment grand devant le volume interne de l'anneau ( $V = \pi r^2 e \epsilon \simeq 10 \mu\text{L}$ ) pour que la pompe capillaire transporte le liquide à l'extérieur de l'anneau si la barrière de cire n'atteint pas toute l'épaisseur du papier. La différence d'indice entre papier sec et humide rend très facile la détection visuelle de l'écoulement hors du motif d'anneau.

Expérimentalement, les anneaux foncés au trait épais (partie en haut à droite de la figure 3.19) retiennent l'intégralité de la goutte d'eau et constituent des barrières dans l'épaisseur. Les an-

neaux plus clairs au trait fin (partie en bas à gauche de la figure 3.19) laissent passer l'écoulement, il s'agit de barrières de surface.

Dans le cas des teintes claires, comme démontré dans le nuancier, la quantité de cire n'est jamais suffisante pour atteindre toute l'épaisseur de papier. Avec des teintes plus foncées, si le trait est large, la situation devient localement similaire au nuancier. Une même teinte foncée crée pourtant une barrière de surface si le trait est fin à cause de la diffusion préférentielle de la cire dans le plan de la feuille de papier.

Cette caractérisation est nécessaire pour s'assurer du bon confinement des écoulements dans les puces papier grâce aux barrières dans toute l'épaisseur. Nous nous intéressons également aux barrières de surface qui peuvent apporter de nouvelles fonctionnalités.

### 3.2.2 Mise en évidence des contributions de l'imbibition capillaire et de l'étalement de goutte aux écoulements dans le papier

La section 1.2.1 décrit les différents phénomènes physiques en compétition lors d'écoulements dans le papier. En présence d'un substrat poreux très hydrophile, l'écoulement d'eau est régi par un étalement de goutte sur un substrat rugueux et par l'imbibition capillaire modélisée par la loi de Lucas-Washburn. L'interaction de ces écoulements avec les barrières de cire offre de nouvelles configurations.

Dans une géométrie papier de type canal droit, la dynamique d'écoulement peut être mesurée par l'avancée du front liquide. Différentes conditions sont comparées comme la présence d'une barrière de surface, le volume de la goutte réservoir et la géométrie.

#### Etude de l'influence d'une barrière de surface

Pour dissocier l'imbibition capillaire de l'étalement de goutte, une barrière de surface est positionnée autour de la zone de dépôt de goutte d'un canal droit papier. Le caractère hydrophobe de la cire empêche l'étalement de goutte alors que le milieu poreux sous la barrière de surface autorise l'imbibition capillaire. L'avancée du front liquide au cours du temps est donc mesurée dans deux géométries de canaux droits avec ou sans la barrière de surface (figure 3.20).

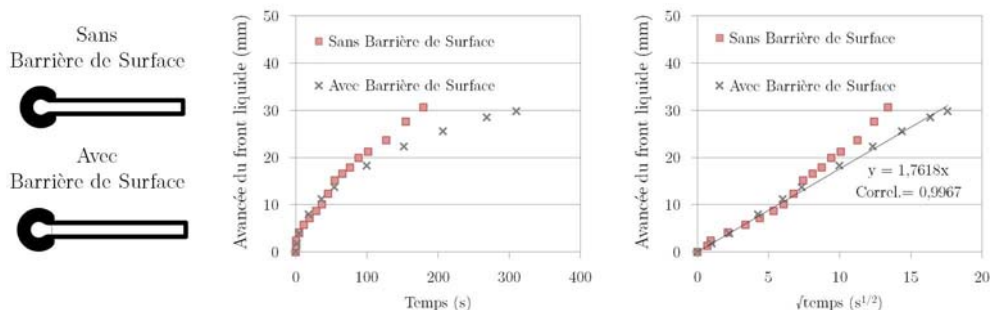
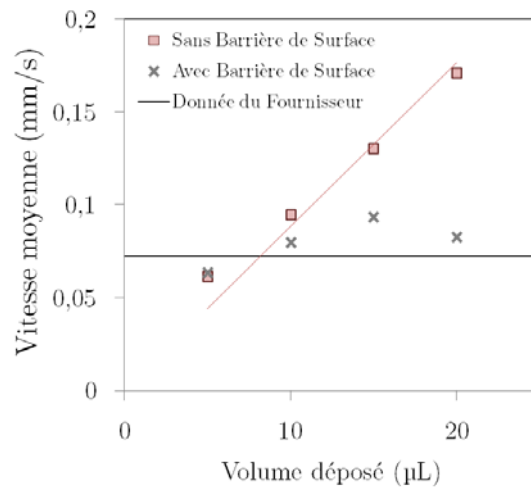


Figure 3.20 – Avancée du front liquide dans deux géométries de canal droit avec/sans barrière de surface.

En présence de la barrière de surface, l'écoulement est plus lent et suit le modèle de Lucas-Washburn :  $l(t) \sim \sqrt{t}$ . Sans cette barrière, l'écoulement est plus rapide. Aux temps courts, il

suit la même loi : l'imbibition et l'étalement sont du même ordre de grandeur. Aux temps longs, on se trouve dans la même situation qu'une restriction : une nouvelle loi de Lucas-Washburn démarre. L'écoulement en surface contribue à apporter un réservoir liquide plus loin dans le microcanal.

Les lois de Tanner décrivent la vitesse d'écoulement selon le rayon initial de la goutte dans deux régimes : capillaire ou gravitaire. Dans notre géométrie, le rayon de la goutte est fixé par le format de la zone de dépôt. Le volume de la goutte définit donc le régime d'étalement et constitue un plus ou moins gros réservoir de liquide. La mesure de vitesses moyennes d'écoulement dans une géométrie de canal droit avec ou sans barrière de surface pour différents volumes de goutte est présentée en figure 3.21.



**Figure 3.21** – Contribution de l'étalement à la vitesse moyenne, selon le volume de la goutte.

La vitesse moyenne dans le papier Whatman annoncée par le fournisseur, est de  $130 \text{ mm}/30 \text{ min}$  soit  $0,07 \text{ mm/s}$ . Pour les deux géométries (avec/sans barrière surface) et dans le cas de petits volumes, on retrouve bien cette valeur. Avec une barrière de surface et aux plus grands volumes, l'écart entre la vitesse moyenne d'écoulement et la donnée du fournisseur reste faible. Sans la barrière de surface, la vitesse moyenne d'écoulement augmente linéairement avec le volume de la goutte.

Une manière de visualiser cet étalement en surface consiste à utiliser des microsphères fluorescentes dont le diamètre ( $20 \text{ }\mu\text{m}$ ) est supérieur à la taille de pore du papier ( $11 \text{ }\mu\text{m}$ ). Cette exclusion stérique empêche le transport des microsphères par l'imbibition capillaire. Leur répartition surfacique est donc caractéristique de l'étalement de goutte. Dans une configuration de microcanal droit sans barrière de surface, des images en fluorescence permettent de mesurer la longueur sur laquelle les microsphères sont distribuées (voir figure 3.22).

Pour des volumes de gouttes inférieurs à  $30 \text{ }\mu\text{L}$ , la longueur d'étalement dépend linéairement du volume déposé. Aux plus grands volumes, la forme du microcanal n'est pas adaptée : une partie de la goutte repose sur les barrières de cire et y dépose des microsphères. La longueur d'étalement continue d'augmenter avec le volume déposé mais dévie de la relation linéaire.

Dans les précédentes configurations, la barrière de surface est un fin dépôt de cire, d'une teinte claire. La cire, après diffusion, reste principalement sur la surface du papier. L'objectif

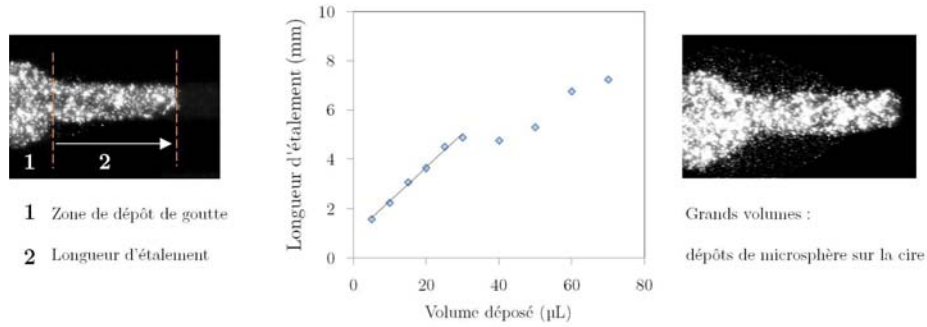


Figure 3.22 – Caractérisation de la longueur d'étalement avec des microsphères fluorescentes.

est de supprimer l'étalement de goutte sans modifier l'imbibition capillaire. Avec un dépôt de cire plus important (taille du dépôt et/ou teinte foncée), la cire atteint, après diffusion, une plus grande portion de l'épaisseur de papier. Avec un carré de cire cyan 50% à 1 cm de la zone de dépôt, le microcanal papier présente une restriction dans l'épaisseur de 50%, suivie d'un élargissement. Les écoulements dans deux géométries de type microcanal droit avec barrière de surface sont comparés avec et sans restriction (figure 3.23). Sans restriction, l'écoulement suit bien une loi de Lucas-Washburn avec  $l(t) \sim \sqrt{t}$ . Comme dans les exemples décrits en section 1.2.1, la présence d'une restriction suivie d'un élargissement ralentit l'écoulement. Avec ce carré de cire, on retrouve le même résultat avec une restriction dans une direction transverse.

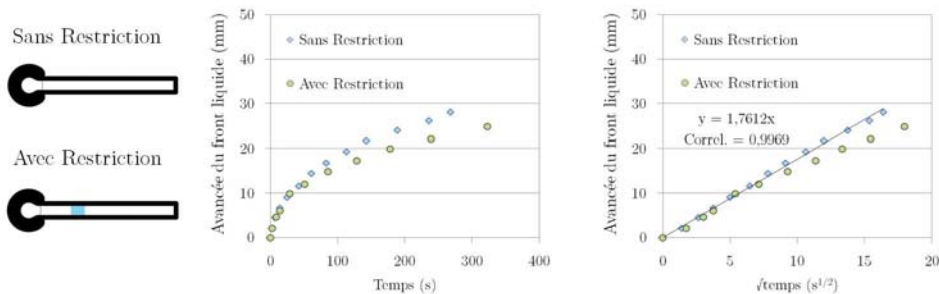


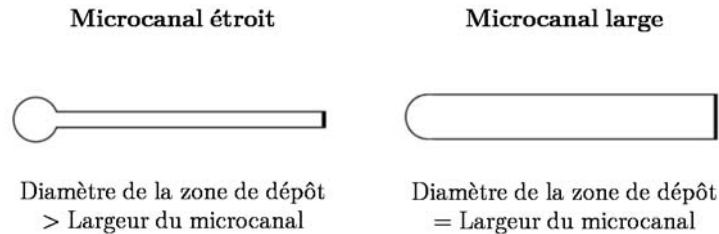
Figure 3.23 – Avancée du front liquide avec/sans restriction dans l'épaisseur.

Dans des configurations simples de microcanal droit, des barrières de cire en surface ou dans une fraction seulement de l'épaisseur modifient les propriétés d'écoulement. Mais la géométrie même du microcanal imposée par des barrières de cire dans toute l'épaisseur du papier, ou n'importe quelle autre technique de fabrication, peut suffire à favoriser l'imbibition capillaire ou l'étalement de goutte.

### Analyse des effets de la géométrie

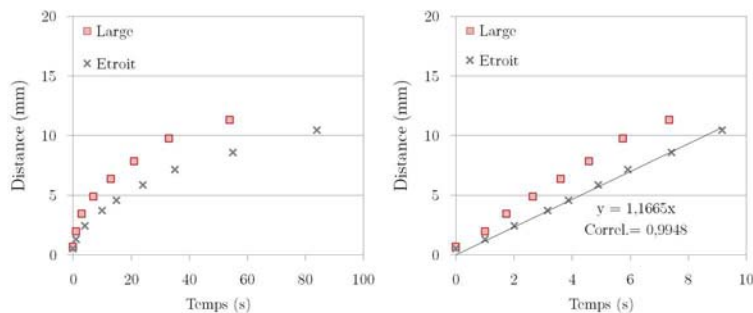
Les expériences précédentes démontrent que dans une géométrie de microcanal droit avec une zone de dépôt circulaire, une goutte de 10  $\mu\text{L}$  est responsable d'un écoulement qui suit bien la loi de Lucas-Washburn. Même sans barrière de surface, l'effet d'étalement de goutte est très peu observé pour ce volume et dans cette géométrie.

Une variation de microcanal est proposée en figure 3.24. Contrairement à la situation précédente, la zone de dépôt de goutte et le microcanal ont des tailles identiques et imposent le même confinement.



**Figure 3.24** – Variations géométriques de microcanaux droits papier.

La dynamique d'écoulement est mesurée dans chacune de ces géométries pour une goutte d'eau de 10  $\mu\text{L}$ . Les graphes représentant l'avancée du front liquide sont présentés en figure 3.25. Dans la configuration de microcanal étroit par rapport à la zone de dépôt de goutte, l'écoulement suit bien la loi de Lucas-Washburn, comme discuté dans les expériences précédentes. Avec un microcanal dont la largeur est identique à la zone de dépôt de goutte, l'écoulement est plus rapide que ce que prévoit la loi de Lucas-Washburn.



**Figure 3.25** – Influence de la géométrie sur l'avancée du front liquide.

Cette déviation au modèle s'explique par un étalement de goutte en surface qui apparaît dans les configurations au moindre confinement géométrique. Le phénomène d'étalement de goutte résulte d'un bilan d'énergie.

Le caractère hydrophile de la cellulose rend les interactions eau-papier favorables à l'étalement de goutte. A l'inverse, la cire hydrophobe s'y oppose. Dans le microcanal étroit, le gain énergétique dû aux interactions eau-papier ne contrebalance pas les effets de la cire. Dans une géométrie plus large, la même quantité de cire est mise en compétition avec une plus grande surface de papier. Le bilan énergétique devient favorable à l'étalement.



### 3.3 Exploitation des propriétés du papier pour concentrer des échantillons

Pour qu'un dispositif de diagnostic rapide soit utile, il faut que le résultat d'analyse soit fiable et que ses performances analytiques approchent celles du laboratoire. Or deux caractéristiques du papier nuisent à la détection : les propriétés optiques du milieu diffusant et la pompe capillaire qui disperse spatialement les analytes. Dans un microtube, un analyte est caractérisé par sa concentration, une valeur globale et homogène sur tout l'échantillon. Dans le cas du papier, si la répartition de l'échantillon n'est pas uniforme sur la surface considérée, on peut parler de concentration locale.

#### 3.3.1 Démonstration d'un concentrateur par rétention spatiale

Alors que la pompe capillaire tend à disperser l'échantillon et donc minimise la concentration locale, des procédés de rétention confinent les analytes sur une surface plus faible, augmentant ainsi la concentration locale.

#### Accumulation d'échantillons dans une microzone

Dans les plaques multipuits, la taille du réservoir est définie par le volume de chaque puits. Dans la version papier, il existe également une taille de réservoir fixée par les paramètres géométriques et la porosité du papier. Mais en plus de l'imbibition dans le milieu poreux, le substrat papier autorise aussi une goutte en surface. Le séchage de cette goutte provoque le dépôt des analytes non volatils qui sont alors stockés dans le papier. Un premier effet concentrateur est obtenu par l'évaporation qui extrait le solvant. Contrairement au cas d'un substrat lisse qui provoque l'effet "tache de café", la rugosité du papier rend le dépôt homogène.

Soit  $V_p$  le volume effectif de chaque zone de papier défini par les dimensions géométriques ( $r$  le rayon et  $e$  l'épaisseur du papier) et la porosité  $\epsilon$ , on a :

$$V_p = \pi r^2 e \epsilon \quad (3.4)$$

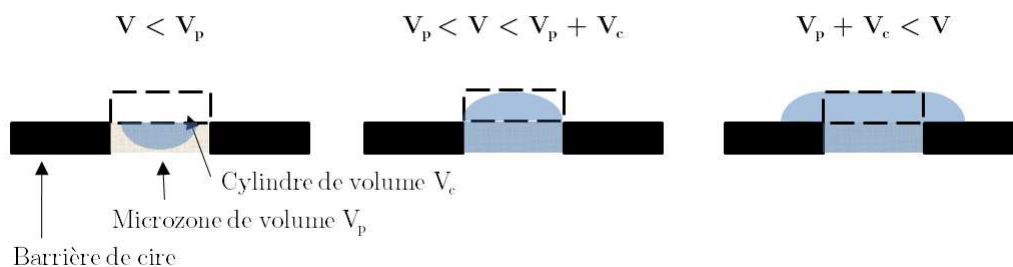
Soit  $V_c$  le volume d'un cylindre de hauteur  $l_c$ , la longueur capillaire, et de même diamètre que la zone de papier.

Comme le montre la figure 3.26, selon le volume  $V$  de la goutte, on a :

- $V < V_p$  : répartition inhomogène de l'échantillon dans la zone de papier,
- $V_p < V < V_p + V_c$  : goutte confinée sur la zone de papier ; le séchage provoque un dépôt homogène des analytes,
- $V_p + V_c < V$  : malgré les interactions hydrophobes entre la cire et le liquide, la goutte repose en partie sur les barrières de cire à cause de la gravité ; par séchage, les analytes sont déposés sur le papier et sur la cire.

Il existe donc une gamme de volumes qui sont favorables au dépôt de gouttes pour la concentration homogène d'analytes dans le papier par séchage. Un deuxième effet concentrateur peut être obtenu en réalisant successivement plusieurs dépôts de liquide sur une même zone de papier.

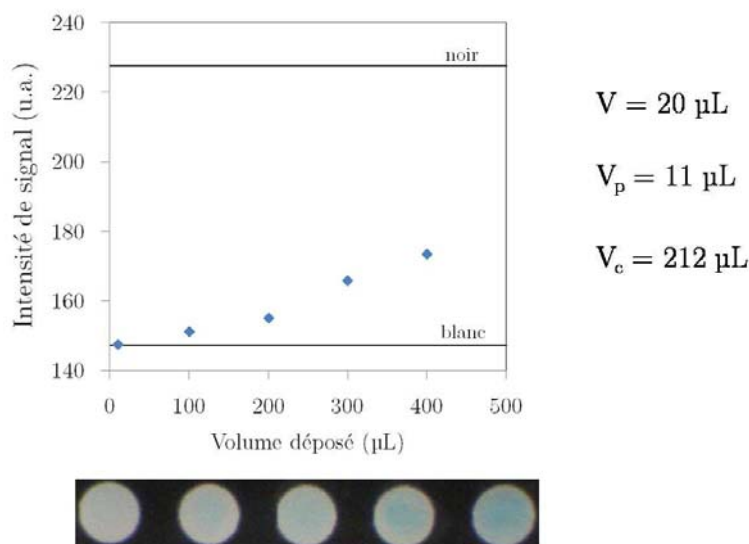
Volume de la goutte :



**Figure 3.26** – Répartition d'une goutte dans une microzone selon leur volume respectif.

Espacés de temps de séchage, les dépôts doivent satisfaire les conditions de volumes décrites précédemment pour un stockage homogène des analytes.

Une illustration de cette fonction de concentrateur dans une zone d'accumulation est présentée en figure 3.27. Chaque zone de diamètre 1 cm d'une plaque multipuits en papier reçoit différentes quantités d'une solution très diluée de bleu de méthylène. Les dépôts sont réalisés par gouttes de 20  $\mu\text{L}$ , espacés par un temps de séchage. Si la coloration de la solution est initialement très faible, l'accumulation des dépôts rend visible le signal.

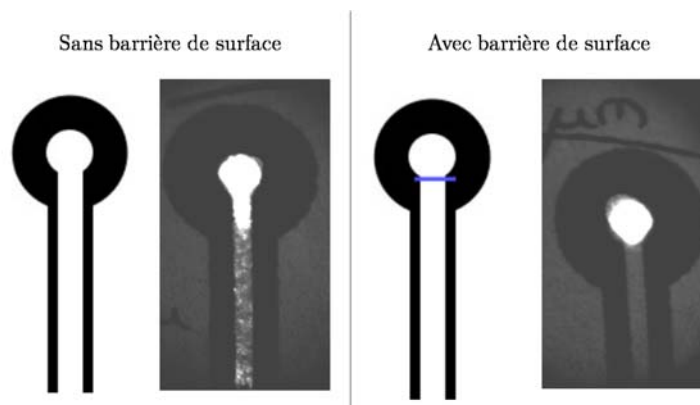


**Figure 3.27** – Accumulation d'analytes par dépôts multiples sur papier.

Mais cette stratégie de concentration présente deux inconvénients. D'une part, les temps de séchage peuvent être très longs et dépendent fortement des conditions extérieures (température et hygrométrie). D'autre part, tous les analytes non volatils sont concentrés sans distinction. Pour des étapes de préparation d'échantillon (voir section 2.2), l'effet concentrateur est souvent combiné ou précédé d'étapes de purification et séparation.

### Effets d'une barrière de surface sur la rétention d'échantillons

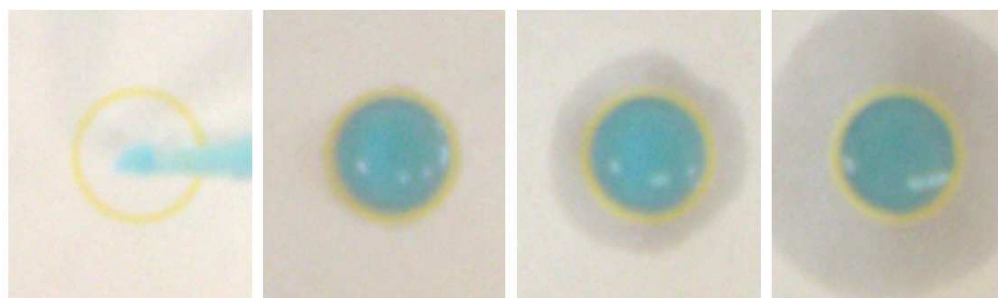
Dans la géométrie d'un microcanal avec barrière de surface, 40  $\mu\text{L}$  d'une solution de microsphères (diamètre 20  $\mu\text{m}$ ) sont déposés. La taille des microsphères plus grande que les pores du papier ne leur permet pas d'être transportées par la pompe capillaire. Dans un microcanal simple, l'étalement de goutte en surface est responsable d'une dispersion spatiale des microsphères alors qu'un même dépôt réalisé avec une barrière de surface les concentre sur la zone de dépôt de goutte (figure 3.28). La barrière de surface permet de mieux exploiter la fonction filtrante du papier.



**Figure 3.28** – Position des microsphères dans un microcanal papier sans/avec une barrière de surface.

Le papier est aussi connu comme dispositif chromatographique. Les différents composés d'un mélange présentent des affinités différentes avec le support, ce qui modifie leur vitesse d'écoulement. Les interactions ioniques entre la cellulose et le bleu de méthylène font que ce colorant s'adsorbe de manière quasi-irréversible.

Dans la géométrie des anneaux (diamètre 1 cm, couleur jaune 30%, largeur 0.3 mm), 40  $\mu\text{L}$  d'une solution de bleu de méthylène sont déposés. Les différentes étapes de l'expérience sont illustrées en figure 3.29. Le caractère hydrophobe de la cire empêche totalement l'étalement de la goutte. Comme la barrière n'atteint pas toute l'épaisseur du papier, il existe une trajectoire dans le milieu poreux qui relie l'intérieur de l'anneau à l'extérieur. Un écoulement d'imbibition capillaire a bien lieu dans le papier, depuis la zone de dépôt de goutte.

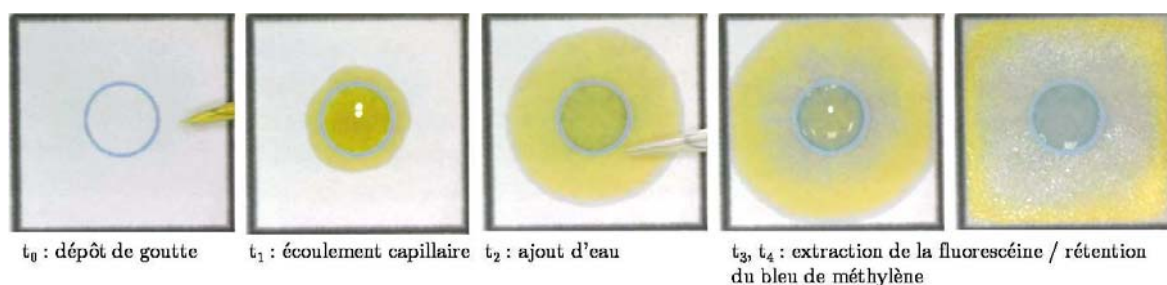


$t_0$  : dépôt de goutte     $t_1$  : pas d'étalement     $t_2, t_3$  : écoulement par imbibition capillaire

**Figure 3.29** – Dépôt d'une goutte sur papier avec barrière de surface.

La barrière de surface supprime complètement les écoulements en surface du papier au profit de ceux dans le milieu poreux. Cette fonction peut être utilisée pour mieux contraindre le liquide à interagir avec le substrat. L'intérieur de l'anneau constitue une zone d'accumulation pour un analyte s'il n'est pas transporté par la pompe capillaire (rétention chimique ou stérique).

Cette expérience est réalisée avec une solution contenant un mélange de bleu de méthylène et de fluorescéine (voir figure 3.30). Ces deux colorants ont des comportements chromatographiques très différents avec la cellulose : le premier est fortement retenu alors que le deuxième est bien transporté par l'écoulement. Des ajouts successifs d'eau continuent le transport de la fluorescéine hors de l'anneau alors que le bleu de méthylène reste confiné dans la zone de dépôt. Comme dans les situations précédentes, la barrière de surface améliore la séparation des composés en favorisant les interactions liquide-papier.



**Figure 3.30** – Séparation chromatographique d'un mélange fluorescéine-bleu de méthylène par une barrière de surface.

La barrière de surface favorise une double extraction de solvant : par évaporation et par la pompe capillaire qui transporte le solvant hors de la zone de dépôt. Ce deuxième élément amène une fonction de séparation entre les éléments bien transportés par l'écoulement et ceux retenus par le papier. De plus, les dépôts multiples dans les procédés d'accumulation sont alors séparés d'un temps de séchage qui est plus rapide : la pompe capillaire répartit le solvant sur une plus grande surface qui présente de grandes interfaces liquide-air, contrairement à la calotte sphérique. Expérimentalement, dans les mêmes conditions, des dépôts de 50  $\mu\text{L}$  d'eau dans des zones de papier de diamètre 1 cm type plaque multipuits ou barrière de surface, s'évaporent en, respectivement, 15 min et 2 min. Bien que plus rapide avec les barrières de surface, ce procédé d'accumulation repose toujours sur l'évaporation qui dépend des conditions extérieures.

### Mesure des temps de séchage sur papier

Le temps de séchage est défini comme la durée nécessaire, après dépôt d'une goutte d'eau, pour que la couleur de la zone de papier redevienne identique à celle d'un morceau de papier sec. Les temps de séchage dans différentes conditions hygrométriques, à température ambiante ( $T_{amb} = 25^\circ\text{C}$ ), sont donnés en fonction du volume de la goutte d'eau déposée dans le micro-canal papier (figure 3.31). Dans des conditions sèches (humidité  $< 50\%$ ), le temps de séchage croît linéairement avec le volume de liquide. Aux atmosphères plus humides (humidité  $> 50\%$ ), la dépendance temps de séchage - volume de liquide est exponentielle. Cette forte variation des temps de séchage selon les conditions extérieures peut rendre inutilisable les procédés de concentration par accumulation.

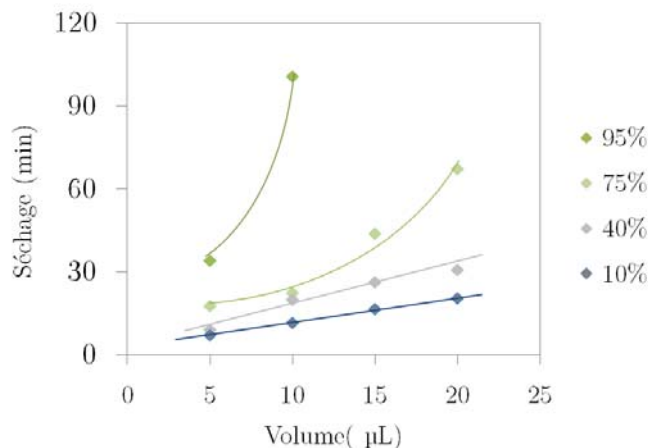


Figure 3.31 – Temps de séchage selon le volume de liquide et l'hygrométrie ambiante.

La même expérience est réalisée avec le dispositif chauffant, à hygrométrie ambiante fixe (40%). A température fixée, le temps de séchage croît linéairement avec le volume de liquide, comme le montre la figure 3.32. En augmentant la tension appliquée aux bornes du dispositif, la température locale augmente et le séchage est plus rapide. Avec seulement une tension de 3,5V et dans des conditions de fort taux d'humidité, le gain en temps de séchage peut atteindre un facteur 10.

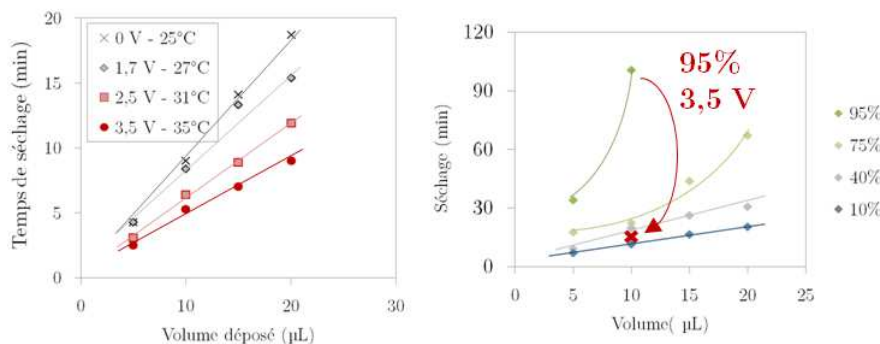


Figure 3.32 – Temps de séchage selon le volume de liquide et la température locale.

En remplaçant le générateur de tension par une pile 9V, le dispositif chauffant devient complètement portable, intégré à la puce papier avec une faible instrumentation. Cela rend concrètement possible d'exploiter les phénomènes d'évaporation dans la microfluidique papier.

### 3.3.2 Concentration par focalisation hydrodynamique

A l'inverse des procédés de concentration par rétention, la focalisation hydrodynamique consiste à transporter les analytes jusqu'à une zone d'accumulation. Alors que la pompe capillaire tend à disperser spatialement les analytes, une géométrie adaptée couplée à l'évaporation assure une re-concentration.

### Analogie avec la pervaporation microfluidique

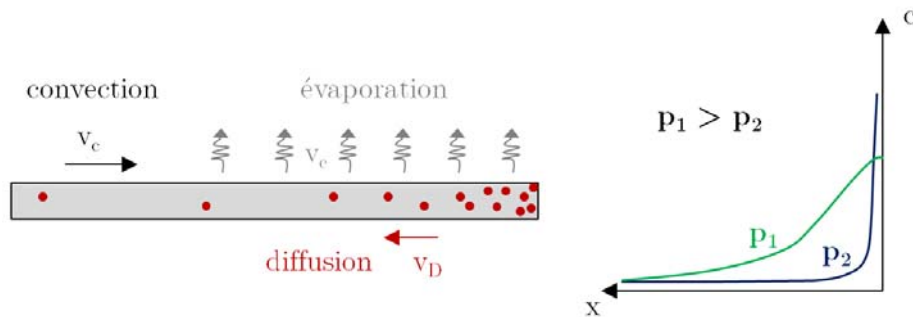
Dans la référence [21], la concentration d'analytes, dans un microcanal droit, par pervaporation de solvant, est caractérisée par l'équation suivante :

$$c(x, t) \simeq c_0 v_0 t \sqrt{\frac{2}{\pi p^2}} \exp\left(-\frac{x^2}{2p^2}\right) + c_0 R(x) \quad (3.5)$$

Avec  $c_0$  la concentration initiale en analytes, injectée à une vitesse  $v_0$  et  $R(x) \simeq L/x$  lorsque  $p \ll x \ll L$ . Le paramètre  $p$  décrit la taille de la zone d'accumulation en comparant la diffusion à l'écoulement convectif dû à la pervaporation (équation 3.6).

$$p = \sqrt{\frac{Dh}{v_e}} \quad (3.6)$$

Dans ces conditions, l'effet de concentrateur atteint une amplitude maximale et une largeur minimale lorsque  $p$  reste faible, c'est-à-dire lorsqu'une forte pervaporation génère un écoulement rapide. Un microcanal long permet la pervaporation sur une plus grande distance, favorisant ainsi l'écoulement convectif et une bonne concentration des analytes. La figure 3.33 présente un schéma rassemblant les principes physiques en compétition.

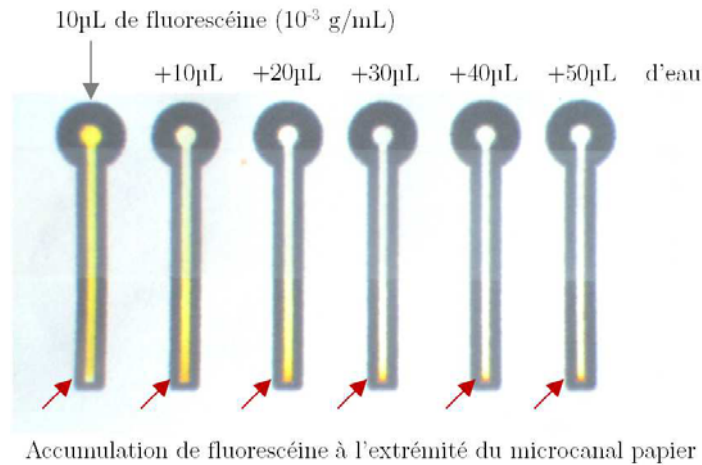


**Figure 3.33** – Distribution de la concentration en analytes dans une configuration de pervaporation microfluidique, selon la valeur du facteur  $p$ .

Sur papier, la situation est très similaire. Les barrières de cire définissent une géométrie de microcanal droit. La pompe capillaire remplit initialement le microcanal, puis l'évaporation assure un écoulement convectif depuis un réservoir liquide d'entrée (une goutte d'eau).

Une première expérience colorimétrique permet de visualiser le concept de focalisation hydrodynamique sur papier. Dans un microcanal droit, une goutte de  $10 \mu\text{L}$  d'une solution de fluorescéine ( $c = 10^{-3} \text{g/mL}$ ) est déposée. La pompe capillaire répartit le colorant jaune dans tout le canal. Après séchage de ce premier dépôt,  $10 \mu\text{L}$  d'eau sont ajoutés. La fluorescéine est alors à nouveau dissoute dans l'eau et transportée plus loin dans le microcanal papier par la pompe capillaire. Après séchage, l'opération d'ajout d'eau est répétée 4 fois. A chaque fois, l'eau transporte plus loin la fluorescéine qui s'accumule alors à l'extrémité du microcanal papier.

Visuellement, l'accumulation de fluorescéine en un point de focalisation rend rouge le dépôt initialement jaune pendant que le microcanal redevient blanc et ne contient plus d'analytes (figure 3.34).

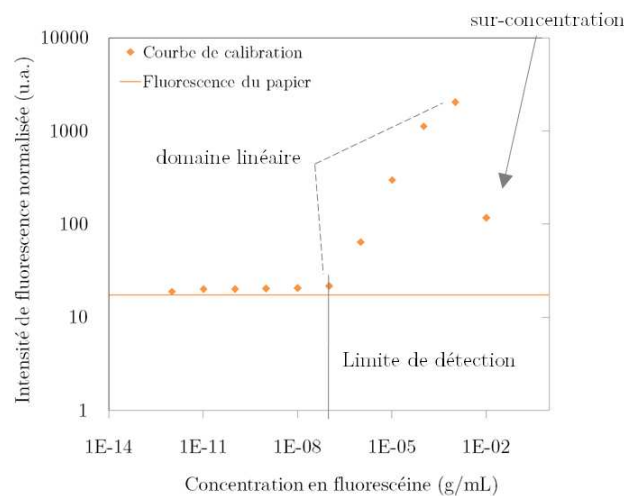


**Figure 3.34** – Accumulation de fluorescéine à l'extrémité du microcanal après plusieurs ajouts d'eau.

### Mesure des performances d'amplification de signal

Des mesures quantitatives de cette focalisation hydrodynamique sont réalisées en fluorescence. Des solutions de fluorescéine sur une vaste gamme de concentrations (de  $10^{-12}$  à  $10^{-1}$  g/mL) sont mesurées en exploitant la linéarité du temps d'exposition de la caméra pour normaliser les données.

**Etablissement de la courbe de calibration en fluorescence** La calibration du dispositif avant la focalisation hydrodynamique consiste à évaluer l'intensité du signal de fluorescence pour chaque concentration de fluorescéine. Pour cela, des dépôts de  $5 \mu\text{L}$  de chaque solution de fluorescéine sont réalisés dans une plaque multipuits version papier. Chaque zone est mesurée après séchage du dépôt. La courbe de calibration est présentée en figure 3.35.



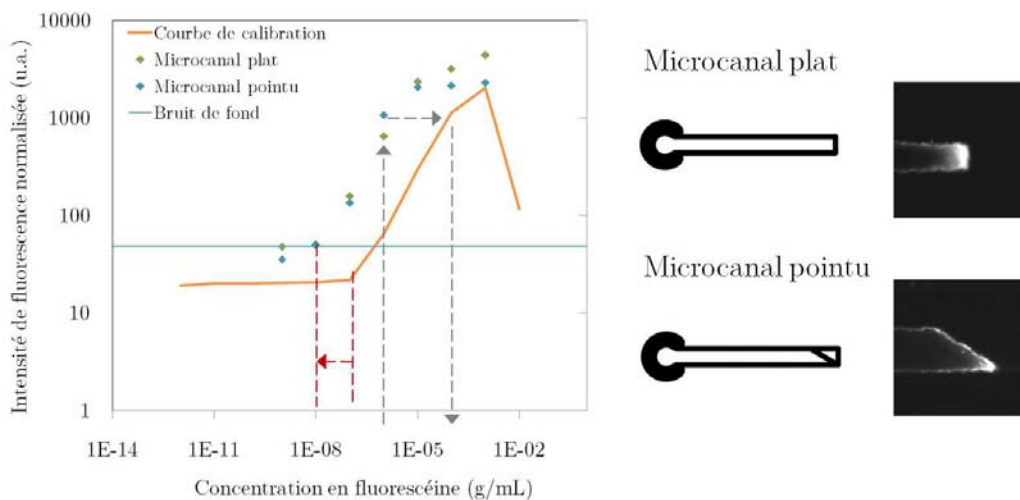
**Figure 3.35** – Courbe de calibration de l'intensité de fluorescence sur papier en fonction de la concentration.

L'intensité de signal des faibles concentrations est dominée par la fluorescence intrinsèque du substrat papier. Aux fortes concentrations, il apparaît un phénomène de blanchiment, la fluorescéine perd ses propriétés de fluorescence. Entre ces deux régimes, un domaine linéaire relie intensité de fluorescence et concentrations en fluorescéine (de  $10^{-7}$  à  $10^{-3}$ g/mL).

Dans cette calibration, il faut s'assurer qu'il n'y ait aucun effet d'accumulation : le volume de la goutte est suffisamment petit devant la zone de dépôt. Les mêmes mesures sont réalisées avec des dépôts de 3  $\mu$ L et donnent la même courbe de calibration.

**Amplification de signal selon la géométrie** Les mesures d'amplification par focalisation spatiale sont réalisées en déposant 5  $\mu$ L de chaque solution de fluorescéine dans une géométrie de canal droit, suivi de 5 ajouts de 10  $\mu$ L d'eau espacés de temps de séchage. L'extrémité du microcanal papier est observée en fluorescence, la valeur maximale est reportée sur la courbe reliant intensité et concentration initiale en fluorescéine.

Deux géométries sont comparées : des microcanaux papier dont l'extrémité est plate ou pointue. Comme le montre la figure 3.36, dans les deux cas, l'amplification est la même : le domaine linéaire de la courbe de calibration est déplacé d'un facteur 100 vers les plus basses concentrations. Par exemple, une solution de fluorescéine initialement concentrée à  $10^{-6}$ g/mL émet, après focalisation, un signal équivalent à une solution concentrée à  $10^{-4}$ g/mL non focalisée (flèches pointillées grises).



**Figure 3.36** – Courbe d'amplification de signal dans les géométries de microcanaux droits à extrémité plate ou pointue.

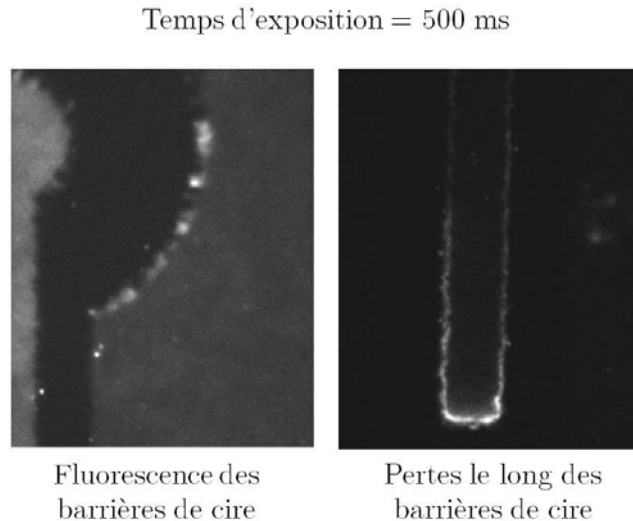
L'origine du facteur 100 s'explique par un simple argument géométrique. Sur les plaques multipuits papier (diamètre 1cm), 5  $\mu$ L de fluorescéine se répartissent sur une surface  $s_1 = \pi r^2 = 80 \text{ mm}^2$ . La focalisation à l'extrémité du microcanal concentre le même échantillon sur une surface  $s_2 = 1 \text{ mm}^2$ . On a :  $\frac{s_1}{s_2} \sim 80$ .

La géométrie de pointe a été pensée pour augmenter l'effet de focalisation et obtenir un point d'accumulation plus petit. La courbe d'amplification ne montre pourtant pas de différence avec le microcanal simple. Sur les images en fluorescence, des quantités significatives de fluorescéine accumulées le long des barrières de cire, n'atteignent pas l'extrémité de la pointe. Ces pertes



ne participent donc pas à l'amplification du signal local.

Le facteur 100 d'amplification n'est pas retrouvé dans la limite de détection sur papier : initialement à  $10^{-7}$ g/mL, elle n'est déplacée que d'un facteur 10 soit  $10^{-8}$ g/mL (flèches pointillées rouges). Ceci est dû à l'augmentation du bruit de fond dû aux barrières de cire. On a vu dans la section 3.1 que les impressions noires sont obtenues par dépôts de toutes les cires de l'imprimante, dont la cire jaune très fluorescente. Si la barrière noire est globalement non fluorescente, il apparaît, aux temps d'exposition longs, sur les bords, de légers points fluorescents comme le montre la figure 3.37.

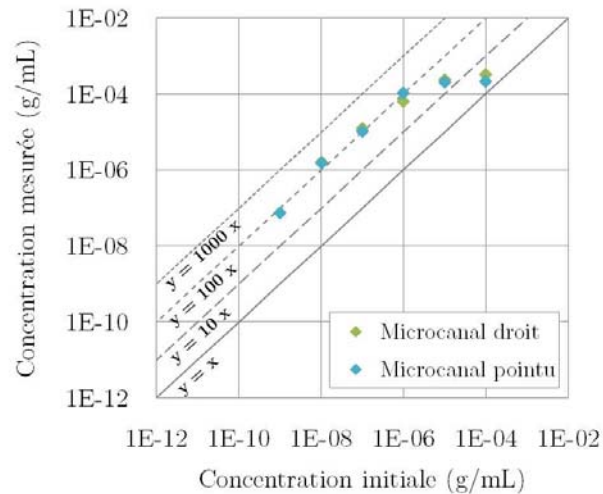


**Figure 3.37** – Aux temps d'exposition longs, observation en fluorescence du signal dû à la cire et des pertes le long des barrières.

Si la pompe capillaire transporte bien la fluorescéine dans le microcanal papier, les bords de cire rugueux provoquent des dépôts tout le long des barrières de cire (voir figure 3.37). Ces pertes nuisent à la détection d'échantillons très dilués. La réduction de la longueur du microcanal limite cet effet mais nuit au bon transport et à l'évaporation. En effet, dans un cas extrême, un microcanal de longueur nulle est une zone de dépôt simple. Les gouttes d'abord de fluorescéine, puis d'eau, ne sont plus transportées par la pompe capillaire et sèchent très lentement. Il ne s'agit alors plus de focalisation spatiale mais de rétention comme décrit dans la sous-section 3.3.1.

Une autre façon de représenter le gain d'amplification consiste à utiliser la partie linéaire de la courbe de calibration. Sans focalisation hydrodynamique, concentration en fluorescéine et intensité de fluorescence sont liées par la relation  $I = 10^7c + 20$  déterminée expérimentalement. Après focalisation hydrodynamique, on peut donc comparer la concentration initiale de la solution de fluorescéine déposée avec la concentration déduite de la mesure d'intensité et de la courbe de calibration. La répartition de nos résultats expérimentaux sur le graphique représentant la concentration mesurée en fonction de la concentration initiale, est présentée en figure 3.38.

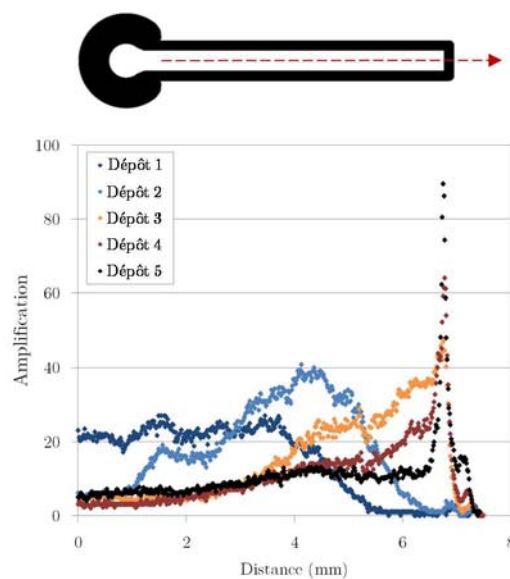
Avec les géométries de microcanaux droit et pointu, on retrouve le facteur 100 d'amplification avec des résultats expérimentaux s'approchant de la droite  $y = 100x$  dans le domaine linéaire.



**Figure 3.38** – Mesure de l'effet de concentration par focalisation hydrodynamique dans des géométries de type microcanal droit ou pointu.

La figure 3.39 montre l'évolution des profils d'intensité de fluorescence au cours du temps, le long d'un microcanal droit. Les ajouts d'eau contribuent à rendre plus étroit et plus intense le dépôt de fluorescéine.

Les procédés de concentration décrits précédemment permettent une focalisation spatiale de l'échantillon dans le plan de la feuille de papier. Cela contribue à contrôler la pompe capillaire, responsable au contraire d'une dispersion et de faibles concentrations locales. L'analyse de la diffusion de la cire dans l'épaisseur du papier réalisée en section 3.2.1 autorise une exploration des possibilités de focalisation dans la troisième dimension du papier.

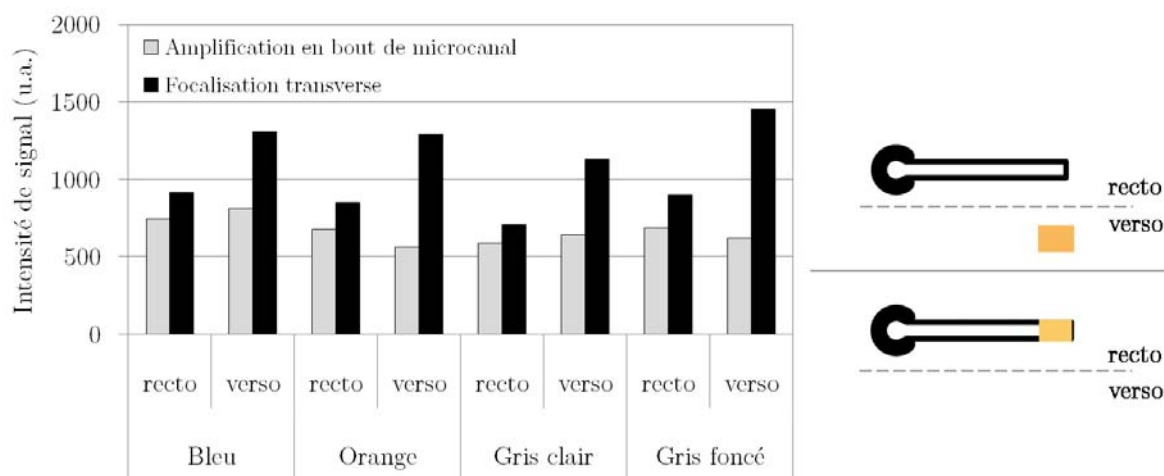


**Figure 3.39** – Evolution temporelle des profils d'intensité en fluorescence le long d'un microcanal droit.

### Concentration transversale dans l'épaisseur du papier

Une focalisation de l'échantillon dans l'épaisseur du papier aurait une double contribution. D'une part, l'argument géométrique, comme dans le plan de la feuille, consiste à concentrer le même échantillon dans un volume encore plus petit. D'autre part, les propriétés optiques diffusantes du papier rendent inaccessible à la détection un signal trop profond : amener l'échantillon près de la surface doit contribuer plus fortement au signal total.

Le procédé de focalisation spatiale est réalisé dans un microcanal papier droit dont l'extrémité est constituée d'une restriction colorée : région de cire d'une teinte claire. La couleur de la cire, la teinte et la taille peuvent être variées pour moduler la pénétration de la cire dans l'épaisseur du papier. Cette région de cire peut être imprimée du même côté que les barrières noires du microcanal (configuration recto) ou de l'autre côté de la feuille de papier (configuration verso).



**Figure 3.40** – Amplification de signal par focalisation selon la couleur et la longueur de la restriction colorée.

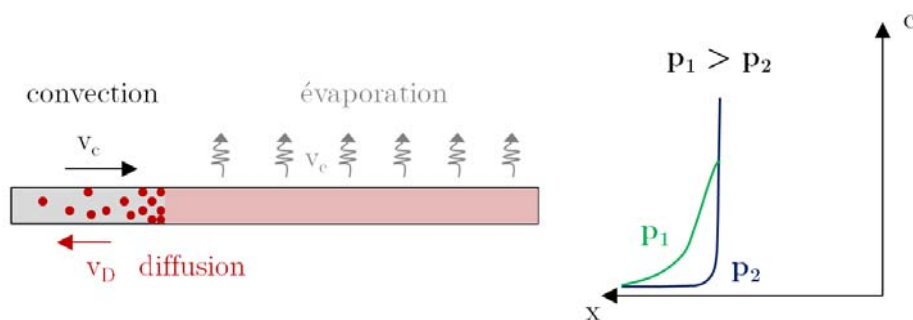
L'amplification de signal pour une solution de fluorescéine donnée ( $c = 10^{-5}$ g/mL), dans une restriction colorée, est illustrée en figure 3.40. Comparées à une situation sans focalisation transverse, les restrictions imprimées sur le recto n'apportent pas de gain significatif. L'impression de restrictions sur le verso semble mieux réaliser la fonction de focalisation transverse : notamment pour les teintes bleues et gris foncé, le signal peut doubler par rapport à une focalisation simple. Cependant, cette amplification n'est pas robuste et reproductible. Des comportements très différents sont observés sur chaque barrière selon sa longueur et sa couleur.

Cette expérience démontre qu'une focalisation transverse dans un microcanal est possible mais sujette à fluctuations selon la diffusion de la cire et l'adsorption non spécifique de fluorescéine le long de la restriction. Le faible facteur d'amplification ( $\times 2$ ) n'est pas suffisant pour apporter une contribution valable.

### 3.3.3 Optimisation de la focalisation hydrodynamique par rétention chromatographique

La théorie de la pervaporation microfluidique montre qu'il faut privilégier l'écoulement convectif et l'évaporation pour maximiser l'effet de concentration. Dans la configuration papier dépourvue d'équipements externes, la longueur du microcanal est le principal paramètre assurant cette fonction. Mais l'adsorption non spécifique d'analytes le long des barrières de cire nuit à la bonne focalisation hydrodynamique.

Une stratégie d'optimisation d'un concentrateur sur papier consiste à permettre une focalisation hydrodynamique proche de la zone de dépôt (pour limiter les pertes) tout en gardant une pompe convective (capillaire et évaporation) forte. Pour cela, l'état de surface du papier est modifié localement pour passer d'une situation de transport chromatographique à une configuration de rétention pour l'analyte d'intérêt (figure 3.41).



**Figure 3.41** – Distribution de la concentration en analytes dans une configuration de focalisation hydrodynamique sur papier avec traitement de surface.

#### Effets d'un traitement local par le polymère PAH

La modification chimique du papier est réalisée par un dépôt local d'une solution polymère de PAH. Ce polyélectrolyte chargé positivement par une fonction amine interagit avec les fonctions négatives de la fluorescéine (alcool et acide carboxylique). L'affinité ionique de ces deux espèces provoque l'adsorption de fluorescéine sur le polymère, lui-même adsorbé sur les fibres du papier.

Pour illustrer cette fonction, un dépôt local de 2  $\mu\text{L}$  d'une solution de PAH à 2% est réalisé au milieu d'un microcanal droit papier. Après séchage du polymère sur le papier, une goutte de 10  $\mu\text{L}$  de fluorescéine ( $c = 10^{-3}\text{g/mL}$ ) est déposée à l'entrée du microcanal papier. Comme dans le cas de la focalisation spatiale simple, plusieurs ajouts d'eau successifs assurent le transport de la fluorescéine.

Le dépôt initial jaune de fluorescéine ne s'accumule plus à l'extrémité du microcanal mais au tout début du traitement PAH (figure 3.42). Cependant l'eau peut s'écouler dans le papier avec ou sans le traitement PAH. Il s'agit donc bien d'une situation dans laquelle la fluorescéine est d'abord transportée par l'écoulement puis accumulée par adsorption sur le milieu poreux. L'eau est extraite par évaporation et par la pompe capillaire au-delà de la zone de concentration.

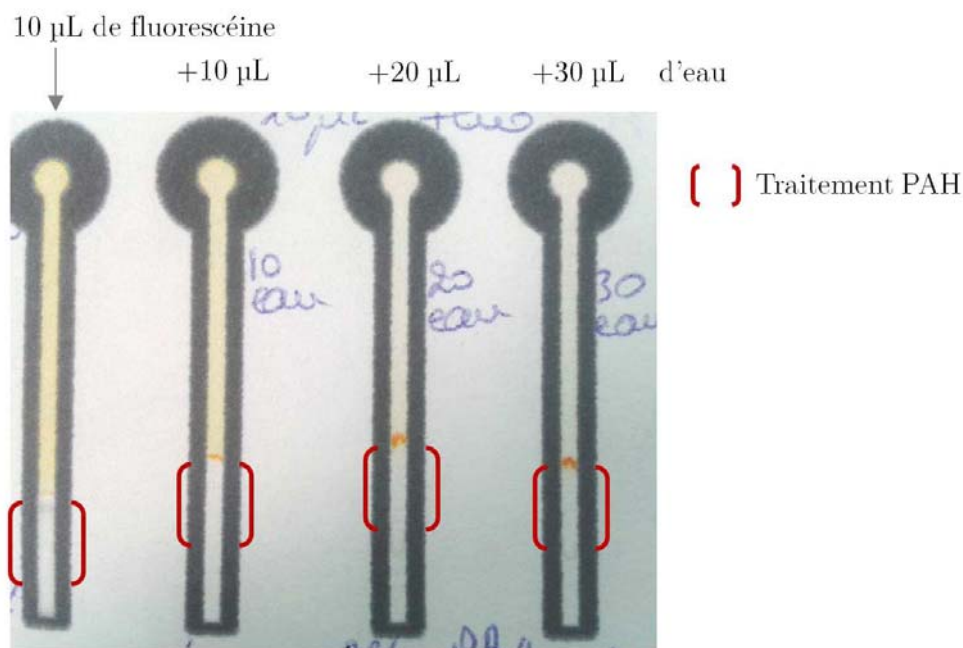


Figure 3.42 – Accumulation de fluorescéine sur le traitement PAH.

### Focalisation hydrodynamique dans une géométrie de type buse

Une géométrie en forme de buse est proposée en figure 3.43 pour bénéficier d'une petite zone de focalisation et d'une forte extraction de solvant. Elle consiste en une zone de dépôt de goutte suivie d'un microcanal droit court ouvert. L'ouverture, en forme de restriction, correspond à la limite du traitement PAH. En sortie de microcanal, les barrières en cire délimitent un large espace assurant une forte extraction de solvant par la pompe capillaire.

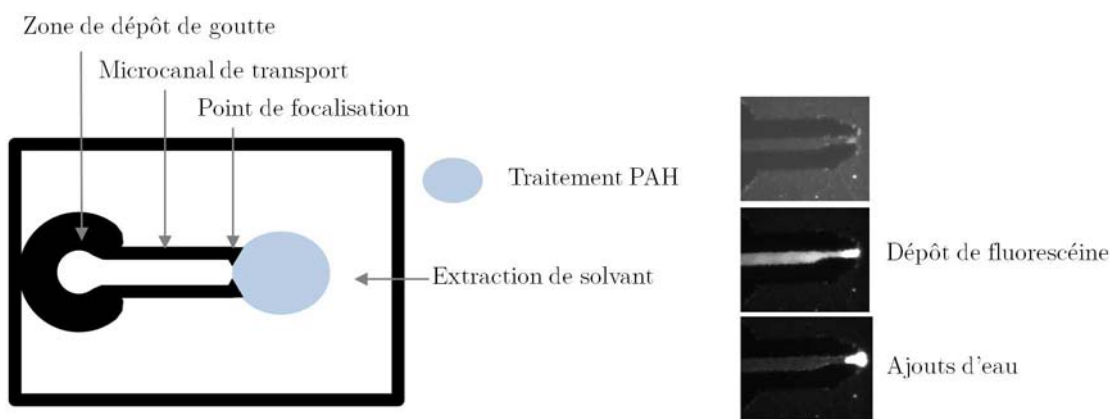


Figure 3.43 – Géométrie hybride pour la focalisation de fluorescéine.

Dans cette configuration, les pertes sur les bords sont minimisées avec un microcanal papier de longueur 1 cm. La courbe d'amplification est réalisée dans cette géométrie, suivant le même protocole que dans le microcanal droit, et est présentée en figure 3.44. Les trois domaines caractéristiques de la calibration (limite de détection - régime linéaire - saturation/sur-concentration) sont observés mais déplacés vers les plus basses concentrations. Que ce soit en termes d'intensité

de signal (flèches pointillées grises) ou de limite de détection (flèches pointillées rouges), le facteur d'amplification obtenu est de 1000 malgré un niveau de bruit dû à la cire et au traitement PAH plus important.

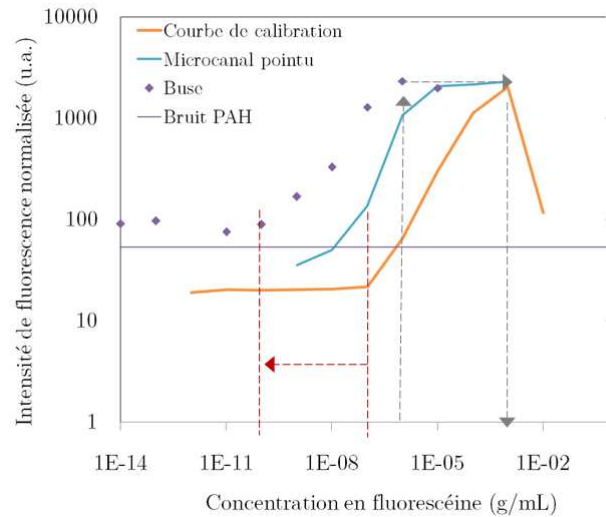


Figure 3.44 – Courbe d'amplification de signal dans la géométrie de buse.

De manière similaire, dans la représentation graphique de la concentration mesurée après focalisation hydrodynamique dans une buse en fonction de la concentration initiale, les points expérimentaux sont rassemblés autour de la droite  $y = 1000x$  pour le domaine linéaire (figure 3.45).

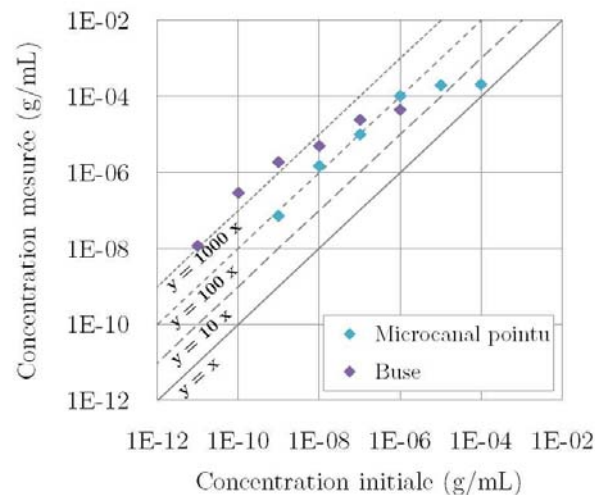


Figure 3.45 – Mesure de l'effet de concentration par focalisation hydrodynamique dans une géométrie de type buse.

## 3.4 Ce qu'il faut retenir

**Diffusion de la cire** L'impression et la diffusion de cire sur le papier permettent la création de motifs hydrophobes. L'imprimante à jet d'encre dépose un format de gouttes de cire toujours identique. Mais la densité de ces gouttes dépend directement de la teinte claire ou foncée choisie pour le motif.

L'alignement des fibres de cellulose le long de la feuille de papier donne une direction préférentielle de diffusion de la cire : plus rapide dans le plan de la feuille que dans l'épaisseur. Pour de faibles densités de gouttes et/ou dans le cas de motifs très fins, la quantité de cire n'est pas suffisante pour créer une barrière hydrophobe dans toute l'épaisseur du papier. Le motif est alors une barrière en surface du papier.

**Écoulements dans le papier** Les écoulements dans le papier sont régis par deux principaux phénomènes : l'imbibition capillaire suivant le modèle de Lucas-Washburn et l'étalement de goutte en surface.

L'écoulement de microsphères plus grandes que la taille de pores du papier a mis en évidence l'étalement de goutte en surface. La longueur d'étalement dépend linéairement du volume de la goutte déposée. La contribution de l'étalement en surface peut également être révélée par la mesure de la vitesse moyenne d'écoulement. Dans le cas d'imbibition pure, cette vitesse ne dépend pas du volume de la goutte. Avec étalement en surface, cette vitesse moyenne augmente linéairement avec le volume de la goutte.

L'étalement en surface peut être supprimé au profit de l'imbibition capillaire pure par une barrière hydrophobe en surface. Le milieu poreux sous la barrière rend possible l'imbibition. La géométrie même du microcanal et de sa zone de dépôt de goutte peut favoriser ou inhiber complètement l'étalement de goutte selon l'énergie de déformation nécessaire.

**Procédés de concentration** En autorisant l'évaporation, le papier devient un dispositif de concentration et de stockage d'échantillons non volatils. Selon la géométrie des barrières de cire, plusieurs configurations ont été étudiées et sont résumées en figure 3.46.

Sans barrière, l'étalement de goutte en surface du papier est responsable d'un écoulement rapide. Cette dispersion de liquide favorise également un séchage rapide. L'étalement en surface ne permet aucun effet de séparation (stérique, chromatographique, bio-chimique) et donc pas d'amplification de signal.

La présence d'une barrière de cire en surface du papier, délimitant une zone de dépôt de goutte supprime l'étalement en surface. L'écoulement par imbibition capillaire est plus lent mais réalise la fonction d'extraction de solvant sur de grandes surfaces. Le séchage est donc rapide. L'absence d'étalement en surface favorise les interactions entre le liquide et les surfaces du milieu poreux. La fonction de séparation par le papier peut donc être exploitée. En revanche, il est difficile de miniaturiser à l'extrême la zone de dépôt de goutte sans risquer des débordements ou des dépôts non spécifiques sur la cire. La notion d'amplification atteint au mieux un facteur  $\times 2$  mais l'accumulation de plusieurs dépôts contribue à améliorer ce résultat.

Une barrière de cire dans toute l'épaisseur sous forme de zone de dépôt de goutte ne permet aucun écoulement. Il n'y a donc qu'évaporation du solvant sans autre possibilité de séparation

	Sans Barrières	Avec Barrières				
		En surface	Microzone	Microcanal	Transverse	Hybride rétention/transport
Ecoulement	rapide	lent	nul	rapide	rapide	rapide
Evaporation	rapide	rapide	lente	rapide	rapide	rapide
Séparation	faible	élevée	aucune	faible	faible	élevée
Amplification	$\phi$	x2	x2	x10 ; x100	X2	X1000

Par rapport à la référence sans barrières

**Figure 3.46** – Comparaison des différentes configurations de concentrations.

des constituants. L'amplification est la même que dans le cas de la barrière de surface mais l'évaporation y est beaucoup plus lente.

Une focalisation hydrodynamique est réalisée avec des barrières de cire dans toute l'épaisseur sous forme d'un microcanal. L'écoulement et le séchage rapides concentrent l'échantillon dans une petite zone de focalisation. L'amplification peut atteindre des facteurs entre  $\times 10$  et  $\times 100$ . Tous les éléments non retenus par le papier sont concentrés sans distinction. L'exploration de l'épaisseur du papier pour une focalisation transverse n'a pas apporté de gain significatif meilleur qu'un facteur  $\times 2$ .

Dans une configuration hybride, l'état de surface du papier est traité pour permettre localement la rétention d'éléments transportés. Là encore, la pompe capillaire est pleinement exploitée pour extraire le solvant et sécher rapidement les dépôts. Selon les propriétés d'états de surface, les possibilités de séparations sont plus élevées. L'amplification atteint une valeur record d'un facteur 1000.





---

 Microsystèmes pour l'éluion d'échantillons séchés sur papier
 

---

**Table des matières**


---

4.1	Conditions expérimentales . . . . .	<b>105</b>
4.1.1	Fabrication des microsystèmes hybrides . . . . .	105
	Puces microfluidiques . . . . .	105
	Jonction papier-microcanal . . . . .	107
4.1.2	Nature des échantillons séchés sur papier . . . . .	108
4.1.3	Dispositifs de mesures de l'éluion . . . . .	108
	Contrôle des écoulements . . . . .	108
	Mesures de fluorescence . . . . .	108
	Analyse élémentaire . . . . .	109
	Analyse de composés biologiques . . . . .	111
4.2	Etude des écoulements dans les microsystèmes hybrides avec bandelette de papier . . . . .	<b>111</b>
4.2.1	Configuration d'écoulements monophasiques . . . . .	111
	Observation de l'éluion d'échantillons séchés . . . . .	111
	Mesure des vitesses d'écoulement . . . . .	112
4.2.2	Influence du papier sur les écoulements diphasiques . . . . .	113
	Segmentation de l'échantillon élué en gouttes . . . . .	113
	Etablissement des diagrammes de phases . . . . .	114
4.2.3	Limites du dispositif . . . . .	116
4.3	Analyse quantitative de l'éluion en microcanaux à partir de disques de papier	<b>117</b>
4.3.1	Mesures de fluorescence . . . . .	117
	Etablissement des courbes d'éluion . . . . .	117
	Profils d'éluion dans les microcanaux . . . . .	119
4.3.2	Analyse de composés élémentaires . . . . .	119
	Eluion de solutions de fer séchées . . . . .	119
	Eluion d'un mélange de composés . . . . .	122

4.3.3	Application à l'élution de la $\beta$ -hCG . . . . .	126
	Paramètres d'intérêt . . . . .	126
	Diagramme de performances . . . . .	127
4.4	Ce qu'il faut retenir . . . . .	<b>128</b>

---

LES dispositifs de diagnostic au chevet du patient sont développés de manière très indépendante vis à vis des techniques de laboratoire. Pourtant, un résultat d'analyse déclenche un ensemble de prises de décisions médicales qui, par la suite, sont nécessairement liées aux techniques standardisées des laboratoires. Dans l'objectif d'une meilleure continuité entre le dispositif instantané de terrain et les protocoles d'analyse, le papier peut être utilisé comme support de transport d'échantillon, comme dans le cas du prélèvement sanguin séché du nourrisson.

La continuité entre les analyses de routine et les échantillons séchés sur papier repose sur une bonne élution de ce dernier. Pour cela, des puces microfluidiques hybrides sont fabriquées et présentent des interfaces papier-microcanaux. Les écoulements dans ces dispositifs sont étudiés pour caractériser l'élution de différents composés et la bonne compatibilité du papier avec des fonctions microfluidiques.

La réalisation de microsystèmes hybrides papier-PDMS pour l'élution d'échantillons séchés a fait l'objet d'un dépôt de brevet : n° FR136086 - déposé le 8 novembre 2013 et extension à l'international le 6 novembre 2014.

Les expériences et résultats de ce chapitre concernant le format bandelette de papier ont été réalisés en collaboration avec Paul Le Floch, en stage au laboratoire. Le matériel Agilent du plateau technologique de l'Institut Pierre-Gilles de Gennes pour la microfluidique (IPGG) a été utilisé pour l'analyse élémentaire des métaux et minéraux grâce à l'expertise de Géromine Ber, ingénieur IPGG et Agilent. Les immunoessais pour quantifier la protéine  $\beta$ -hCG ont été réalisés par les équipes de Jean Guibourdenche à l'hôpital Cochin (Physiopathologie et pharmacotoxicologie placentaire humaine), dans le cadre de la Fondation PremUp.

## 4.1 Conditions expérimentales

Les microsystèmes hybrides consistent à relier les dispositifs papier avec les puces microfluidiques. Alors que le papier bénéficie d'une pompe capillaire, il faut un contrôle en pression ou en débit pour obtenir des écoulements dans les microcanaux. Des composés séchés dans le papier sont élués dans la puce microfluidique par l'écoulement. L'élution est quantifiée par trois techniques : des mesures en fluorescence, l'analyse de composés élémentaires et la détection de composés biologiques.

### 4.1.1 Fabrication des microsystèmes hybrides

#### Puces microfluidiques

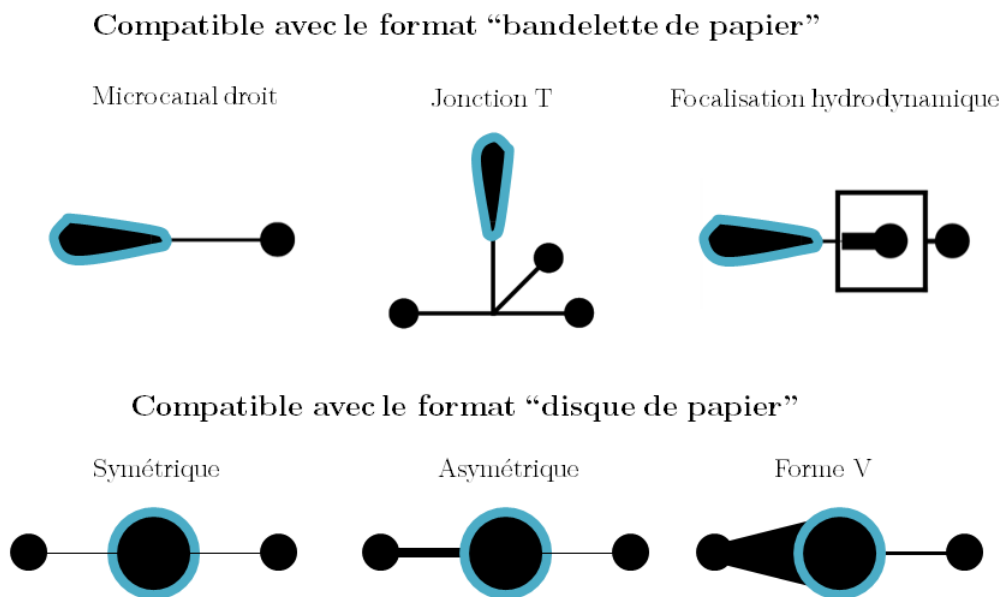
**Photolithographie et technologie polymère** Les puces microfluidiques sont fabriquées par réticulation d'un polymère sur un moule dont les microstructures sont obtenues par pho-

tolithographie.

En salle blanche, une résine photosensible est déposée sur un wafer de silicium. L'épaisseur, bien contrôlée par la viscosité de la résine et la vitesse d'étalement, va définir la hauteur des microcanaux. Le motif de la puce microfluidique est imprimé sur un masque alternant des régions transparentes et opaques aux rayons UV. La résine est insolée à travers ce masque. Selon les propriétés de la résine (positive ou négative), ce sont les parties insolées/non-insolées qui réticulent. La dissolution chimique de la résine non réticulée fait apparaître sur le wafer la géométrie microfluidique imposée par le masque. Ce dispositif est utilisé comme moule réutilisable.

Un polymère et son réticulant sont mélangés et versés sur le moule. A l'état liquide, ils épousent complètement la forme des microstructures. Une étape de cuisson assure la réticulation du polymère, le PDMS, qui peut alors être décollé du moule. Les microstructures creusées dans le polymère forment les microcanaux lorsqu'une lame de verre vient fermer le dispositif. La bonne jonction hermétique entre le polymère et le verre est obtenue après activation des surfaces par traitement plasma.

**Géométries microfluidiques** Les géométries utilisées dans cette partie sont présentées en figure 4.1. Toutes sont constituées de différents éléments : des entrées et sorties de fluides (disques noirs - diamètre 2mm), des microcanaux (traits noirs - largeur de 100 à 500  $\mu\text{m}$ ) et des zones de jonction avec le papier (entourées en bleu - 3 à 5 mm). La hauteur des microcanaux est du même ordre de grandeur que l'épaisseur du papier : de 100 à 200  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4.1** – Forme des microcanaux pour les puces micorfluidiques hybrides.

Différentes configurations de canaux droits sont étudiées ainsi que des dispositifs de productions de gouttes (jonction T et focalisation hydrodynamique). Deux formes de jonctions papier-microcanal sont réalisées : oblongue et circulaire. Elles correspondent à deux géométries élémentaires du papier : la bandelette et le disque.

### Jonction papier-microcanal

**Format bandelette** A l'interface papier-microcanal, la bandelette est utilisée comme moyen d'introduction des fluides. Le papier est inséré horizontalement dans la puce microfluidique, au niveau de la forme oblongue, à l'interface PDMS-verre (figure 4.2). Une incision avec un scalpel peut aider à décoller localement le PDMS du verre.

Une goutte de liquide déposée sur le papier s'écoule dans le milieu poreux par capillarité. Une dépression dans le microcanal permet d'extraire le liquide du papier vers la puce microfluidique.

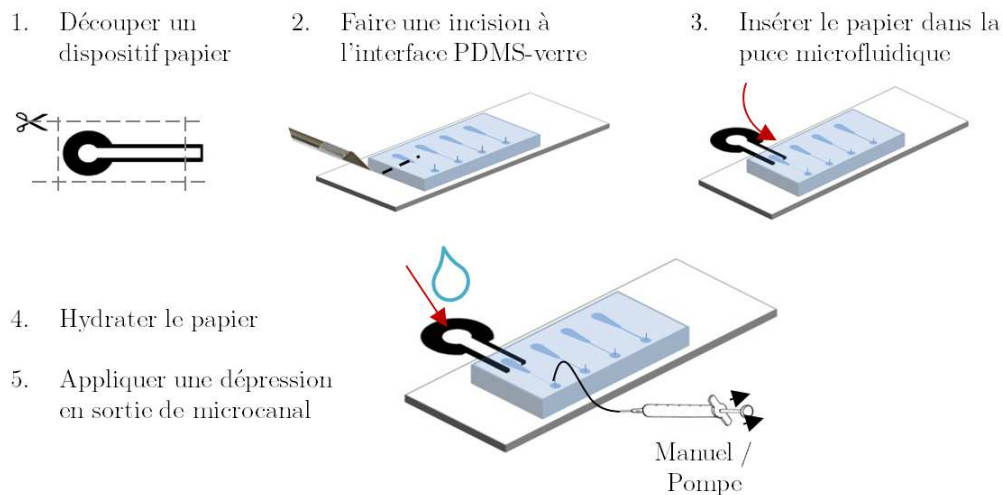


Figure 4.2 – Fabrication d'un dispositif hybride papier-microsystème avec le format bandelette.

**Disque de papier** Le format du disque de papier peut être inséré dans n'importe quelle géométrie microfluidique, comme le montre la figure 4.3. Une cavité du même diamètre que le disque de papier doit être réalisée dans le PDMS pour constituer un accès facile. Après insertion du papier, la cavité est refermée par un cylindre en PDMS légèrement plus large pour assurer une bonne étanchéité. L'élasticité du PDMS permet d'ouvrir et refermer cette cavité autant de fois que nécessaire.

Une fois la cavité refermée, les écoulements liquides sont gérés comme dans un microsystème standard.

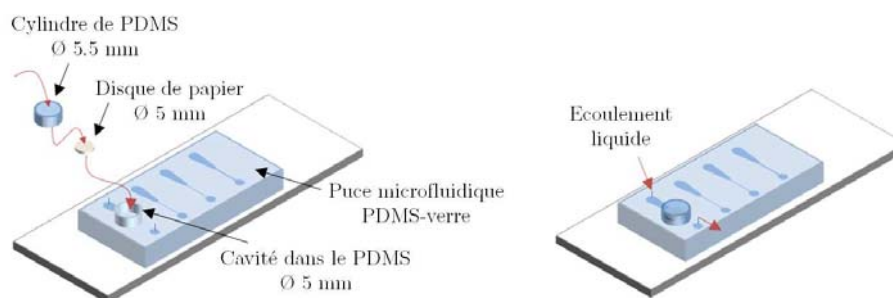


Figure 4.3 – Fabrication d'un dispositif hybride papier-microsystème avec le format disque.

### 4.1.2 Nature des échantillons séchés sur papier

Les composés séchés sur le papier sont obtenus par dépôt d'un volume de 5  $\mu\text{L}$  d'une solution à concentration connue, sur un dispositif papier au format bandelette ou disque. Il peut s'agir de colorants pour la visualisation des phénomènes, de fluorescéine pour des mesures en fluorescence, de solutions de métaux et de minéraux (calcium, fer, magnésium, potassium, sodium) pour l'analyse élémentaire, de sérum pour l'analyse biologique de protéines ( $\beta$ -hCG). Les dépôts sont réalisés au moins trois jours avant l'élution dans la puce microfluidique, et conservés à température ambiante dans une boîte de Pétri, à l'abri de la lumière.

### 4.1.3 Dispositifs de mesures de l'élution

Les expériences réalisées avec les dispositifs hybrides utilisent l'instrumentation classique de la microfluidique pour le contrôle des écoulements. La récupération des échantillons séchés est mesurée soit *in situ* dans le microcanal ou en sortie de puce microfluidique.

#### Contrôle des écoulements

Les écoulements sont contrôlés par un pousse-seringue (Cetoni Nemesys) qui peut être utilisé de manière réversible : avancée ou recul du piston. Il est positionné respectivement en entrée/en sortie du microsystème pour les formats disque de papier/bandelette. Les liquides utilisés sont principalement de l'eau, des solutions tampons phosphate (PBS : Phosphate Buffer Saline), de l'eau acidifiée  $\text{HNO}_3$  1% et des solutions aqueuses de microsphères (diamètre 4  $\mu\text{m}$ ). Les écoulements biphasiques dans les géométries microfluidiques de production de gouttes sont réalisés avec de l'huile siliconée (97% en masse) mélangée à un surfactant Span 80 (3% en masse).

#### Mesures de fluorescence

L'observation des écoulements est réalisée sous microscope Leica en lumière blanche. Les mesures de fluorescence sont réalisées sous lampe UV avec un filtre GFP. Une calibration du dispositif est réalisée en faisant circuler dans le microcanal, à différents débits, des solutions de fluorescéine aux concentrations de  $10^{-8}$  à  $10^{-2}$  g/mL. Les images sont enregistrées à des cadences compatibles avec le débit et suivant des temps d'exposition variables. La linéarité de la caméra en fonction du temps d'exposition reste valable même en variant le débit d'écoulement (figure 4.4). Comme dans le chapitre précédent, le profil d'intensité de la fluorescéine en fonction de la concentration est constitué de trois domaines (limite de détection / domaine linéaire / sur-concentration).

Cette calibration en fluorescence permet, dans le domaine linéaire, de relier directement l'intensité de signal dans le microcanal et une concentration locale instantanée en fluorescéine. Elle sera utilisée pour quantifier les performances d'élution d'échantillons séchés.

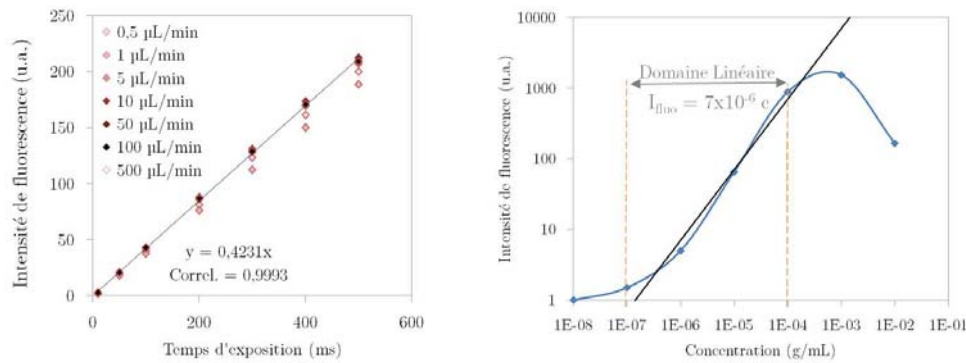


Figure 4.4 – Calibration du dispositif pour relier intensité de signal et concentration en fluorescéine.

### Analyse élémentaire

**Fonctionnement** En complément des mesures de fluorescence, la mesure de l'éluion d'échantillons séchés a été réalisée par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (Agilent - ICP-OES : Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry). Dans cette technique d'analyse, un échantillon liquide est transformé en aérosol par un nébuliseur. Les gouttes les plus fines sont transportées, par un flux d'argon, jusqu'à une torche plasma qui ionise tous les atomes de l'échantillon. Le retour à l'état fondamental des atomes émet un rayonnement dont la longueur d'onde est caractéristique de l'élément. La lumière émise par l'échantillon est analysée et comparée à celle de solutions standard.

**Étalonnage** L'étalonnage de l'ICP-OES consiste à faire analyser plusieurs solutions dont la composition est connue. Dans un premier temps, un seul élément - le fer - est analysé suivant cinq longueurs d'onde caractéristiques : 234,350 nm ; 238,204 nm ; 239,563 nm ; 259,940 nm ; 261,187 nm. Des solutions aqueuses acidifiées ( $\text{HNO}_3$  1%) à différentes concentrations en fer (de 0.1 ppm à 200 ppm) sont mesurées par l'ICP-OES. Ces mesures permettent de déterminer la relation linéaire entre l'intensité mesurée pour chaque raie spectrale et la concentration de l'échantillon (figure 4.5).

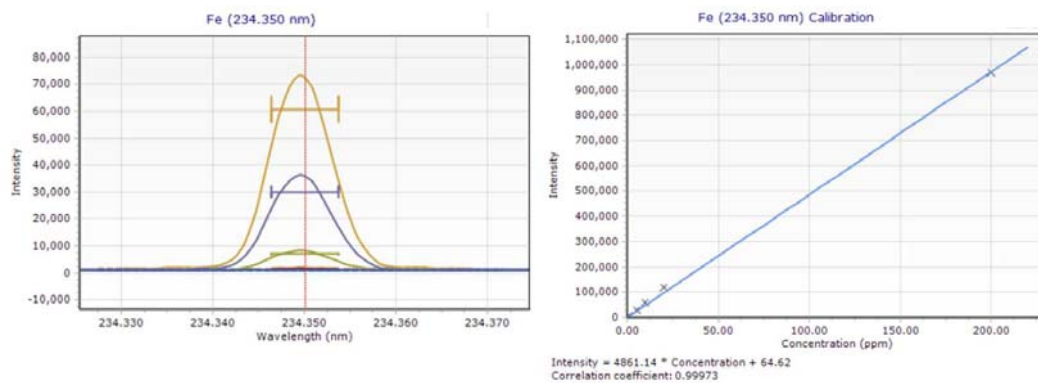
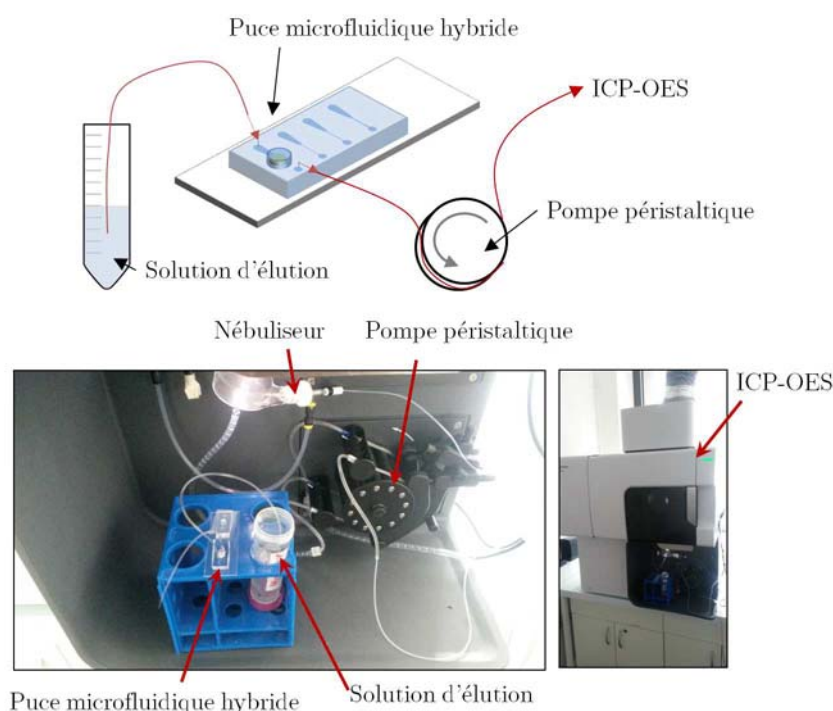


Figure 4.5 – Calibration de l'ICP-OES par des solutions standards de fer à différentes concentrations.



De la même manière, l'analyse de mélange est réalisée après calibration du dispositif. Le mélange est constitué de cinq composés qui sont analysés chacun par deux raies spectrales : le calcium (317,933 nm ; 422,673 nm), le fer (234,350 nm ; 238,204 nm), le potassium (766,491 nm ; 769,897 nm), le magnésium (279,553 nm ; 285,213 nm), le sodium (588,995 nm ; 589,592 nm). Les solutions étalons contiennent chacun de ces éléments à des concentrations allant de 0.1 ppm à 200 ppm.

**Couplage avec la microfluidique** L'analyse élémentaire de la sortie d'une puce microfluidique est réalisée par couplage avec l'ICP-OES (figure 4.6). Pour cela, l'entrée de la puce microfluidique est reliée à la solution d'élution alors que la sortie est connectée à la pompe péristaltique de l'ICP-OES. La pompe péristaltique génère donc l'écoulement depuis le tube de la solution d'élution, à travers la puce microfluidique, jusqu'au nébuliseur. La vitesse de la pompe péristaltique définit directement le débit dans la puce microfluidique. Deux configurations de la pompe péristaltique sont utilisées dans les expériences : 10 tours/min (15  $\mu\text{L/s}$ ) et 1 tour/min (1,5  $\mu\text{L/s}$ ).



**Figure 4.6** – Analyse de la sortie de la puce microfluidique par l'ICP-OES.

Pour une analyse en continu, les mesures par l'ICP-OES sont réalisées à la cadence maximale (soit une mesure par seconde), avec un temps d'intégration d'une seconde, sans duplicat.

Ce dispositif expérimental d'analyse directe de la sortie d'une puce microfluidique est une configuration originale dont les performances sont élevées. L'ICP-OES permet une détection quantitative et simultanée de plusieurs éléments. Aux petits débits, les volumes de la microfluidique sont du même ordre de grandeur que ceux analysés par le spectromètre.

### Analyse de composés biologiques

La protéine  $\beta$ -hCG est utilisée comme composé biologique modèle dont l'élution depuis le papier vers la puce microfluidique est caractérisée. La mesure de la concentration est réalisée par immunoessais en plaque multipuits. Ce n'est donc pas directement compatible avec une mesure *in situ* dans le microcanal ou en ligne, en sortie du microcanal. L'élution au cours du temps est mesurée discrètement en segmentant le liquide en sortie de la puce microfluidique, dans des microtubes. Expérimentalement, chaque microtube contient initialement 200  $\mu\text{L}$  d'eau dans lesquels sont dilués 20  $\mu\text{L}$  d'éluat. Chaque microtube correspond donc à un moment d'élution. Le volume initial d'eau est nécessaire pour limiter l'évaporation de la petite quantité d'éluat, et constitue le volume minimal pour réaliser l'immunoessai.

## 4.2 Etude des écoulements dans les microsystèmes hybrides avec bandelette de papier

Le format bandelette de papier (figure 4.2), par la nouvelle interface d'entrée pour la puce microfluidique, impose de contrôler les écoulements par la sortie. Le pousse-seringue est donc utilisé dans une configuration d'aspiration pour appliquer une dépression en sortie de microcanal. Selon la géométrie de la puce microfluidique, cette configuration modifie les diagrammes de phase des écoulements monophasiques ou diphasiques.

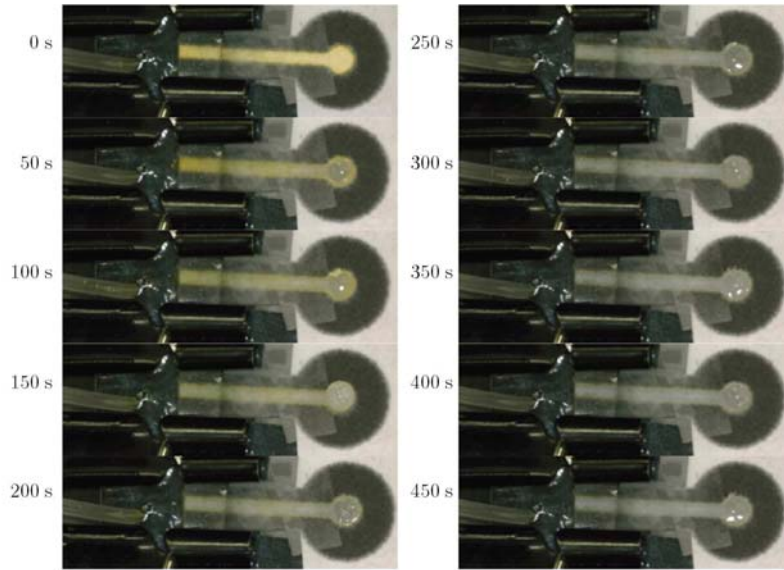
### 4.2.1 Configuration d'écoulements monophasiques

Dans une géométrie de microcanal droit, la réhydratation du papier permet l'élution de composés séchés. La mesure des vitesses d'écoulement dans le microcanal montre une limite imposée par la pompe capillaire.

#### Observation de l'élution d'échantillons séchés

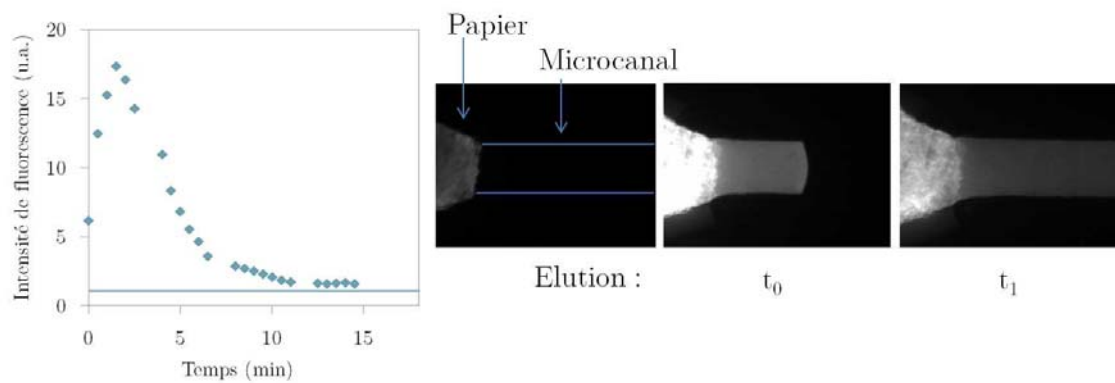
Le principe de fonctionnement du microsystème hybride papier-PDMS dans le format bandelette de papier est illustré en figure 4.7. Pour cela 5  $\mu\text{L}$  d'une solution de fluorescéine ( $c = 10^{-3}\text{g/mL}$ ) sont séchés sur une bandelette de papier. Cette bandelette est insérée dans une puce microfluidique dont la géométrie est un simple microcanal droit avec une interface oblongue pour la jonction avec le papier. La sortie du microcanal est reliée au pousse-seringue qui impose un débit en sortie de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La zone de dépôt de goutte de la bandelette papier est alimentée par des dépôts successifs de 20  $\mu\text{L}$  d'eau. Dans un premier régime, l'eau s'écoule dans le papier par la pompe capillaire. Au contact avec le microcanal, c'est la dépression imposée par le pousse-seringue qui extrait le liquide du papier vers le microcanal.

L'élution est observée par colorimétrie sur le papier. Le dépôt initialement jaune de fluorescéine est progressivement lavé par l'écoulement d'eau : la fluorescéine est dissoute puis transportée.



**Figure 4.7** – Elution de la fluorescéine séchée sur papier par écoulement dans le microcanal.

Des mesures de fluorescence dans le microcanal, au cours du temps, permettent de quantifier cette élution, comme le montre la figure 4.8. Le profil d'élution montre un maximum de fluorescence dans les deux premières minutes, suivi d'une décroissance exponentielle de l'intensité de signal. L'étude quantitative de l'élution est proposée en section 4.3.1 avec le format de disque de papier.

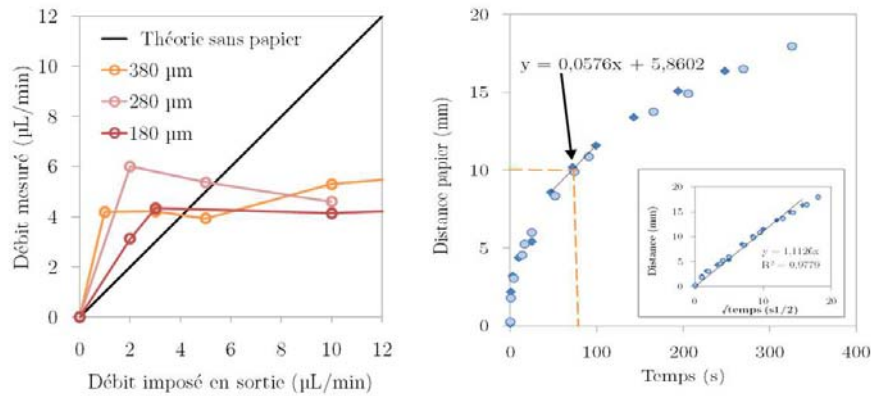


**Figure 4.8** – Profils d'élution de fluorescéine séchée sur papier, dans un microcanal droit.

### Mesure des vitesses d'écoulement

Dans une configuration de contrôle des écoulements par la sortie du microcanal, la compressibilité de l'air s'oppose au déplacement liquide. Pour garder une bonne maîtrise du début de l'élution, il n'est pas envisageable de pré-remplir le microsystème. De plus, le liquide est apporté par l'intermédiaire du dispositif papier qui est régi par la loi d'écoulement de Lucas-Washburn. Ces effets sont mesurés par comparaison du débit imposé en sortie avec la vitesse effective du liquide.

Une solution contenant des microsphères fluorescentes (diamètre 4  $\mu\text{m}$ ) est déposée sur la bandelette de papier. La mesure du déplacement des microsphères permet de calculer la vitesse dans le microcanal par PIV (Particle Image Velocimetry). Expérimentalement, le débit de liquide dans le microcanal atteint rapidement un seuil quel que soit le débit imposé par le pousse-seringue en sortie.



**Figure 4.9** – Débit d’écoulement dans le microcanal selon le débit imposé en sortie et la vitesse de transport liquide dans le papier par la pompe capillaire.

La pompe capillaire transporte le liquide dans le papier suivant la loi de Lucas-Washburn. Le microcanal et la zone de dépôt de goutte sont séparés d’une distance de 1 cm de bandelette papier. Le liquide arrive donc à la jonction papier-microcanal avec une vitesse imposée par la migration dans le papier soit 0,058 mm/s. En tenant compte des dimensions de la bandelette, cette vitesse correspond à un débit de 5,3  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Ce débit en sortie de bandelette correspond à la valeur seuil maximale d’écoulement dans le microcanal. C’est donc la pompe capillaire qui limite l’écoulement.

Théoriquement, il est possible d’atteindre des débits plus élevés en jouant sur les paramètres géométriques de la bandelette : plus courte, plus large, plus poreuse, plus épaisse.

#### 4.2.2 Influence du papier sur les écoulements diphasiques

En microfluidique, la production de gouttes est automatisée sous écoulement par la géométrie : jonction T ou focalisation hydrodynamique. Chaque goutte est alors considérée comme un réservoir d’analyse indépendant, comme dans une plaque multipuits mais à plus petite échelle.

##### Segmentation de l’échantillon élué en gouttes

Le défi avec l’interface papier en entrée de la puce microfluidique consiste à éluer l’échantillon séché et à le fragmenter en gouttes d’eau dans l’huile. Contrairement au cas standard, il n’est pas possible de pressuriser l’écoulement par l’entrée papier. Il faut donc combiner une dépression en sortie de canal avec des débits imposés d’huile.

Expérimentalement pour les deux géométries (focalisation hydrodynamique et jonction T), l’entrée papier est alimentée par des dépôts réguliers d’eau dans la zone de dépôt de gouttes. Le débit d’huile est contrôlé par un pousse-seringue et la sortie du microsystème est reliée, comme

dans la situation précédente, à un pousse-seringue qui impose une dépression. Dans le cas de la jonction T, une entrée additionnelle, également contrôlée par un pousse-seringue, permet de mélanger dans chaque goutte l'éluat et un réactif supplémentaire.

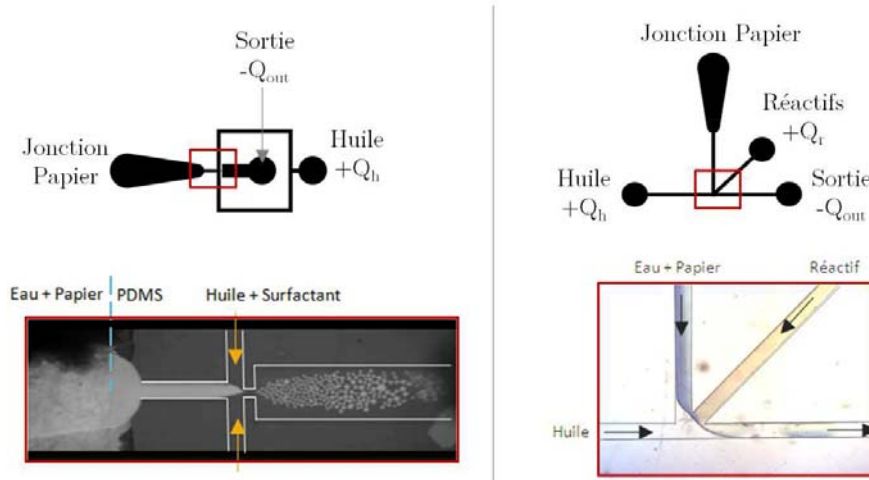


Figure 4.10 – Production microfluidique de gouttes à partir d'échantillons séchés sur papier.

En figure 4.10 sont présentés les résultats d'élu­tion de fluorescéine séchée sur papier dans une focalisation hydrodynamique et de colorant bleu séché sur papier dans une jonction T. Avec des débits appropriés pour l'entrée d'huile et la sortie du microsystème, il est possible d'obtenir une production de gouttes stable. L'exploration des différents régimes en fonction des débits donne lieu à l'établissement de diagrammes de phase.

Etablissement des diagrammes de phases

**Focalisation hydrodynamique** Dans la géométrie de focalisation hydrodynamique, le diagramme de phase est obtenu en observant les régimes d'écoulement selon les débits imposés en sortie et sur l'entrée d'huile (figure 4.11).

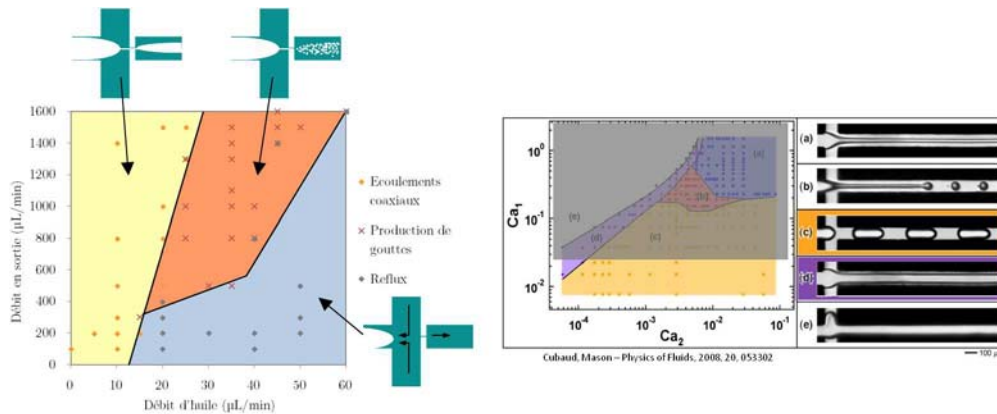


Figure 4.11 – Diagramme de phase d'un microsystème hybride papier-PDMS pour la géométrie de focalisation hydrodynamique.

Lorsque le débit d'huile est trop important par rapport à l'aspiration en sortie, l'huile envahit le microcanal correspondant à l'entrée de papier. C'est le régime de reflux. Des écoulements co-axiaux eau-huile se forment lorsque le débit d'huile n'est pas suffisant pour provoquer l'instabilité hydrodynamique. Entre ces deux régimes se trouve la production de gouttes. Expérimentalement, il faut un débit de sortie supérieur à  $500 \mu\text{L}/\text{min}$  et un débit d'huile de l'ordre de  $30 \mu\text{L}/\text{min}$ .

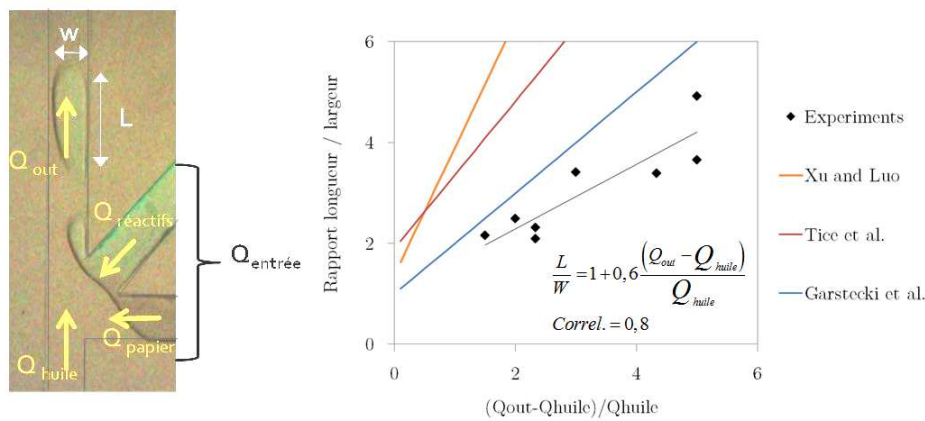
Un diagramme de phase pour la géométrie de focalisation hydrodynamique, sans interface papier, est proposé dans la littérature [160] et reproduit en figure 4.11. Aux petits nombres capillaires de la phase dispersée, deux régimes sont observés : les écoulements coaxiaux et la production de gouttes.

Dans la partie précédente, nous avons montré que, dans un microcanal droit, quel que soit le débit imposé en sortie, l'apport liquide par la pompe capillaire limite le débit maximal dans la puce microfluidique. En considérant un débit d'eau entre  $2,5$  et  $10 \mu\text{L}/\text{min}$ , le nombre capillaire de cet écoulement est compris entre  $7 \times 10^{-3}$  et  $3 \times 10^{-2}$ . Le dispositif avec jonction papier présente donc les mêmes régimes d'écoulement qu'une puce microfluidique standard.

**Jonction T** Dans la littérature microfluidique [161], une loi d'échelle (équation 4.1) relie les paramètres de la taille de gouttes et les débits imposés, dans une géométrie de jonction T.

$$\frac{L}{w} = 1 + \alpha \frac{Q_{\text{entrée}}}{Q_{\text{huile}}} \tag{4.1}$$

Avec  $L$  et  $w$  la longueur et la largeur de la goutte,  $Q_{\text{entrée}}$  le débit de la phase dispersée et  $Q_{\text{huile}}$  le débit d'huile.  $\alpha$  est un paramètre dont l'ordre de grandeur est 1. Les résultats d'estimation de ce paramètre par plusieurs équipes, sont proposés en figure 4.12.



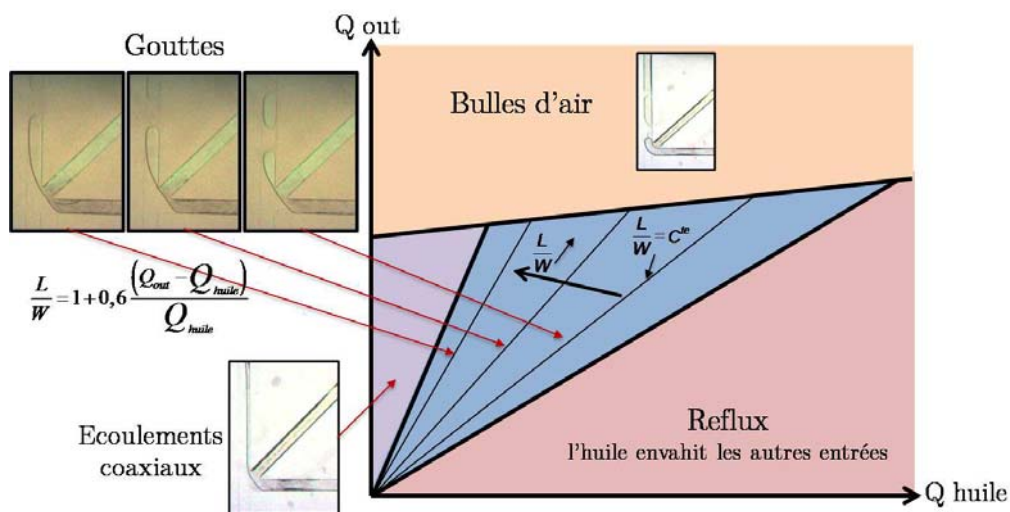
**Figure 4.12** – Evolution de la taille de gouttes en fonction des débits imposés dans une jonction T et lois d'échelles proposées dans la littérature.

Avec un microsystème hybride papier-PDMS, aux petits débits d'aspiration, le débit d'entrée est estimé selon l'équation suivante :

$$Q_{\text{entrée}} = Q_{\text{papier}} + Q_{\text{réactifs}} \sim Q_{\text{out}} - Q_{\text{huile}} \tag{4.2}$$

Expérimentalement, cette loi est vérifiée pour une valeur de paramètre  $\alpha = 0,6$ . La dispersion des points de mesure vient de l'hypothèse de conservation des débits au sein de la jonction T. En effet, le débit de sortie n'est pas rigoureusement égal au débit imposé par le pousse-seringue à cause de la compressibilité du réservoir d'air initialement présent dans la seringue et les connectiques.

Un diagramme de phase de la jonction T avec une entrée papier est proposé en figure 4.13. Quatre régimes sont observés. Lorsque le débit de sortie est trop important, l'entrée papier laisse passer un flux d'air. Comme dans la focalisation hydrodynamique, avec un débit d'huile trop élevé par rapport au débit total, l'écoulement d'huile envahit les microcanaux de la phase dispersée. Aux trop faibles débits d'huile, le cisaillement n'est pas assez important pour former des gouttes, c'est le régime des écoulements coaxiaux.



**Figure 4.13** – Diagramme de phase d'un microsysteme hybride papier-PDMS pour la géométrie de jonction T.

Aux débits intermédiaires, des gouttes de taille variable sont formées. Suivant des abaques  $\frac{Q_{out}}{Q_{huile}} = \text{constante}$ , la taille de goutte est fixe. Lorsque le débit de sortie augmente par rapport au débit d'huile, la taille des gouttes augmente.

### 4.2.3 Limites du dispositif

Dans cette configuration, la bandelette papier est insérée dans l'interface PDMS-verre de la puce microfluidique. Expérimentalement, c'est une opération assez technique à réaliser. De plus, il n'est pas possible d'insérer et retirer à volonté la bandelette de papier, c'est un dispositif à usage unique. Enfin, assurer l'étanchéité du système est souvent difficile.

Si un étalement de goutte est autorisé sur la bandelette de papier (pas de barrière de surface), l'eau en surface du papier favorise une bonne étanchéité de la jonction avec la puce microfluidique. Ceci est obtenu au détriment d'une élu­tion efficace des composés séchés dans le papier. Sans étalement de goutte sur la bandelette, un débit de sortie trop important provoque l'aspiration de bulles d'air.

Le fonctionnement de ce dispositif dans un état stationnaire nécessite une réhydratation

constante de la bandelette. Le dépôt de goutte dont le volume est limité n'est donc pas satisfaisant. Il est possible d'imaginer de faire plonger la languette dans un réservoir liquide. Il faut alors une bandelette plus longue et les écoulements en sortie de papier seront plus lents.

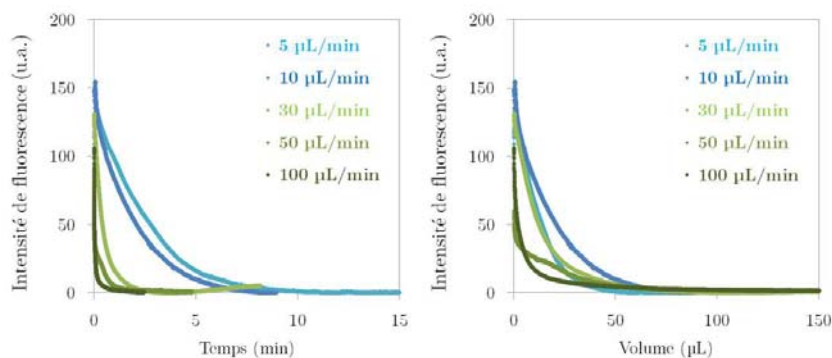
### 4.3 Analyse quantitative de l'éluion en microcanaux à partir de disques de papier

Dans la configuration du disque de papier (figure 4.3), le papier est inséré dans la puce microfluidique sans modifier les entrées et sorties. Les écoulements sont donc gérés de manière standard et la présence du papier n'a aucun impact sur le fonctionnement ou les diagrammes de phase. Ce format est donc compatible avec toutes les géométries microfluidiques. L'écoulement dans le papier permet d'éluier un échantillon séché au cours du temps. Les performances d'éluion selon des paramètres d'intérêt (nature du papier, solution d'éluion, débit, géométrie du microcanal) sont analysées pour trois types de composés : la fluorescéine, des ions, une protéine.

#### 4.3.1 Mesures de fluorescence

##### Etablissement des courbes d'éluion

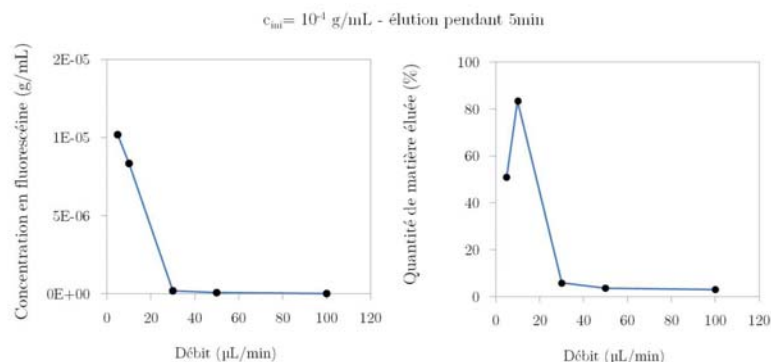
L'éluion d'une solution de fluorescéine séchée sur papier Whatman, au sein d'un microcanal droit est présentée en figure 4.14. Le débit d'eau est varié de 5 à 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Plus le débit est faible, plus le temps caractéristique d'éluion est grand. Une meilleure comparaison des expériences est possible en normalisant le temps par le débit. Les courbes d'éluion résultent alors en la donnée de l'intensité de fluorescence en fonction du volume d'éluion.



**Figure 4.14** – Eluion à débit variable de 5  $\mu\text{L}$  de fluorescéine ( $c = 10^{-4}\text{g}/\text{mL}$ ) séchés sur disque de papier Whatman.

Par l'étalonnage du dispositif expérimental, l'intensité de fluorescence est directement reliée à une concentration locale de fluorescéine. L'intégrale sous la courbe d'éluion permet alors de quantifier les performances en termes de concentration finale dans le microtube ou de quantité de matière éluee. Cette intégrale peut être définie sur toute la durée d'expérience ou fixée sur un





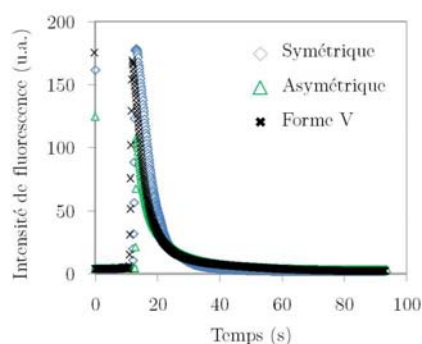
**Figure 4.15** – Intégration des courbes d'éluion sur les 5 premières minutes. Performances de récupération en termes de concentration finale et de quantité de matière éluee.

volume ou une durée précise. Cette analyse est réalisée en figure 4.15 pour 5 minutes d'éluion à chaque débit.

Pour une même durée d'expérience, les débits élevés sont responsables d'un fort effet de dilution : les analytes récupérés sont très dilués dans le microtube. Les débits faibles permettent de conserver un éluat concentré, dilué seulement d'un facteur 10 par rapport au dépôt initial sur le papier.

La quantité de matière éluee est également beaucoup plus élevée aux faibles débits : plus de 80% à 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  contre moins de 5% à 50 et 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Ceci s'explique par le fait que les faibles débits donnent des écoulements dont la vitesse est du même ordre de grandeur que celle imposée par la pompe capillaire. Au contact du liquide, la pompe capillaire du papier contribue activement à imbiber tout le substrat. Au contraire, dans le cas de forts débits dans un milieu poreux, le liquide emprunte les trajectoires de plus faible résistance hydrodynamique. Le reste du substrat poreux participe peu à l'éluion.

Ces expériences d'éluion de fluorescéine séchée sur papier sont réalisées dans différentes géométries microfluidiques : des microcanaux droits symétriques / asymétriques autour de la jonction avec le papier ; une forme en V qui rejoint le diamètre du disque de papier. Dans toutes ces configurations, avec un débit faible (20  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), aucune différence significative n'est observée sur l'éluion (figure 4.16).



**Figure 4.16** – Courbe d'éluion selon la géométrie du microcanal.

### Profils d'élution dans les microcanaux

La mesure en fluorescence *in situ* donne accès à la répartition spatiale de la fluorescéine dans le microcanal. Pour deux largeurs (200 et 800 $\mu\text{m}$ ) de microcanaux symétriques, les profils d'élution sont présentés en figure 4.17.

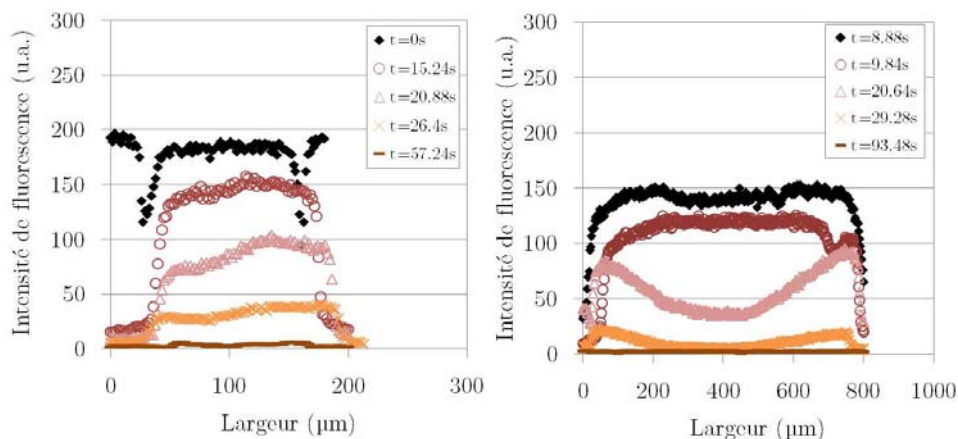


Figure 4.17 – Profil d'intensité de fluorescence dans le microcanal pendant l'élution.

Dans le cas d'un microcanal étroit (200  $\mu\text{m}$ ) par rapport au diamètre du disque de papier (5 mm), le profil d'intensité de fluorescence est homogène dans la largeur du microcanal. Au cours du temps, l'élution provoque une diminution de signal mais le profil reste plat. Dans le cas d'un microcanal plus large, après quelques secondes d'élution, il apparaît une zone de déplétion au centre du microcanal : l'intensité de fluorescence décroît plus rapidement au centre que sur les bords. Ce phénomène s'explique par le profil de vitesse parabolique dans un écoulement de Poiseuille. L'élution est plus rapide au centre que sur les bords.

#### 4.3.2 Analyse de composés élémentaires

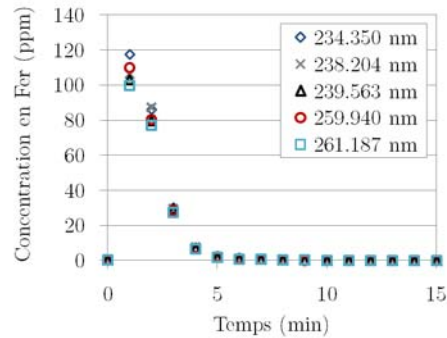
Le couplage entre une puce microfluidique et l'ICP-OES permet une analyse en ligne en sortie de microcanal. Cette configuration est utilisée pour quantifier l'élution de composés élémentaires comme des métaux et des minéraux. Grâce aux étapes de calibration préliminaire, le logiciel de traitement des données spectrométriques renvoie directement la donnée de la concentration de l'élément recherché dans l'échantillon, à l'instant de la mesure.

##### Elution de solutions de fer séchées

Des solutions ioniques de fer sont séchées pendant 3 jours sur des disques de papier (diamètre 5 mm). L'élution est quantifiée par l'ICP-OES selon différents paramètres comme la vitesse de la pompe péristaltique ou la nature de la solution d'élution.

**Elution quantitative** L'étalonnage a permis de calibrer 5 longueurs d'onde caractéristiques de l'élément fer. Lors d'une expérience d'élution, l'intensité de chacune de ces raies donne accès à une mesure locale instantanée de la concentration de cet élément. La courbe d'élution obtenue

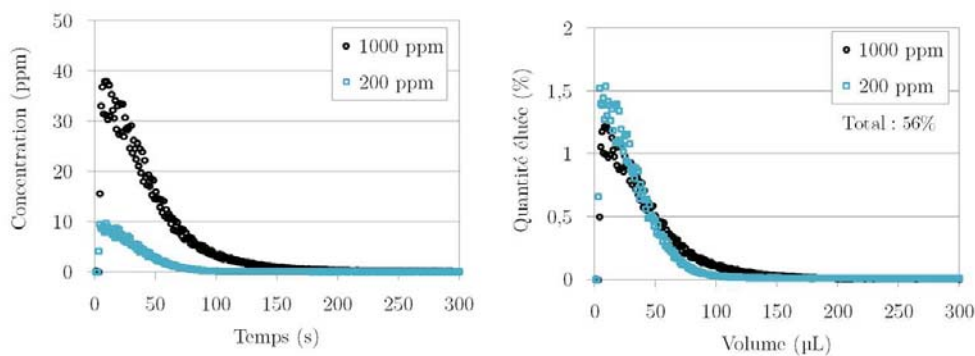
en figure 4.18 est très similaire aux mesures en fluorescence réalisées dans la section précédente. Pour la suite des expériences, les concentrations calculées à partir de cinq raies spectrales sont moyennées.



**Figure 4.18** – Courbe d'éluion d'un échantillon séché de fer, suivant cinq longueurs d'onde caractéristiques.

Les courbes d'éluion d'échantillons de fer à différentes concentrations sont présentées en figure 4.19. Deux représentations graphiques rendent compte de l'expérience : la concentration locale en fonction du temps ou la quantité éluée en fonction du volume. Cette deuxième configuration a l'avantage de normaliser les données selon la quantité de matière initialement séchée sur le papier et selon le débit dans le microcanal.

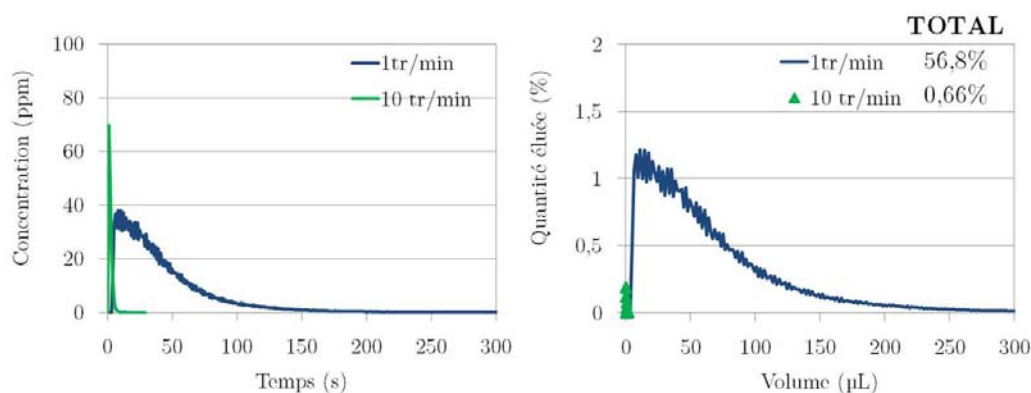
L'éluion de solutions de fer à 1000 ppm et 200 ppm à 1 tr/min (vitesse de la pompe péristaltique) extrait 56% de la quantité de matière initiale et induit un facteur de dilution de 20-25.



**Figure 4.19** – Courbes d'éluions, en concentration et en quantité de matière éluée, d'échantillons séchés de fer à différentes concentrations.

**Paramètres d'intérêt** Expérimentalement, la cadence d'analyse est limitée à une mesure par seconde, avec un temps d'intégration d'une seconde. Selon la vitesse de la pompe péristaltique, cette cadence peut être trop lente et ne pas permettre d'analyser l'intégralité de l'éluion. Les

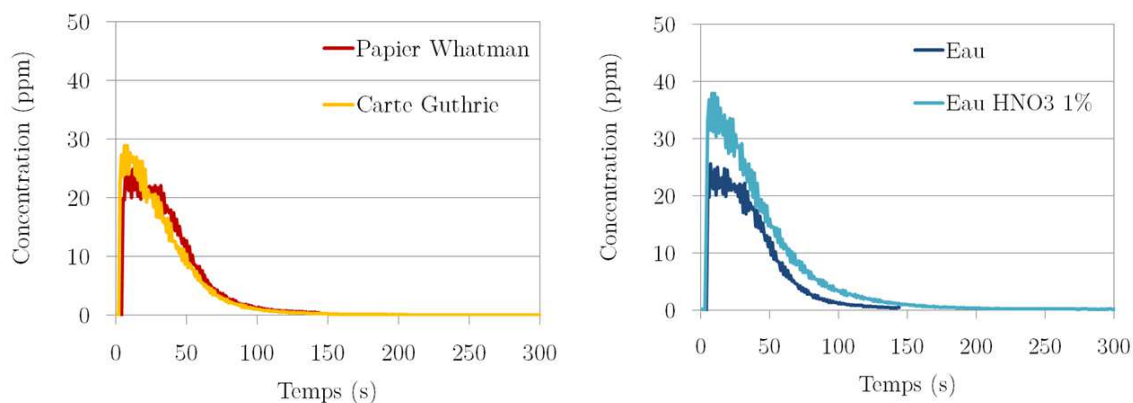
courbes d'élution de fer séché sur papier Whatman pour deux vitesses de la pompe péristaltique (1 et 10 tr/min) sont présentées en figure 4.20.



**Figure 4.20** – Courbes d'élution selon la vitesse de la pompe péristaltique.

Le maximum de la courbe d'élution en concentration croît avec le débit imposé. En revanche, en termes de quantité de matière éluee, seul un faible débit permet une élution efficace. Les très mauvaises performances obtenues à débit élevé s'expliquent par la combinaison de deux phénomènes. D'une part, la cadence de mesure ne suffit pas à mesurer l'intégralité du liquide qui sort du microcanal. D'autre part, comme le montrent les mesures en fluorescence, les écoulements rapides ne s'effectuent pas de manière uniforme dans le papier.

Dans la littérature de la microfluidique papier, le support Whatman Grade 1 est le plus utilisé. Pourtant, les prélèvements sanguins séchés du nourrisson sont réalisés sur un papier légèrement différent : les cartes Guthrie (Whatman 903). Les courbes d'élution (figure 4.21) montrent qu'aucune différence significative n'est observée dans le cas du fer.



**Figure 4.21** – Courbes d'élution selon la nature du papier et de la solution d'élution.

Les analyses élémentaires en ICP-OES sont généralement réalisées dans des solutions aqueuses acidifiées ( $\text{HNO}_3$  1%) pour favoriser la dissolution ionique des espèces minérales et métalliques.

L'élution de fer séché par une solution aqueuse acidifiée est plus efficace qu'avec une solution d'élution neutre (figure 4.21).

### Elution d'un mélange de composés

**Analyse parallélisée de cinq éléments** Un mélange de cinq composés minéraux et métalliques (calcium, fer, potassium, magnésium, sodium) est analysé de la même manière que les solutions de fer.

Les courbes d'élution pour chaque composé sont obtenues à partir d'une moyenne sur les mesures de deux raies caractéristiques. Les composants du mélange sont élués de manière très similaire mais l'intégration quantitative révèle des différences (figure 4.22). Certains éléments comme le calcium et le fer sont mieux élués que le sodium et le magnésium.

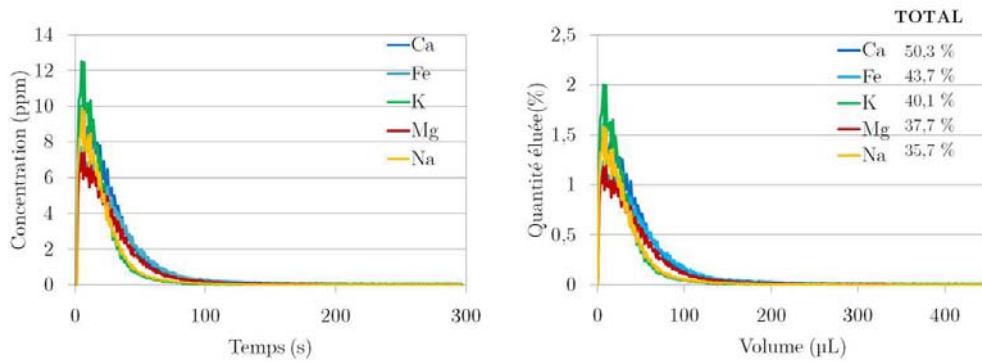


Figure 4.22 – Courbes d'élution pour chaque composant d'un mélange séché sur papier.

Une mesure d'élution est réalisée à partir d'un papier Whatman vierge. Il apparaît dans les courbes d'élution en figure 4.23 un bruit significatif de mesure spécifique à chaque élément : très important dans le cas du potassium, modéré pour le calcium et le sodium, très négligeable pour le magnésium et le fer. Une expérience réalisée avec la même solution d'élution à travers la puce microfluidique, mais sans papier, ne montre pas un tel niveau de bruit de fond. C'est donc bien du papier que provient ce bruit de mesure.

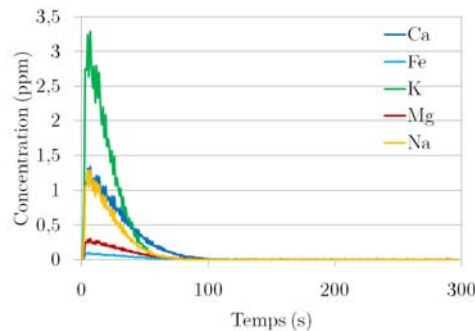
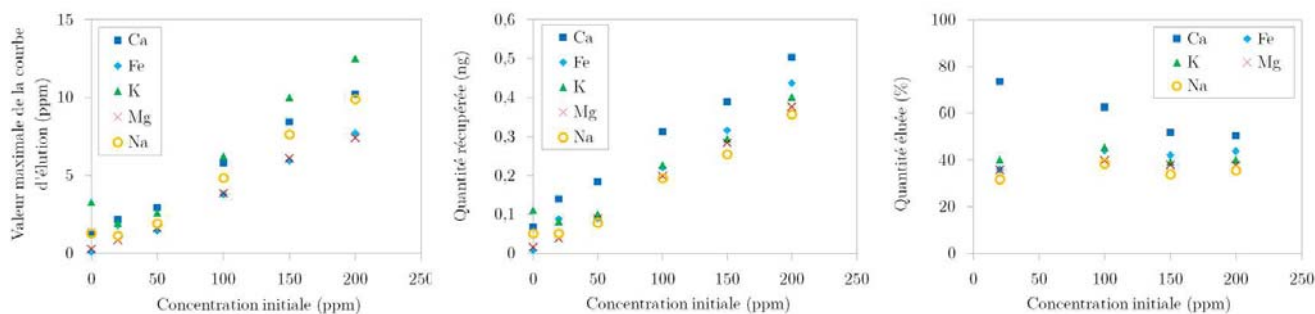


Figure 4.23 – Courbes d'élution à partir d'un papier vierge.

La possibilité d'analyses quantitatives est étudiée par l'élution de différentes concentrations de ce mélange séché sur papier. Les concentrations vont de 20 à 200 ppm pour chaque composé. Chaque courbe d'élution peut être caractérisée par la valeur maximale de la concentration d'élution ou par la quantité effective de matière éluee (intégration de la courbe). Dans les deux cas, chaque composé montre une relation linéaire entre le paramètre d'analyse et la concentration initiale déposée sur papier (figure 4.24).



**Figure 4.24** – Analyse quantitative de l'élution par le maximum ou l'intégrale sous la courbe d'élution.

Quelle que soit la concentration initiale du mélange, les performances d'élution restent proches de 40% de matière éluee. Seul l'élément calcium montre un écart à cette valeur : il est mieux élué lorsqu'il est moins concentré.

**Pertinence biologique** Un examen sanguin peut inclure une mesure de la concentration des ions dans le sang (ionogramme). Parmi les principaux constituants se trouvent le potassium, le calcium, le magnésium, le sodium.

Le taux de sodium dans le sang (natrémie) normal est compris entre 3126 et 3287 ppm. Un écart à cette gamme peut être causé par une hyperhydratation, une déshydratation, une insuffisance cardiaque, rénale ou hépatique.

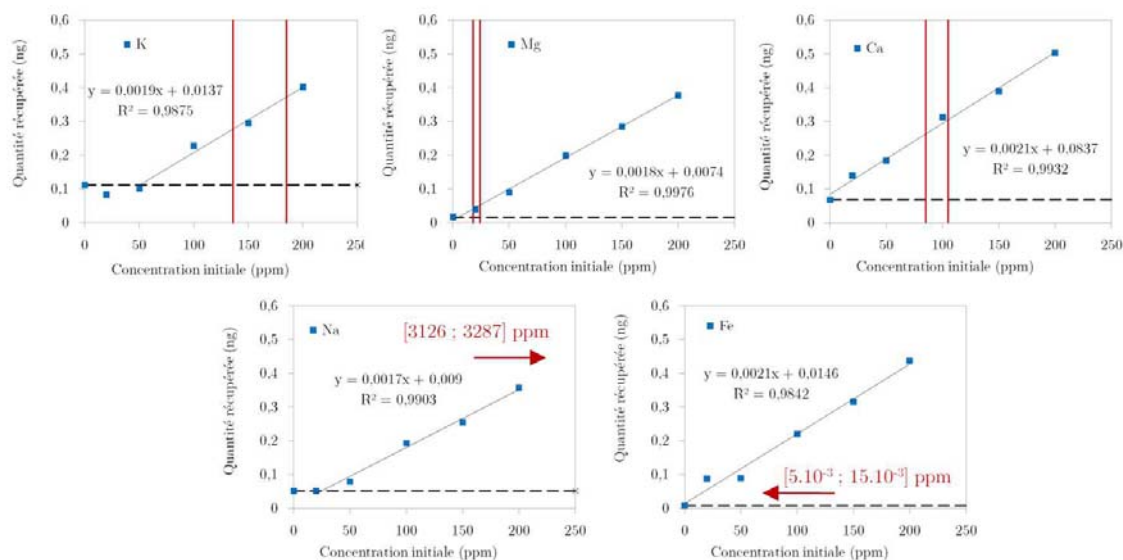
La kaliémie (taux de potassium) est considérée normale entre 136 et 185 ppm. Une diminution de ce taux est caractéristique de vomissements et diarrhées.

Le calcium est un élément déterminant dans la formation et la minéralisation des os. Les valeurs standards de calcémie sont entre 85 et 105 ppm.

Le magnésium doit être présent dans le sang à des concentrations entre 18 et 24 ppm.

Le fer dans l'organisme est un élément essentiel impliqué dans les fonctions de transport de l'oxygène, lié à l'hémoglobine. Présent dans le sang en très faibles quantités (entre  $5 \times 10^{-3}$  et  $15 \times 10^{-3}$  ppm), son dosage est rarement nécessaire. Le dosage de la transferrine (protéine de transport) rend mieux compte des réserves en fer de l'organisme.

L'élution quantitative du mélange précédent est donc particulièrement bien adaptée pour tous les composés, excepté le fer. Les gammes de valeurs standards dans l'organisme sont pertinentes avec la limite de détection observée lors de l'élution. En figure 4.25, les valeurs standards de l'ionogramme (en rouge) sont ajoutées aux courbes quantitatives caractérisant l'élution.



**Figure 4.25** – Analyse quantitative de chaque composé et valeurs caractéristiques d'un ionogramme (en rouge).

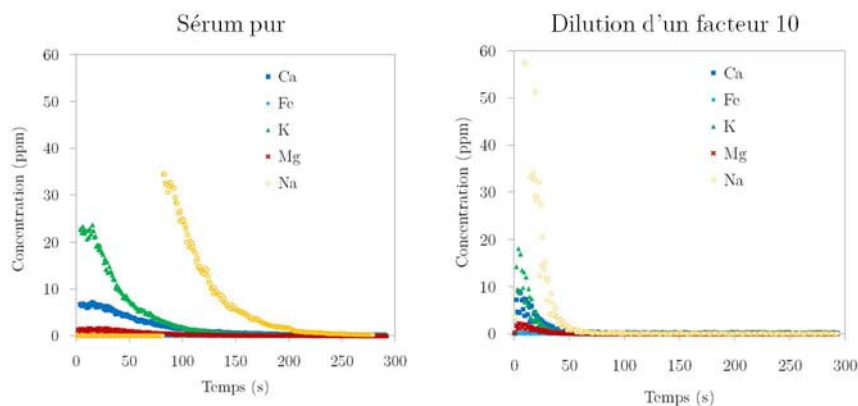
**Cas d'un sérum** La même calibration que celle utilisée pour l'analyse du mélange de cinq composés, est utilisée pour mesurer la composition d'un sérum. Deux dilutions (facteurs 10 et 100) du sérum sont analysées en duplicat directement par l'ICP-OES, sans les étapes de séchage sur papier puis d'élution dans la puce microfluidique. Les concentrations mesurées pour chaque élément (calcium, fer, potassium, magnésium, sodium) sont corrigées par le facteur de dilution et moyennées. Les résultats sont rassemblés dans le tableau présenté en figure 4.26, et comparés aux valeurs biologiques normales.

Composé	Ca	Fe	K	Mg	Na
Mesure par l'ICP-OES (ppm)	139 ± 9	2,02 ± 0,2	339 ± 43	27,3 ± 1	5600 ± 58
Gammes de valeurs biologiques (ppm)	85 - 105	10 <sup>-3</sup>	136 - 185	18 - 24	3126 - 3287

**Figure 4.26** – Comparaison des concentrations de chaque élément dans le sérum avec les valeurs normales biologiques.

Globalement, chaque élément est présent dans le sérum à une concentration cohérente avec la réalité biologique. En comparant les valeurs plus en détail, les mesures par l'ICP-OES sont systématiquement plus élevées que les gammes de valeurs normales. Comme la composition du sérum est inconnue, sans analyse complémentaire, il n'est pas possible de conclure si ces erreurs sont dues au sérum ou à la calibration de l'ICP-OES.

Ce même sérum est séché pendant trois jours sur papier Whatman. Son élution est mesurée par l'ICP-OES aux mêmes réglages que ceux utilisés pour le mélange de cinq composés. La même expérience est réalisée à partir d'une dilution d'un facteur 10 de ce sérum. Les courbes d'élution de ces deux configurations sont présentées en figure 4.27.

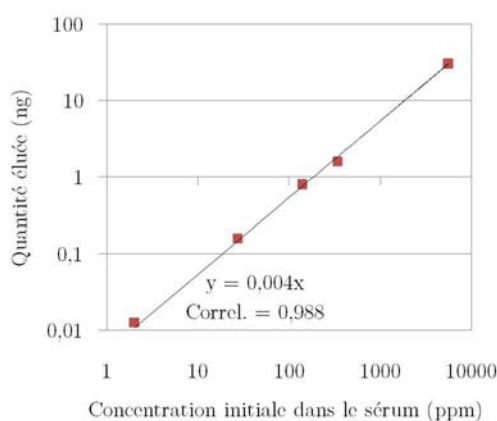


**Figure 4.27** – Courbes d'élution du sérum pur et dilué d'un facteur 10.

Pour le sérum pur, l'élution du sodium atteint des concentrations qui font saturer le détecteur pendant toute la première minute. Pour les éléments calcium et potassium, les courbes d'élution sont dans la bonne gamme de détection. Le fer et le magnésium restent à des concentrations faibles, proches de la limite de détection.

Dans le cas du sérum dilué, toutes les courbes d'élution ont une valeur maximale et un temps de décroissance caractéristique plus faibles que dans le cas du sérum pur. L'élution du sodium n'atteint pas la limite de saturation de l'ICP-OES mais les éléments fer et magnésium sont quasiment indétectables.

L'intégration des courbes d'élution permet de calculer la quantité de matière éluee pour chaque élément. La figure 4.28 présente une courbe comparative de la quantité éluee (pour chaque élément) en fonction de sa concentration initiale dans le sérum. Les données sont issues de la courbe d'élution du sérum pur, sauf pour l'élément sodium pour lequel c'est l'intégration de la courbe d'élution du sérum dilué 10 fois qui est utilisée et corrigée d'un facteur 10.



**Figure 4.28** – Analyse quantitative de la quantité de matière éluee pour chaque élément en fonction de leur concentration initiale dans le sérum.

La relation linéaire obtenue entre la quantité de matière éluee et la concentration initiale dans le sérum, illustre la fiabilité du dispositif pour la mesure de mélanges de composition inconnue.

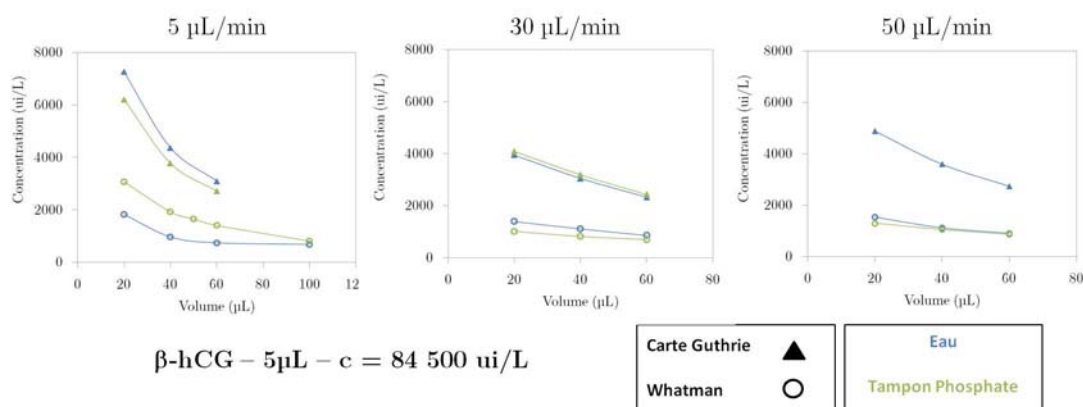


### 4.3.3 Application à l'éluion de la $\beta$ -hCG

La protéine  $\beta$ -hCG est une hormone caractéristique de la grossesse chez les femmes. C'est aussi un biomarqueur tumoral chez l'homme et elle est utilisée pour le dépistage du syndrome de Down (trisomie 21) chez l'enfant. La caractérisation de l'éluion est réalisée de manière discrète sur des volumes successifs de 20  $\mu$ L (mesurés par immunoessais) et selon différentes conditions expérimentales.

#### Paramètres d'intérêt

La figure 4.29 présente les résultats d'éluion de 5  $\mu$ L d'un sérum contenant la protéine  $\beta$ -hCG à une concentration de 84 500 ui/L, séché sur papier Whatman ou sur carte Guthrie. L'éluion est réalisée avec de l'eau ou une solution tampon phosphate (PBS), à différents débits.



**Figure 4.29** – Eluion de  $\beta$ -hCG selon le débit, la nature de la solution d'éluion et le type de papier.

Comme dans les cas précédents (fluorescence et analyse élémentaire), l'éluion est beaucoup plus efficace aux faibles débits qui limitent les effets de dilution. Toutes les expériences montrent que les cartes Guthrie sont plus adaptées à la désorption des protéines : l'éluion est moins efficace avec le papier Whatman. Enfin, les différences d'éluion avec l'eau ou la solution tampon ne sont pas significatives.

A partir des cartes Guthrie, l'influence d'un traitement de surface est observé (figure 4.30). Le sérum est déposé directement sur le papier (cellulose) ou après un pré-traitement à base d'ADN ou de BSA. En parallèle, deux configurations sont comparées : les 5  $\mu$ L de sérum sont séchés sur un disque de papier (format confetti) ou sur une carte Guthrie qui est perforée dans un second temps. Dans le premier format, l'intégralité de l'échantillon est contenue dans le disque qui sera élué alors que dans le second format, la perforation sélectionne une partie seulement de l'échantillon. L'éluion donne donc de meilleurs résultats dans la configuration confetti puisque l'échantillon y est plus concentré.

Expérimentalement, les traitements de surface utilisés pour faciliter la désorption ne sont pas efficaces. Au contraire, l'échantillon est moins élué en présence d'ADN ou de BSA.

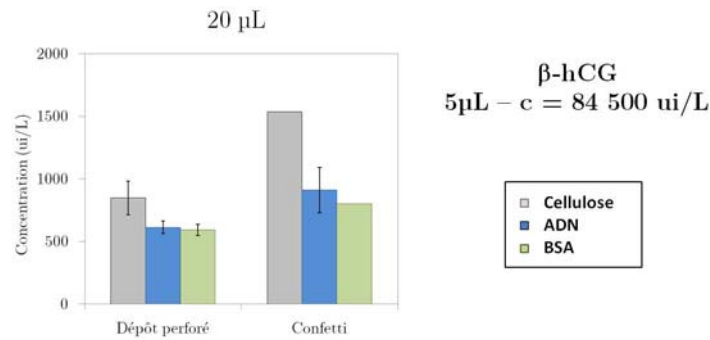


Figure 4.30 – Elution de  $\beta$ -hCG selon le format du papier et le traitement de surface.

### Diagramme de performances

Dans ces expériences d'élution, les grandeurs d'intérêt pour caractériser l'échantillon élué sont la quantité de matière effectivement remise en solution (relativement à la quantité initiale) et sa concentration finale dans le microtube. Expérimentalement, ces grandeurs dépendent du débit d'élution et du volume de solution nécessaire à l'élution (qui est équivalent à la durée de l'expérience).

Un diagramme de phase est proposé en figure 4.31 et représente les performances d'élution en termes de quantité éluee ou de concentration finale, en fonction des paramètres de débit et de volume d'élution.

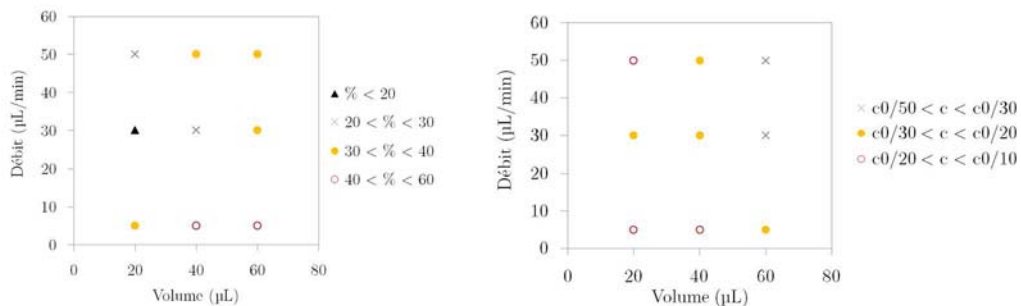


Figure 4.31 – Performances d'élution en termes de quantité éluee et de concentration finale selon les paramètres expérimentaux.

Dans tous les cas, une élution à un faible débit est responsable d'une plus grande quantité de matière éluee tout en limitant la dilution. Afin d'éluer le plus quantitativement possible l'échantillon séché, un grand volume d'élution est nécessaire. A l'inverse, pour obtenir un éluat très concentré, il faut limiter l'élution au pic initial dans un petit volume.

Dans le cas de la protéine  $\beta$ -hCG, dans les meilleures conditions, 50% de l'échantillon est élué et la concentration dans le microtube finale est diluée d'un facteur 15 par rapport au dépôt initial.

## 4.4 Ce qu'il faut retenir

**Jonction papier-microcanal** L'association du papier avec une puce microfluidique est réalisée dans deux formats. La bandelette de papier insérée comme un nouveau dispositif d'entrée de microsystème impose une gestion des écoulements par la sortie. Le disque de papier peut être intégré à l'intérieur de n'importe quelle géométrie sans modifier les diagrammes de phase. Une grande variété de fonctions microfluidiques sont compatibles avec ces jonctions papier-microcanaux comme des écoulements monophasiques ou diphasiques et des mélanges avec des réactifs.

**Elution d'échantillons séchés** Ces deux configurations peuvent être utilisées pour libérer progressivement, au sein de l'écoulement, un échantillon séché. Cette élution n'est pas constante au cours du temps : elle prend toujours la forme d'un pic d'élution suivi d'une décroissance exponentielle. L'élution de trois types d'échantillons a été étudiée par une méthode de détection directe dans le microcanal (imagerie de fluorescence), par une analyse en ligne en sortie du microsystème (analyse élémentaire) ou par une mesure discrète après fragmentation du liquide en sortie de puce microfluidique (immunoessais), comme présenté dans la figure 4.32.



**Figure 4.32** – Conditions de mesures de l'éluat selon le type de composé.

Dans tous les cas, un débit faible (de l'ordre de  $5 \mu\text{L}/\text{min}$ ) contribue à une élution maximale de l'échantillon dans un petit volume de solvant. Les meilleures performances d'élution pour chaque type de composé sont résumées dans la figure 4.33. Les quantités d'échantillon élué varient de 45 à 80% et le facteur de dilution est au mieux de 10. Ces expériences réalisées en quelques minutes donnent des résultats similaires à une élution passive de plusieurs heures en plaque multipuits.

**Applications** Ce travail sur l'élution d'échantillons séchés s'inscrit dans une démarche de généralisation des prélèvements sanguins du nourrisson. Applicable à l'ensemble de la population, ce type de prélèvements peut être réalisé n'importe où par le personnel médical ou le patient lui-même. La nature de l'échantillon biologique peut être diversifiée (sang, salive, urine, sueur) pour s'approcher de prélèvements les moins invasifs possibles.

Compatible avec la microfluidique papier, l'élution d'échantillon séché peut être réalisée dans un second temps, en complément d'un test instantané. Les premières informations de diagnostic

Echantillon	Quantité éluée	Facteur de dilution
Fluorescéine	80 %	$c_{ini} / 10$
Métaux et Minéraux	45 %	$c_{ini} / 20$
Protéine	50 %	$c_{ini} / 25$

**Figure 4.33** – Performances d'élution par type d'échantillon.

au chevet du patient sont confirmées et complétées par d'autres analyses de laboratoire après transport du dispositif papier. La technique d'élution par un microsystème donne accès à un ensemble de fonctions et d'attraits de la microfluidique : analyse en ligne directement dans la puce, fragmentation de l'échantillon en gouttes, mélange avec des réactifs. Miniaturisation et automatisation sont directement accessibles.

Dans une microfluidique indépendante de toute application médicale, le papier apporte de nouvelles fonctionnalités. Des réactifs séchés sur papier sont plus faciles à manipuler et à conserver. La puce microfluidique peut devenir prête à l'emploi en utilisant seulement de l'eau pour alimenter les microcanaux.



## Troisième partie

Réalisation d'outils de diagnostic  
médical sur papier : de la troponine au  
virus Ebola



---

## Détection d'un biomarqueur cardiaque par un immunoessai sur papier

---

### Table des matières

---

5.1	Conditions expérimentales . . . . .	<b>135</b>
5.1.1	Réaction biologique . . . . .	135
5.1.2	Dispositif papier . . . . .	136
5.1.3	Protocole . . . . .	136
5.2	Réalisation d'un immunoessai sur papier pour la détection de troponine . .	<b>137</b>
5.2.1	Description du principe de fonctionnement . . . . .	137
	En théorie . . . . .	137
	En pratique . . . . .	138
5.2.2	Synthèse des principaux résultats expérimentaux . . . . .	139
	Paramètres d'intérêt sur les réactifs . . . . .	139
	Dépendance aux conditions extérieures . . . . .	141
	Influence de la géométrie . . . . .	142
	Mesure de la limite de détection . . . . .	143
5.3	Ce qu'il faut retenir . . . . .	<b>145</b>

---





La réalisation d'immunoessais sur bandelettes est un dispositif qui répond à tous les critères pour un diagnostic au chevet du patient. La réduction du temps de traitement - délai entre la décision d'un test biologique et la mise en place des actions découlant du résultat - est vitale dans le cas d'urgences médicales. Par exemple, une douleur à la poitrine peut être un signe précurseur d'un infarctus du myocarde ou d'une angine de poitrine. Une détection de la troponine dans le sang permet de lever l'ambiguïté.

Il existe des dispositifs de diagnostic rapides commerciaux aux excellentes performances (limite de détection de l'ordre de 10 pg/mL). Mais le prix des dispositifs portables de détection (US\$ 10 000) empêche leur utilisation à plus large échelle.

Le contrôle des écoulements dans le papier par les nouvelles techniques de fabrication doit permettre de dépasser le format unidirectionnel des bandelettes. Un immunoessai colorimétrique de la troponine est développé sur papier en adaptant les techniques de concentration décrites dans le chapitre 3. L'objectif est de créer un dispositif de diagnostic très sensible et utilisable sans instrumentation.

Les expériences de détection de la troponine sur papier ont été réalisées à partir de réactifs fournis par bioMérieux et font partie du travail de stage de Claire Albert.

## 5.1 Conditions expérimentales

### 5.1.1 Réaction biologique

L'immunoessai mis en œuvre sur le papier est un test ELISA dans le format sandwich (figure 5.1). La troponine est le biomarqueur recherché. Cet antigène peut être reconnu par deux anticorps sur deux épitopes différents. Cette double reconnaissance permet la formation du complexe anticorps-antigène-anticorps.

Le premier anticorps est adsorbé sur une surface de sorte à l'immobiliser sur le support. C'est l'anticorps de capture. Le second anticorps n'est pas fixé et porte une fonction additionnelle source d'un signal. Il s'agit de l'anticorps de détection.

Le principe des tests ELISA est d'amplifier le signal de l'anticorps de détection par une activité enzymatique. L'enzyme utilisée est la phosphatase alcaline (PAL) qui transforme le substrat Western Blue Stabilized (BCIP-NBT) initialement soluble et transparent, en un produit bleu précipitant. Elle est conjuguée à l'anticorps de détection.

L'apparition de la coloration bleue est caractéristique de l'activité de l'enzyme en présence du substrat. Ce n'est pas un signal directement spécifique de la troponine. En effet, la rencontre de l'anticorps de détection avec le substrat permet l'activité enzymatique, que la troponine soit présente ou non. Le caractère spécifique lié à la troponine est obtenu si le signal bleu est localisé sur les anticorps de capture.

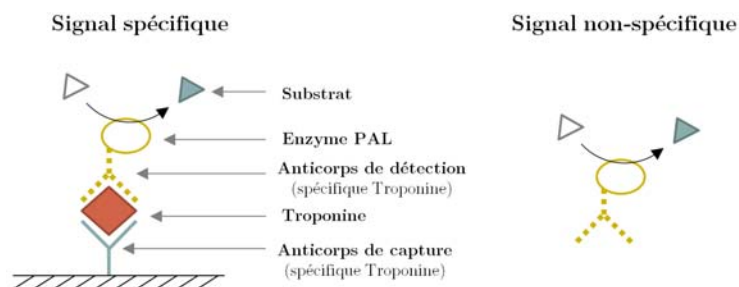


Figure 5.1 – Schéma du test ELISA pour la détection de troponine et spécificité du signal.

### 5.1.2 Dispositif papier

La géométrie de la puce papier est une variation à partir du motif de buse utilisé dans le chapitre 3. A partir des mesures avec la fluorescéine, nous avons montré que ce dispositif permet une amplification de signal d'un facteur 1000 par concentration d'un analyte en un point de focalisation.

Pour réaliser l'immunoessai sur papier, la buse est modifiée de sorte à contenir deux zones de dépôts de goutte : l'une petite pour l'échantillon, l'autre grande pour le solvant, comme le montre la figure 5.2. Le réservoir d'eau ainsi constitué assure le transport complet de tout l'échantillon à travers la focalisation hydrodynamique sans nécessité de multiples dépôts de gouttes.

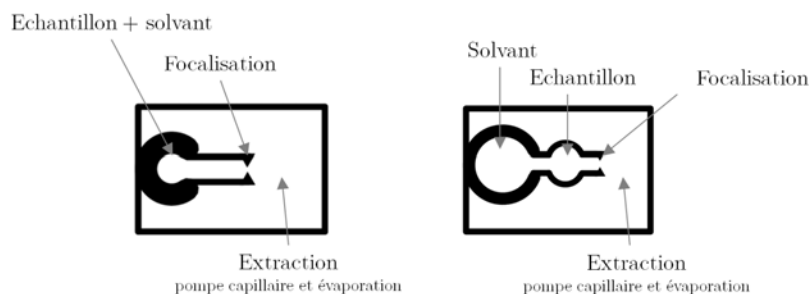


Figure 5.2 – Variation de la géométrie de buse pour la réalisation de l'immunoessai.

Pour isoler l'écoulement de la paillasse, le papier est utilisé sur un support qui surélève le papier de quelques millimètres.

Plusieurs variations géométriques sont envisagées concernant la longueur et la largeur du dispositif, le diamètre des zones de dépôt ou la présence de barrières de surface autour des zones de dépôt.

### 5.1.3 Protocole

La préparation de la puce papier consiste à stocker les réactifs de l'immunoessai dans le papier de sorte à la rendre fonctionnelle et prête à l'emploi. Des volumes contrôlés d'anticorps de détection couplés à l'enzyme (0,5  $\mu\text{L}$ ), d'anticorps de capture (0,5  $\mu\text{L}$ ) et de substrat (5  $\mu\text{L}$ ) sont déposés à différents endroits de la géométrie papier. Ces dépôts sont séchés à l'étuve

(Memmert 200) pendant 10 minutes à 50 °C. Le papier est ainsi prêt pour une expérience ultérieure. Les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus sur des papiers préparés dans la même demie-journée. La question de la conservation n'a pas été abordée à plus long terme.

Lors de l'expérience, 5  $\mu$ L d'échantillon sont déposés dans le puits central. L'échantillon est constitué de différentes dilutions de troponine dans des extraits de plasma humain. Après quelques secondes, 50  $\mu$ L d'eau millipore sont ajoutés dans le puits de solvant. La pompe capillaire qui transporte les réactifs et l'échantillon ainsi que l'activité enzymatique nécessitent un délai de 20 minutes avant détection. L'apparition de la couleur bleue de substrat est visualisée directement à l'œil nu. Des photos prises avec un smartphone ou une caméra Pixelink et un objectif macroscopique permettent une analyse d'image avec ImageJ.

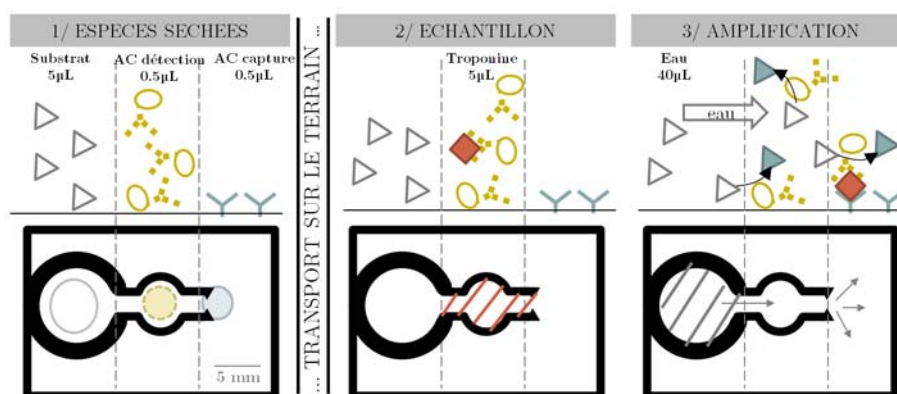
## 5.2 Réalisation d'un immunoessai sur papier pour la détection de troponine

### 5.2.1 Description du principe de fonctionnement

#### En théorie

Le fonctionnement théorique de la puce microfluidique pour la détection de troponine sur papier est présenté en figure 5.3.

Le substrat est stocké dans la zone de dépôt de solvant, l'anticorps de détection dans la zone de dépôt échantillon, et l'anticorps de capture au niveau de la focalisation hydrodynamique. Une fois secs, les réactifs sont conservés dans le papier jusqu'à utilisation du dispositif papier.



**Figure 5.3** – Localisation des réactifs dans la géométrie papier et réalisation de l'immunoessai.

L'ajout d'échantillon dans le puits central remet en solution les anticorps de détection conjugués à l'enzyme. Le complexe antigène-anticorps se forme si l'échantillon contient la troponine. Le faible volume de ce dépôt (5  $\mu$ L) permet une réhydratation limitée : le liquide se répartit dans le puits central et éventuellement dans le microcanal papier mais n'atteint pas le puits de solvant ni l'extérieur de la focalisation.

L'ajout d'eau dans le puits de solvant assure deux fonctions : d'une part le transport de l'échantillon à travers la zone de focalisation contenant les anticorps de capture ; d'autre part, la réhydratation du substrat qui est alors aussi transporté par l'écoulement. Ce second dépôt est réalisé dans la minute qui suit le premier dépôt.

La pompe capillaire en sortie de focalisation hydrodynamique maintient un écoulement pour faire circuler l'échantillon et tous les réactifs au-dessus du point de focalisation.

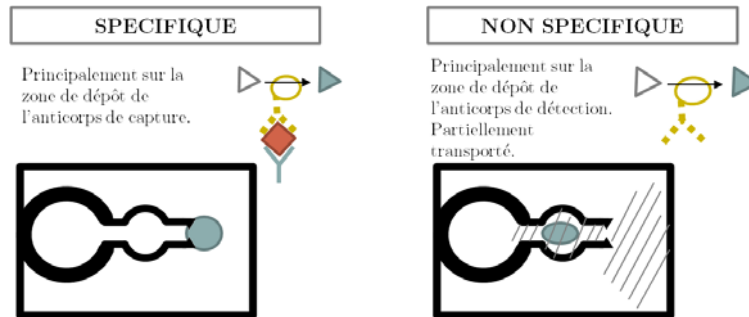


Figure 5.4 – Origine et localisation des signaux spécifiques/non spécifiques de la présence de troponine.

La transformation du substrat par l'enzyme PAL est spécifique de la présence de troponine si le signal est localisé au niveau des anticorps de capture. La simple rencontre de l'enzyme avec le substrat produit un signal non spécifique qui est réparti sur la zone de dépôt des anticorps de détection et dans tout l'écoulement. Le caractère précipitant du substrat transformé l'empêche d'être transporté par l'écoulement. Cependant, le signal non spécifique peut être responsable d'un bruit de fond au-dessus des anticorps de capture, comme le montre la figure 5.4.

### En pratique

Suivant le protocole expérimental décrit précédemment, des expériences de détection de la troponine sur papier sont réalisées avec des échantillons témoins négatifs et positifs (250 ng/mL). Les écoulements initialement incolores révèlent après 20 minutes plusieurs zones colorées (figure 5.5).

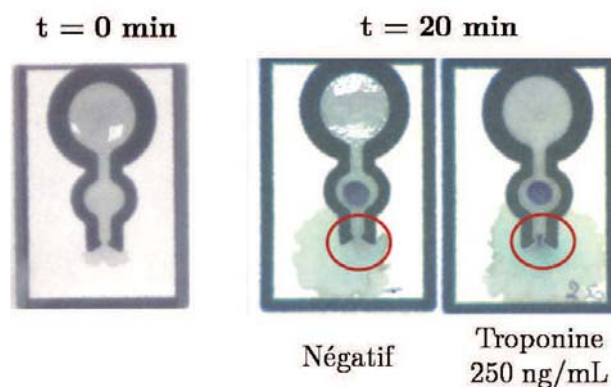


Figure 5.5 – Détection de troponine sur papier.

Un bleu-violet intense apparaît sur la zone de dépôt des anticorps de détection - signal non spécifique de la troponine - et au niveau de la focalisation hydrodynamique si l'échantillon est positif.

Après traitement d'image, une mesure de l'intensité de signal le long de l'écoulement permet de quantifier l'activité enzymatique. Au niveau des anticorps de capture, la présence de troponine à une concentration de 250 ng/mL est bien responsable d'un signal spécifique qui se dégage du niveau de bruit des signaux non spécifiques.

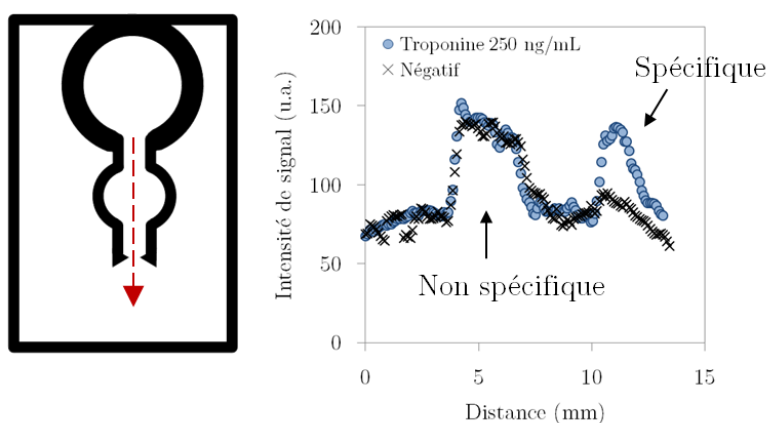


Figure 5.6 – Mesure de l'intensité de signal le long du dispositif papier.

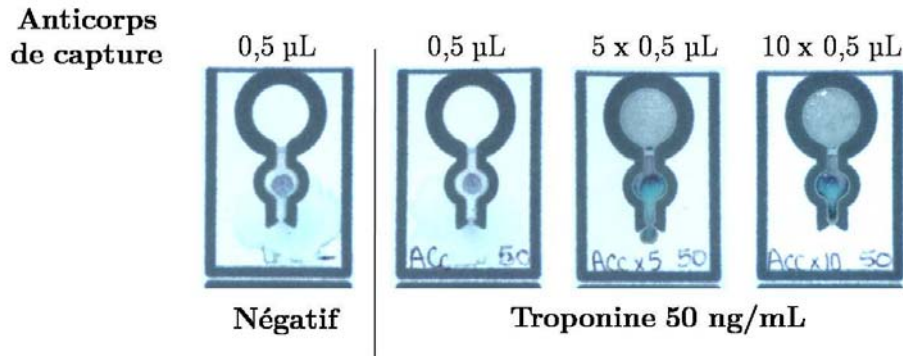
### 5.2.2 Synthèse des principaux résultats expérimentaux

Des expériences sont réalisées en variant des paramètres expérimentaux tels que la quantité et la position des réactifs, la géométrie des barrières de cire, les conditions de séchage et d'hygrométrie. Les objectifs sont de comprendre les mécanismes essentiels pour la bonne réalisation de l'immunoessai et d'atteindre une limite de détection à 1 ng/mL.

#### Paramètres d'intérêt sur les réactifs

Pour un immunoessai performant les anticorps de capture doivent rester accrochés aux surfaces de fibres de cellulose. Si des greffages chimiques existent, ici seule l'adsorption physique passive est utilisée. Augmenter la quantité d'anticorps de capture déposée devrait maximiser la quantité d'anticorps fixés au point de focalisation.

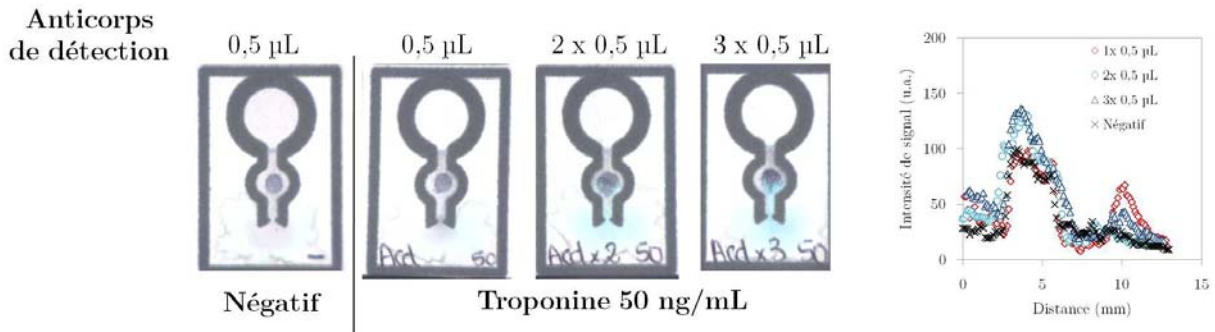
Expérimentalement, la quantité d'anticorps de capture au point de focalisation est variée en multipliant les dépôts de 0,5  $\mu\text{L}$  à partir de la même solution concentrée (figure 5.7). La présence d'une grande quantité d'anticorps de capture nuit à l'écoulement à travers la focalisation hydrodynamique. Un bouchon visqueux bloque l'écoulement qui n'atteint plus l'extérieur du microcanal papier.



**Figure 5.7** – Détection de la troponine sur papier ( $c = 50$  ng/mL) avec différentes quantités d'anticorps de capture ( $0,5 \mu\text{L}$ ,  $5 \times 0,5 \mu\text{L}$ ,  $10 \times 0,5 \mu\text{L}$ ).

A l'inverse, les anticorps de détection doivent rester mobiles. Le signal non spécifique intense dans la zone de dépôt montre qu'une grande partie de ces anticorps sont adsorbés sur les fibres de cellulose. Augmenter la quantité d'anticorps de détection doit permettre de saturer les surfaces de cellulose et d'obtenir une plus grande quantité d'anticorps mobiles.

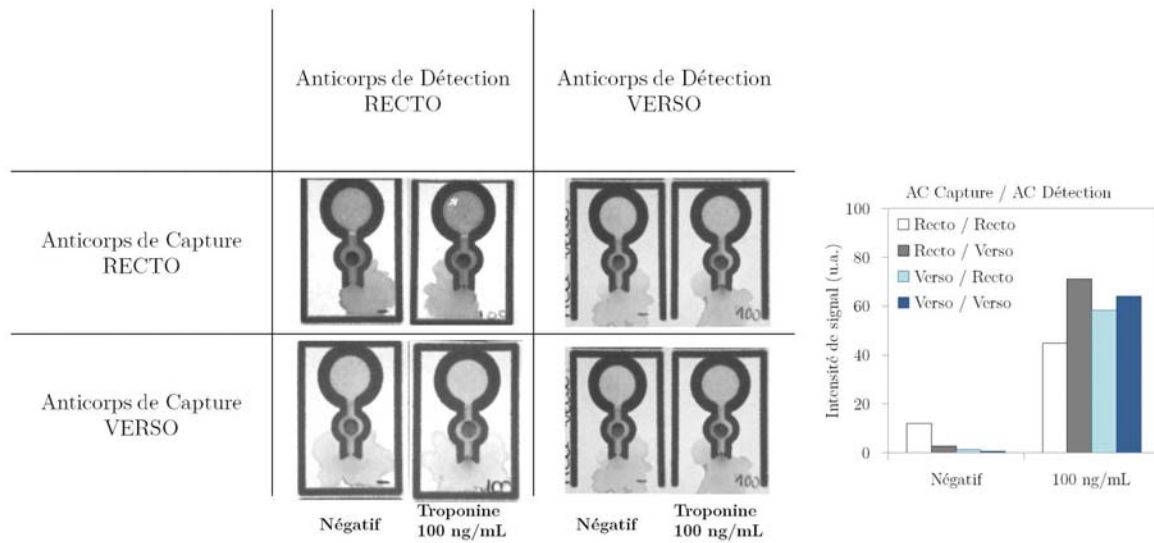
Plusieurs dépôts de  $0,5 \mu\text{L}$  de la même solution d'anticorps de détection sont réalisés dans le puits central (figure 5.8). La détection d'une solution de troponine ( $c = 50$  ng/mL) n'est pas améliorée par de multiples dépôts d'anticorps de détection. Au contraire, le bruit de fond non spécifique augmente.



**Figure 5.8** – Détection de la troponine sur papier ( $c = 50$  ng/mL) avec différentes quantités d'anticorps de détection ( $0,5 \mu\text{L}$ ,  $2 \times 0,5 \mu\text{L}$ ,  $3 \times 0,5 \mu\text{L}$ ).

Dans le chapitre 3, nous avons mis en évidence deux contributions aux écoulements dans le papier : l'étalement en surface et l'imbibition en volume. Afin de vérifier la part de ces phénomènes dans l'immunoessai sur papier, la position des dépôts d'anticorps est variée sur le recto et le verso de la feuille (figure 5.9). Le recto est défini comme la face du papier sur laquelle sont déposés l'échantillon et l'eau.

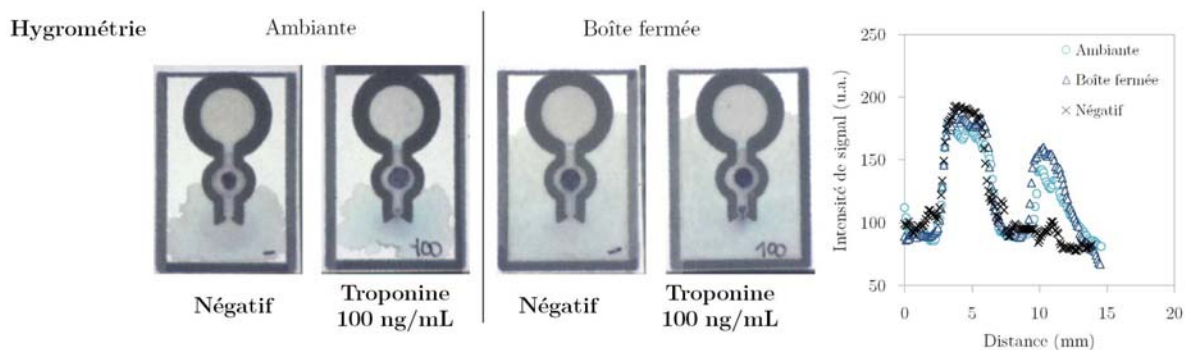
Dans toutes les configurations envisagées, il n'y a pas de différence significative dans la détection de troponine ( $c = 100$  ng/mL). Le transport des réactifs et la formation du complexe anticorps-antigène-anticorps ont donc lieu majoritairement en volume dans le milieu poreux plutôt qu'en surface par étalement de goutte.



**Figure 5.9** – Détection de la troponine sur papier ( $c = 100 \text{ ng/mL}$ ) selon la position des dépôts d'anticorps sur le recto ou sur le verso de la puce papier.

### Dépendance aux conditions extérieures

Les expériences de détection de troponine sur papier ont été réalisées à température ambiante dans deux types de configuration : à l'air libre ou à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Dans le premier cas, l'hygrométrie ambiante et la circulation d'air favorisent l'évaporation. Dans le second cas, les dépôts de goutte de 5 et 50  $\mu\text{L}$  créent rapidement un environnement humide dans la boîte qui limite l'évaporation. Pour une même durée d'expérience, l'écoulement se répartit sur une plus grande surface en l'absence d'évaporation (figure 5.10). Le signal spécifique lié à la troponine apparaît également plus intense.



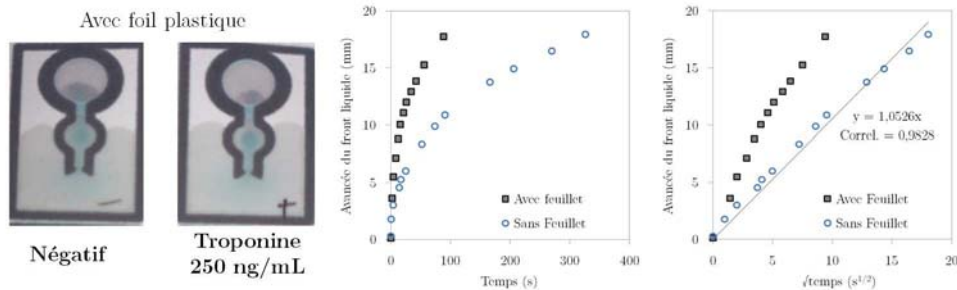
**Figure 5.10** – Détection de troponine sur papier ( $c = 100 \text{ ng/mL}$ ) selon l'hygrométrie ambiante.

Des feuillets plastique transparents et adhésifs sont souvent utilisés dans les dispositifs papier pour isoler l'écoulement, protéger les réactifs, limiter l'évaporation. Mais la présence de ces feuillets modifie l'écoulement. Le suivi de l'avancée du front liquide avec ou sans feuillet est présenté en figure 5.11.

L'écoulement beaucoup plus rapide en présence du feuillet n'est pas favorable à la détection de troponine sur papier. La couleur bleue caractéristique de la transformation du substrat apparaît



faiblement. La concentration seuil de précipitation ne semble pas atteinte puisqu'une partie du substrat transformé est transporté par l'écoulement. La distinction spécifique / non-spécifique n'est donc pas possible dans ces conditions.

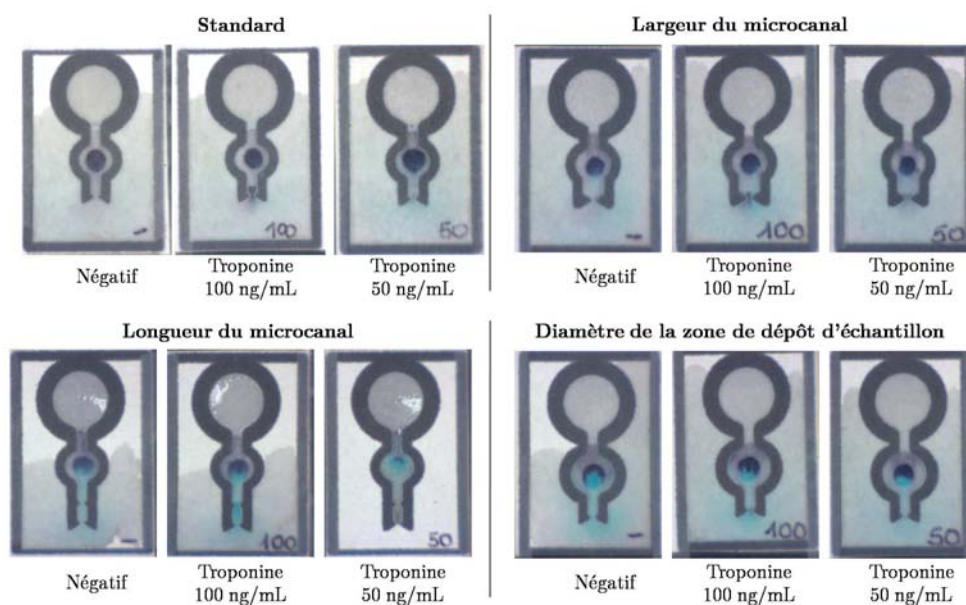


**Figure 5.11** – Influence d'un feuillet adhésif au verso du papier sur la détection de troponine et la vitesse d'écoulement.

### Influence de la géométrie

A partir de la géométrie présentée en figure 5.2, plusieurs variations sont envisagées pour améliorer la détection de troponine sur papier (figure 5.12).

Avec un microcanal plus large, les pertes sur les bords sont limitées. En revanche, l'association du microcanal avec la zone de dépôt de goutte favorise l'étalement en surface de l'échantillon. Cet effet est défavorable à la détection puisque l'immunoessai a lieu plus dans le volume du papier qu'en surface. Expérimentalement, il n'y a pas de différence significative dans la détection de la troponine par rapport au format standard, que ce soit en termes de rapport signal / bruit ou de limite de détection.

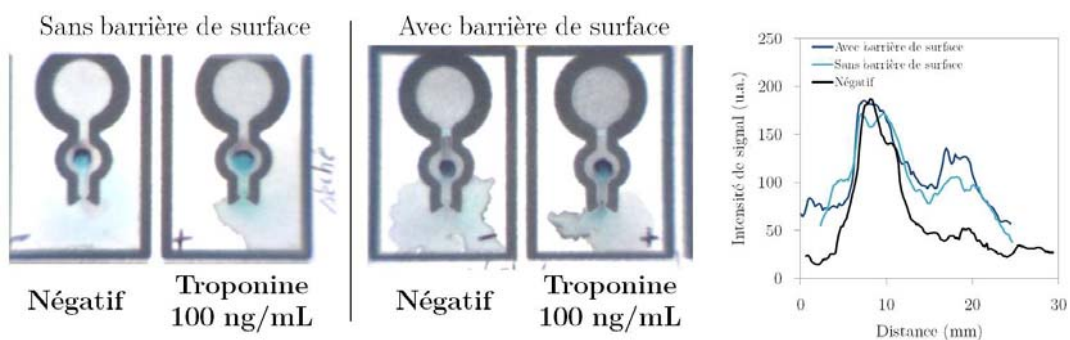


**Figure 5.12** – Variations géométriques pour la détection de troponine sur papier.

Avec un microcanal plus long, l'objectif est de retenir le substrat transformé plus longtemps afin de voir se former le précipité. Avec un échantillon de troponine concentré à 100 ng/mL, le signal spécifique reste bleu clair, peu contrasté et dispersé spatialement. Un microcanal long est responsable d'un écoulement plus lent qui provoque, dans certains cas, un bouchon visqueux.

Des expériences réalisées avec une zone de dépôt d'échantillon plus grande ne donnent pas non plus de meilleurs résultats.

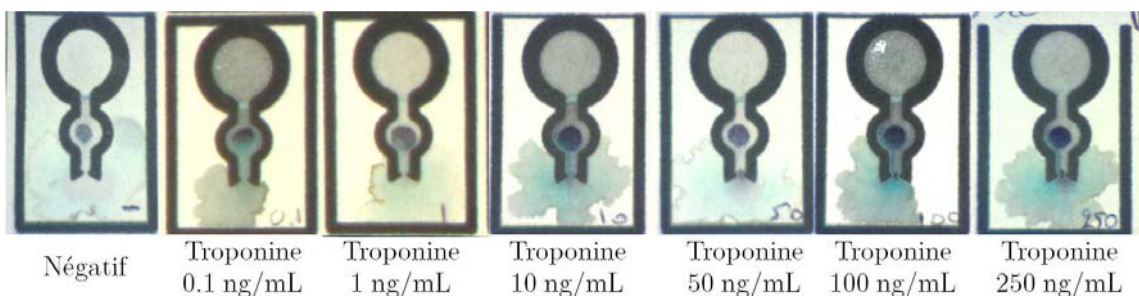
Les effets d'une barrière de surface autour de la zone de dépôt de solvant sont étudiés en figure 5.13. Sans la barrière, l'eau s'écoule rapidement grâce à l'étalement en surface, ce qui facilite le transport de l'échantillon vers la zone de focalisation. Avec la barrière, l'imbibition d'eau dans le papier est plus favorable à la désorption du substrat séché. Expérimentalement, le signal spécifique est plus intense lorsque l'écoulement se fait en volume et non en surface.



**Figure 5.13** – Influence de la présence d'une barrière de surface autour de la zone de dépôt de solvant pour la détection de troponine ( $c = 100 \text{ ng/mL}$ ).

### Mesure de la limite de détection

L'immunoessai sur papier est réalisé pour des solutions échantillons de plasma humain contenant différentes dilutions de troponine. Les concentrations en biomarqueur sont comprises entre 0.1 et 250 ng/mL. Les photos des expériences après 20 minutes sont présentées en figure 5.14. La révélation colorimétrique de la transformation du substrat par l'activité enzymatique permet une détection visuelle du signal spécifique jusqu'à une limite de détection de 50 ng/mL de manière certaine et 10 ng/mL pour un opérateur expert.



**Figure 5.14** – Limite de détection de la troponine sur papier par analyse visuelle.

Un traitement d'image des photos d'expérience consiste à mesurer l'intensité de signal le long du dispositif papier à travers la zone de focalisation. L'intensité maximale du signal spécifique est comparée selon la concentration en troponine (figure 5.15). Dans ces conditions, une limite de détection plus basse est atteinte, soit 1 ng/mL.

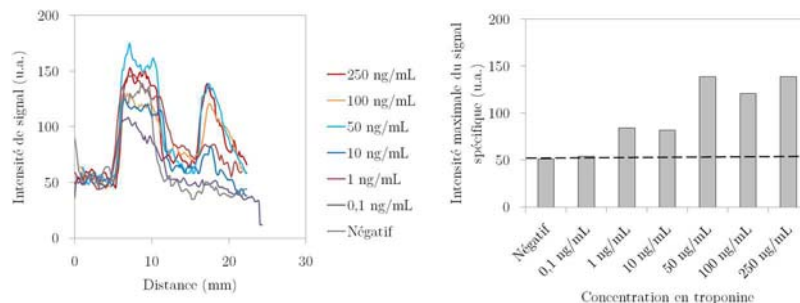


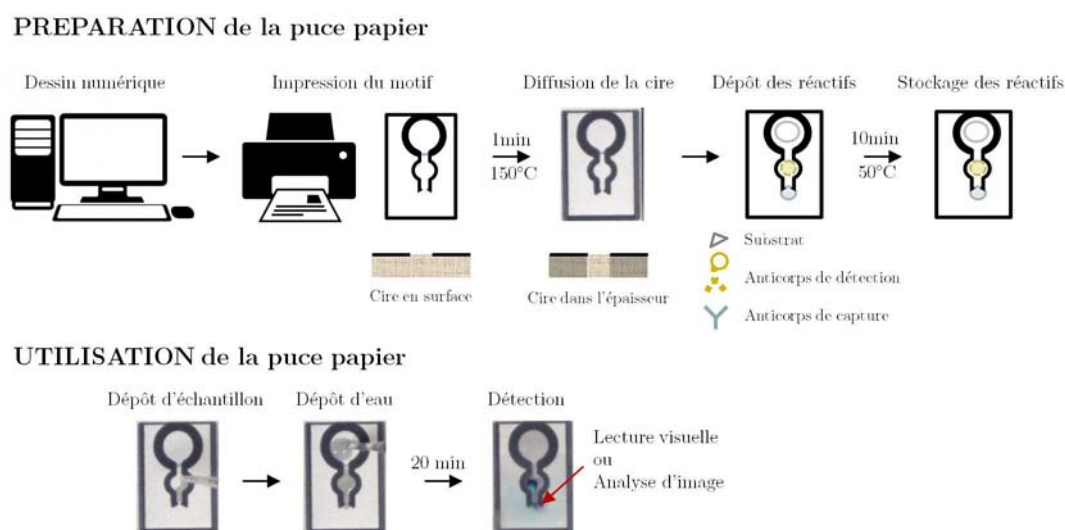
Figure 5.15 – Limite de détection de la troponine sur papier par analyse d'image.

## 5.3 Ce qu'il faut retenir

**Immunoessais sur papier** Le dispositif papier développé permet la réalisation d'un immunoessai pour la détection d'un biomarqueur cardiaque : la troponine (figure 5.16).

Comme dans le cas des tests bandelettes, les réactifs sont séchés et stockés dans le milieu poreux jusqu'au moment du diagnostic. L'utilisation du dispositif papier reste très simple et consiste à déposer une goutte d'échantillon et une goutte d'eau. Les échantillons utilisés sont des extraits de plasma humain qui peuvent être obtenus par simple filtration de sang total.

Après 20 minutes, la révélation colorimétrique du test permet une lecture visuelle du résultat. Ce dispositif papier s'inscrit donc bien dans les critères de diagnostic au chevet du patient avec une instrumentation externe limitée. La fabrication même de la puce papier est très simple par la technique d'impression de cire sur papier Whatman et le dépôt de réactifs. La géométrie proposée peut être modifiée pour détecter en parallèle plusieurs biomarqueurs d'intérêt.



**Figure 5.16** – Etapes de préparation et d'utilisation de la puce papier pour la détection de troponine.

**Intérêt diagnostique** La pertinence d'un instrument de diagnostic relève des conditions pratiques d'utilisation et de ses performances analytiques.

Par analyse visuelle, le dispositif papier peut s'utiliser sans aucune instrumentation. Cependant, la limite de détection atteinte sur papier (10 ng/mL) n'est pas suffisante et reste subjective selon l'opérateur. Pour des biomarqueurs très concentrés, le test peut être acceptable. Dans le cas de la troponine, l'objectif est un diagnostic aussi précoce que possible et donc une détection aux concentrations faibles.

Par simple analyse d'image, réalisable avec un smartphone, il est possible d'abaisser cette limite de détection d'un facteur 10. Avec cette instrumentation minimale, le critère de diagnostic devient plus objectif, non soumis au jugement de l'opérateur.

Pourtant la réalisation d'immunoessais par la microfluidique papier n'est pas une innovation de rupture par rapport aux tests bandelettes concurrents aux meilleures performances. Ceci s'explique par des années de développement et d'optimisation : notamment le contrôle des états de surface, la biochimie des matériaux, le stockage et la conservation des réactifs.



---

Application au diagnostic précoce de maladies infectieuses par la  
biologie moléculaire sur papier

---

**Table des matières**


---

6.1	Conditions expérimentales . . . . .	<b>150</b>
6.1.1	Protocoles biologiques . . . . .	150
	LAMP : Loop-mediated isothermal amplification . . . . .	150
	RT-RPA : Reverse Transcription - Recombinase Proteins Amplification	150
6.1.2	Dispositifs papier . . . . .	152
	Puits individuels . . . . .	152
	Géométries multicouches pour le multiplexage . . . . .	154
6.1.3	Instrumentation . . . . .	156
	Au laboratoire . . . . .	156
	En Guinée . . . . .	157
	Comparaison des deux systèmes de détection . . . . .	158
6.2	Réalisation de l'amplification LAMP sur papier . . . . .	<b>160</b>
6.2.1	Caractérisation de la LAMP en microtube . . . . .	160
	Courbes d'amplification d'ADN . . . . .	160
	Sensibilité et dépendance en température . . . . .	161
6.2.2	Etude de la compatibilité avec les matériaux des puces papier . . . . .	162
	Recherche d'inhibiteurs d'amplification . . . . .	162
	Interactions papier-intercalant . . . . .	164
6.2.3	Réaction LAMP sur papier . . . . .	166
	Effets de la température . . . . .	167
	Amplification sans intercalant . . . . .	168
6.3	Détection d'ARN Ebola par RT-RPA sur papier . . . . .	<b>169</b>
6.3.1	Caractérisation de la RT-RPA en microtube . . . . .	169
	Courbes d'amplification d'ARN . . . . .	169

---

	Sensibilité et dépendance en température . . . . .	170
	Recherche d'inhibiteurs d'amplification . . . . .	171
6.3.2	Réaction RT-RPA sur papier . . . . .	171
	Stockage des réactifs . . . . .	171
	Réhydratation des réactifs . . . . .	174
	Sensibilité et conservation . . . . .	175
	Choix des primers . . . . .	176
	Outils de diagnostic . . . . .	177
6.3.3	Expériences sur des échantillons cliniques en Guinée . . . . .	179
	Conditions d'expériences . . . . .	179
	Résultats expérimentaux . . . . .	180
	Analyse statistique . . . . .	181
	Conclusions sur les résultats obtenus en Guinée . . . . .	184
6.4	Parallélisation des expériences pour un diagnostic multiplexé . . . . .	<b>185</b>
6.4.1	Etude des propriétés d'écoulement . . . . .	185
	Géométrie à trois puits . . . . .	185
	Géométrie à neuf puits . . . . .	188
	Géométrie matricielle à douze puits . . . . .	191
6.4.2	Résultats biologiques . . . . .	193
	Géométrie à trois puits . . . . .	193
	Géométrie à neuf puits . . . . .	195
6.4.3	Bilan du multiplexage . . . . .	197
6.5	RT-RPA pour la détection d'autres pathogènes . . . . .	<b>198</b>
6.5.1	Amplification d'acides nucléiques HIV et Dengue sur papier Whatman	198
	Réaction RT-RPA sur papier . . . . .	198
	A partir de réactifs lyophilisés . . . . .	200
	Bilan des expériences sur papier Whatman . . . . .	201
6.5.2	Influence de l'environnement imposé par le papier . . . . .	203
	Papier Whatman transformé . . . . .	203
	Supports non celluloses . . . . .	204
6.6	Ce qu'il faut retenir . . . . .	<b>206</b>

---

EN ciblant directement le génome du pathogène responsable d'une infection, les techniques d'amplification et de détection des acides nucléiques permettent d'accéder à une fenêtre de diagnostic très précoce. Cependant, les outils de diagnostic actuels restent chers et incompatibles avec des infrastructures limitées. La combinaison des récents développements de la biologie moléculaire avec la microfluidique papier ouvre la perspective de tests de diagnostic rapides, au chevet du patient. Ils répondent à un vrai besoin notamment pour la détection précoce de maladies infectieuses dans des conditions de désert médical.

La récente épidémie Ebola (2014-2015) qui a sévi en Afrique de l'Ouest, est responsable de plus de 11 000 décès dans les trois pays les plus touchés (Guinée, Liberia, Sierra Leone). Le manque d'infrastructures médicales, notamment en régions rurales, a conduit les ONG à établir des solutions temporaires pour diagnostiquer, isoler et soigner les personnes contaminées par le virus. Dans ces conditions, le temps de traitement reste long : de plusieurs heures à une journée.

Ce chapitre rassemble les travaux visant au développement d'outils de diagnostic moléculaire sur papier. Une première étude détaille les conditions de compatibilité des techniques d'amplification d'acides nucléiques avec le support papier. Les résultats sur ARN synthétique, en laboratoire, sont complétés par des expériences en Guinée, à partir d'extraits ARN de patients infectés par le virus Ebola. Enfin, des solutions de multiplexage sont proposées pour la détection parallélisée de plusieurs cibles biologiques.

Ces expériences ont été réalisées grâce à l'expertise de l'Institut Pasteur. Pierre Lafaye et Béatrice Jacquelin, via la *Task Force Ebola*, ont contribué à tous les résultats de détection du virus Ebola et d'HIV. L'équipe de la CIBU (*Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence*), avec Camille Escadafal, Aurélia Kwasiborski, Jean-Claude Manuguerra et Jessica Vanhomwegen, a développé les protocoles d'amplification LAMP et participé aux expériences de détection de la Dengue. Anavaj Sakuntabhai, de l'équipe *Génétique Fonctionnelle des Maladies Infectieuses*, a partagé son expertise sur la réaction RT-RPA, notamment pour le diagnostic de la Dengue. Pierre Garneret, en stage pendant 6 mois au laboratoire, a réalisé les expériences d'analyses RT-RPA multiplexées sur papier et contribué à la détection de l'amplification LAMP sans intercalant.

La collaboration avec l'Institut Pasteur a rendu possible un voyage en Guinée, dans le Centre de Traitement Ebola établi par la Croix Rouge française à Macenta. De nombreuses personnes ont contribué au bon déroulement de ce déplacement, notamment pour les démarches administratives (Florence Boulogne, Sylvain Baize, Katleen Victoir, Chloé Pelicier, Mialy Rabenoro), la création de l'instrumentation transportable (MicroFactory et R&DVision) et notre prise en charge en Guinée (la Croix Rouge française). L'utilisation des échantillons a nécessité le consentement des patients et l'accord du comité d'éthique guinéen (ref :99/CNERS/16).

Ces travaux d'amplification d'acides nucléiques sur papier ont fait l'objet d'un dépôt de brevet : n° 1551189, le 13 février 2015. Un article sur les expériences pour l'analyse d'échantillons cliniques et comme illustration du multiplexage, est en cours de soumission.



## 6.1 Conditions expérimentales

Les expériences de biologie moléculaire sur papier sont réalisées à partir de deux réactions d'amplification isothermes d'acides nucléiques (LAMP et RT-RPA) dont les protocoles détaillés sont présentés en annexe B. Cette section rassemble la description des réactions biologiques, des primers et échantillons associés. Les échantillons utilisés sont des brins d'ADN ou ARN obtenus par extraction virale ou synthétisés en laboratoire. Les protocoles optimisés en microtubes sont adaptés dans différentes puces papier, depuis les microzones individuelles jusqu'aux dispositifs multicouches. La description des géométries papier utilisées précède la présentation de l'instrumentation nécessaire à la détection en fluorescence de l'amplification d'acides nucléiques.

### 6.1.1 Protocoles biologiques

#### LAMP : Loop-mediated isothermal amplification

L'amplification LAMP est réalisée en microtube à partir d'un mélange réactionnel de 20  $\mu\text{L}$  dont la composition est disponible en annexe B. Cette préparation forme un master mix qui peut être lyophilisé et conservé à température ambiante à l'abri de la lumière et de l'humidité. Il suffit alors d'y ajouter de l'eau et l'échantillon biologique.

La température optimale pour la réaction LAMP est de 65 °C. Le volume réactionnel de 25  $\mu\text{L}$  peut être fractionné ( $V/2$ ,  $V/4$ ) pour les expériences sur papier.

L'ADN bactérien de *Salmonelle* est utilisé comme échantillon, en association avec un set de six primers LAMP ciblant ce génome.

La détection de l'amplification est réalisée grâce à des intercalants d'ADN, comme EvaGreen, dont le signal de fluorescence est directement proportionnel à la quantité de matériel génétique. Les propriétés de fluorescence de l'intercalant en présence d'ADN sont une longueur d'onde d'excitation à 500 nm et une émission à 530 nm.

#### RT-RPA : Reverse Transcription - Recombinase Proteins Amplification

**Réaction RT-RPA** La technique RT-RPA est disponible sous la forme d'un kit commercial dont l'exacte composition n'est pas accessible. Les étapes de préparation sont décrites en annexe B.

La température optimale pour la RT-RPA est située entre 37 et 42 °C. Le mélange réactionnel et l'échantillon forment un volume final  $V$  d'environ 50  $\mu\text{L}$ . Dans la suite des expériences, des fractions de cette préparation seront utilisées ( $V/2$ ,  $V/4$ ,  $V/8$ ).

Pendant les 20 à 30 minutes de réaction, le résultat de l'amplification est suivi par un signal de fluorescence dû à une sonde TaqMan : un petit brin d'acides nucléiques complémentaire de la cible biologique associé à un fluorophore et à un désactivateur (ou quencher). En cas d'amplification, la sonde se trouve dans une conformation de double-brin. Le travail d'une enzyme exo-nucléase coupe alors la liaison entre le fluorophore et le quencher, ce qui lève l'inhibition de la fluorescence.

Le fluorophore utilisé est la 6-carboxyfluorescéine (FAM). Les longueurs d'ondes maximales des spectres d'excitation et d'émission sont respectivement 492 nm et 517 nm.

**Primers et échantillons** Les expériences sont réalisées sur trois pathogènes cibles : Ebola, HIV et Dengue. Pour chacun de ces virus, des séquences de primers RT-RPA sont disponibles dans la littérature [162–164]. La figure 6.1 présente un tableau récapitulatif sur la taille de chaque génome, le %GC, la référence de la publication des primers et la taille du brin amplifié.

ARN cible	Longueur du génome	%GC	Publication des primers	Longueur du brin amplifié
Ebola (-)	18,96 kb	41.2	Gire 2014	168 bp
HIV-1 (+)	9,2 kb	42.5	Boyle 2013	141 bp
Dengue (+)	10,7 kb	46.6	El Wahed 2015	97 bp

**Figure 6.1** – Tableau récapitulatif pour l’amplification RT-RPA d’extraits ARN pour HIV-1 et la Dengue : longueur du génome, référence de la publication des primers, longueur du brin amplifié.

Les échantillons d’HIV et Dengue sont communément utilisés en laboratoire et obtenus par culture de cellules infectées. Après sept jours de culture, le surnageant contient le virus à forte concentration. L’ARN viral est extrait à l’aide du kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Quiagen). Les quantités d’ARN obtenues sont mesurées par RT-PCR quantitative par comparaison à un standard dont les quantités sont connues grâce au kit Biocentric.

Les expériences en Guinée, dans le Centre de Traitement Ebola (CTE) établi à Macenta par la Croix Rouge Française, ont permis d’utiliser des extraits d’ARN de patients comme échantillon. Il s’agit donc d’ARN viral obtenu par extraction avec le kit Qiagen. Le statut "positif" ou "négatif" de ces échantillons, vis à vis du virus Ebola, est défini par le résultat d’une amplification RT-qPCR avec le kit Altona.

Dans le cas d’Ebola, l’accès difficile aux échantillons biologiques de patients nous a conduits à réaliser les développements au laboratoire sur des brins d’ARN synthétiques. Ils sont obtenus par modification génétique de bactéries E.Coli qui produisent l’ADN des régions d’intérêt à grande échelle. Le kit MEGAscript T7 permet la transcription en ARN. Les quantités obtenues sont mesurées par densité optique. En pratique, la législation impose une limite à 500 paires de base, sur la taille des brins synthétisés. Les caractéristiques des trois principaux ARN utilisés sont résumées dans la figure 6.2 : position des régions cibles (selon l’alignement de 145 séquences, déjà publié [163]), longueur du brin, pourcentage GC.

Brin d’ARN synthétique	Position du brin*	Longueur du brin	%GC
A	8 560 – 8 929	369 bp	43.6 %
B	16 897 – 17 295	398 bp	40.5 %
Ref. [Gire 2014]	1 657 – 2 089	432 bp	50.7 %

\* Selon l’alignement des séquences proposé dans la référence Gire 2014

**Figure 6.2** – Tableau récapitulatif des principaux brins d’ARN synthétiques utilisés : position dans le génome Ebola, longueur du brin et %GC

Pour le virus Ebola, trois sets de primers sont utilisés dont un est issu de la référence [163]. La figure 6.3 rassemble les séquences de chaque primer, ainsi que leur %GC et les caractéristiques du brin amplifié. Le nom de chaque primer est directement associé au brin d'ARN synthétique ciblé.

ARN cible	Primers					Brin amplifié			
	Forward	%GC	Reverse	%GC	Probe	%GC	Position	Longueur	%GC
A	5'-CTA CTG TAT TTC ATA AGA AGA GAG TTG AAC C-3'	35.5	5'-AAT TGT TGT TCT ACT GAT CCA CAA GTC TTA C-3'	30.0	5'-ATA TGT CCG ACC TTG AAA AAA GGA TTT TTG [FAM- dT][THF][BHQ1-dT] GAC AGT AGT TTT TGC [3'-phosphate]	34.0	8 661 – 8 820	160 bp	36.6
B	5'-CTA CTG AGT CCA GTA TAG AGT CAG AAA TAG TA-3'	37.5	5'-CTG AGT TGT TAA GAA TAA TCT CAA TTT GGT-3'	30.0	5'-AAT GAC TAC TCC TAG GAT GCT TCT ACC TGT [FAM- dT][THF][BHQ1-dT] GTC AAA ATT CCA TAA [3'-phosphate]	36.2	17 158 – 17 274	127 bp	35.9
Ref	5'-GAC GAC AAT CCT GGC CAT CAA GAT GAT GAT CC-3'	50.0	5'-CGT CCT CGT CTA GAT CGA ATA GGA CCA AGT C-3'	51.2	5'-GAT GAT GGA AGC TAC GGC GAA TAC CAG AG [FAM- dT][T][THF][BHQ1-dT] CGG AAA ACG GCA TG [3'-phosphate]	51.1	1 775 – 1 943	168 bp	51.5

**Figure 6.3** – Tableau récapitulatif des principaux primers utilisés : ARN cible, séquence des primers, position et longueur de l'amplicon.

Des expériences complémentaires ont été réalisées à partir de douze sets de primers ciblant l'ARN A, quatre sets de primers ciblant l'ARN B, deux sets de primers ciblant un ARN C additionnel, et quatre primers ciblant un ARN D additionnel. Seules les séquences des principaux primers et ARN sont données. Quand non précisé, ce sont les primers A et l'ARN A qui sont utilisés.

### 6.1.2 Dispositifs papier

L'amplification d'acides nucléiques dans le papier est d'abord réalisée dans des formats de disques de papier, comme puits individuels analogues des microtubes. Des géométries plus complexes sont proposées dans lesquelles l'écoulement par la pompe capillaire automatise plusieurs réactions simultanées.

#### Puits individuels

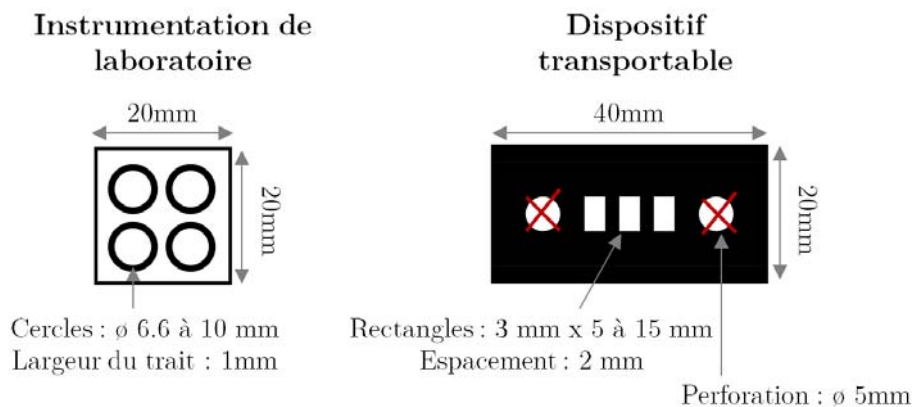
**Fabrication** Les puits individuels (ou microzones papier) sont fabriqués par la technologie d'impression de cire à partir d'une imprimante Xerox ColorQube 8580. Les motifs en dessin vectoriel sont obtenus à partir du logiciel CleWin7 au format .cif avant d'être exportés dans Adobe Illustrator CS3 au format .eps compatible avec l'impression. Une étape de cuisson (1min30 à 150 ° C) assure la diffusion de la cire dans toute l'épaisseur du papier.

Le matériau PDMS a également été utilisé pour définir les puits individuels. Le dépôt local de PDMS liquide, non réticulé, est réalisé à l'aide d'une seringue, sur le papier directement posé sur une plaque chauffante (10min à 90 ° C).

Les puces papier sont fabriquées à partir de différents supports : notamment le papier Whatman Chromatography grade 1, un papier filtre stérile en PolyEtherSulfone (PES), des cartes FTA et DBS (Whatman 903), du papier en fibre de verre.

La géométrie des microzones papier est adaptée selon le champ d'observation de la caméra du système de détection (figure 6.4). Dans le cas du dispositif expérimental de laboratoire, quatre

puits de diamètre variable (de 6 à 10mm) sont positionnés dans un carré de 2 cm de côté. Pour l'instrumentation transportable, la caméra linéaire permet d'observer trois zones rectangulaires espacées de 2 mm, de largeur 3 mm et de longueur variable (de 5 à 15 mm).



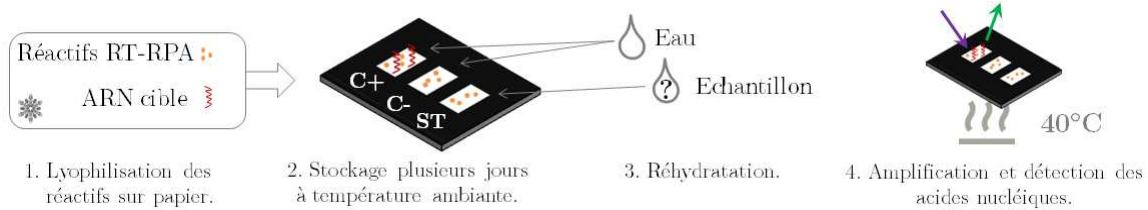
**Figure 6.4** – Géométries des microzones papier.

Des feuillets plastique (RT2RR Sigma Aldrich) adhésifs et transparents sont utilisés pour fermer les dispositifs papier, empêcher l'évaporation et les contaminations d'un puits à l'autre. Un feuillet au verso du papier isole le contenu des puits individuels du dispositif chauffant. Sur le recto, chaque puits est surmonté de trois feuillets perforés qui constituent un réservoir. Après ajout du mélange réactionnel et de l'échantillon, un feuillet additionnel non perforé ferme le dispositif.

**Réactions biologiques sur papier** Dans une première équivalence microtube / papier, le mélange réactionnel et l'échantillon biologique sont directement déposés dans chaque puits individuel. Selon la taille de la zone de papier, seule une fraction du mélange réactionnel peut être utilisée.

Une puce papier prête à l'emploi est réalisée en stockant le mélange réactionnel dans chaque microzone par lyophilisation (1h30 à  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Le dispositif papier peut être conservé à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante, pendant plusieurs jours avant utilisation. Il suffit alors de réhydrater chaque puits avec l'échantillon ou de l'eau, puis de chauffer à la température optimale de la réaction biologique (LAMP ou RT-RPA). L'enregistrement du signal de fluorescence permet de détecter l'amplification d'acides nucléiques.

Un outil de diagnostic doit contenir des contrôles internes garantissant son bon fonctionnement. Pour cela, chaque test d'un échantillon (ST = Sample Test) est accompagné de deux puits réactionnels réhydratés uniquement par de l'eau. Le premier ne contenant que des réactifs lyophilisés est un contrôle négatif (C-). Le second agit comme contrôle positif (C+) grâce à un échantillon positif mélangé aux réactifs lyophilisés. Le protocole de préparation et d'utilisation des puces papier est décrit en figure 6.5.

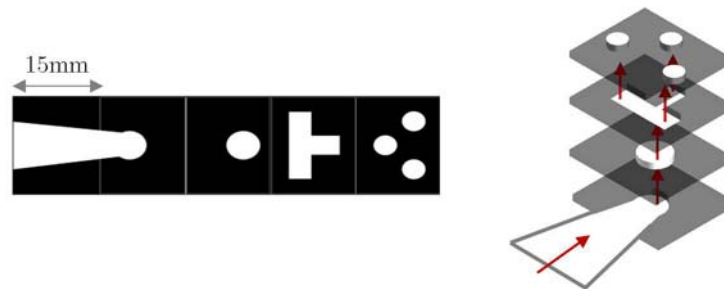


**Figure 6.5** – Préparation et utilisation d'un dispositif papier pour l'amplification d'acides nucléiques.

### Géométries multicouches pour le multiplexage

**Fabrication** Les dispositifs papier pour le multiplexage sont réalisées par la technique d'impression de cire. Après cuisson, le système est plié. Pour maintenir le contact entre les épaisseurs, du scotch double-face est positionné manuellement sur la cire, autour des motifs blancs dans lesquels se produit l'écoulement. Enfin, le dispositif est pressé dans un étiau.

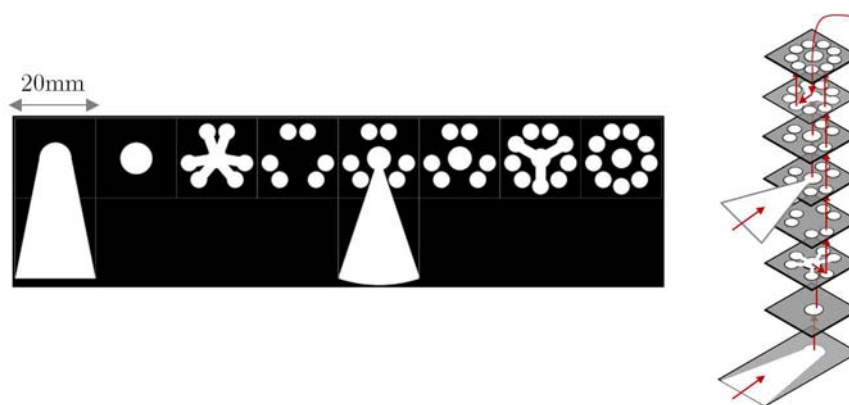
**Géométries** Une première puce papier, présentée en figure 6.6, est constituée de quatre épaisseurs de papier. La pompe capillaire répartit l'écoulement depuis une languette de papier vers trois puits réactionnels : le test échantillon et les deux contrôles internes.



**Figure 6.6** – Géométrie pour la réhydratation de trois puits réactionnels : patron et vue éclatée.

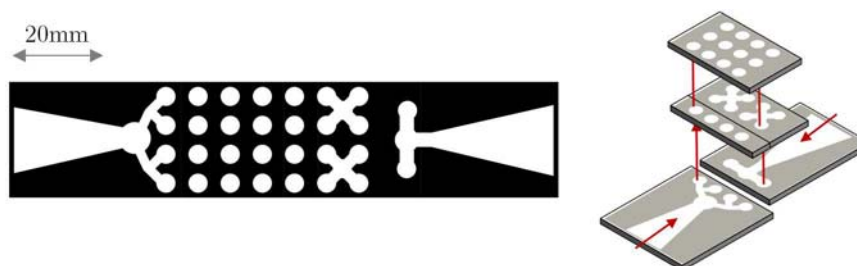
La réalisation de trois tests de diagnostic simultanés à partir d'un même échantillon requiert neuf puits réactionnels : trois tests d'échantillon et six contrôles internes. Dans une géométrie multicouches (figure 6.7), ces neuf puits sont répartis de manière circulaire autour d'un puits central dans lequel l'échantillon peut être déposé. Dans la deuxième épaisseur de papier, l'échantillon est distribué vers les trois puits de test échantillon. Toutes les épaisseurs de papier inférieures sont utilisées pour répartir l'écoulement depuis des languettes de papier vers les puits sur le dessus du dispositif. Deux languettes différentes sont nécessaires afin d'éviter toute contamination en séparant complètement les trajectoires fluidiques des contrôles et des tests échantillon.

Dans l'idée de généraliser la géométrie précédente à un plus grand nombre de tests en parallèle, la configuration circulaire n'est pas adaptée. Il faudrait réduire la taille des puits réactionnels ou bien allonger les distances et former un plus grand cercle. La première solution implique de nombreuses modifications des volumes et concentrations en réactifs, la deuxième ralentit considérablement l'écoulement.



**Figure 6.7** – Géométrie circulaire pour la réhydratation de neuf puits réactionnels : patron et vue éclatée.

Une géométrie matricielle, en figure 6.8, est proposée pour rendre plus facile l'agrandissement du dispositif vers un nombre plus important de tests. Les trois colonnes représentent les tests échantillons, les contrôles négatifs et les contrôles positifs. Le nombre de lignes dépend du nombre de tests. Les puits sont réhydratés par des languettes positionnées sur les bords. Ici encore, les trajectoires fluidiques des tests échantillons et des contrôles sont disjointes.



**Figure 6.8** – Géométrie matricielle pour la réhydratation de douze puits réactionnels : patron et vue éclatée.

**Lyophilisation des réactifs** La fonctionnalisation des puces papier par le matériel biologique consiste à lyophiliser les réactifs dans les puits individuels de la dernière épaisseur de papier. L'ARN cible est également lyophilisé dans les puits correspondant aux contrôles positifs.

La configuration dépliée permet de stocker des contenus différents dans chaque puits sans contamination croisée. A l'état sec, le pliage du dispositif multicouche n'autorise toujours pas de communication entre les puits. Enfin, l'hydratation unidirectionnelle depuis les languettes vers l'épaisseur supérieure empêche le mélange des contenus de chaque puits.

Les contrôles internes sont réalisés à partir des mêmes solutions de réactifs que ceux employés pour le test échantillon. Ils sont stockés sur le même papier afin d'avoir un historique de conservation identique (température, hygrométrie, durée, ...). Il serait encore plus pertinent que les réactifs soient distribués vers les différents puits réactionnels seulement au moment de la réhydratation. Des expériences ont été réalisées avec des colorants pour illustrer cette fonction. En lyophilisant les réactifs dans une couche de papier proche de la languette, l'idée est que l'écoulement réhydrate et répartisse les réactifs vers les puits réactionnels. Mais les concentrations importantes de tous les réactifs d'amplification ont rendu l'écoulement très visqueux. Il

faut alors un temps beaucoup plus important pour réhydrater l'ensemble de la puce papier et des bouchons visqueux apparaissent et arrêtent l'écoulement.

### 6.1.3 Instrumentation

Malgré les atouts du support papier, l'amplification d'acides nucléiques nécessite quelques éléments d'instrumentation. Un dispositif chauffant est employé pour atteindre la température de fonctionnement des enzymes ( $40^{\circ}\text{C}$  pour la RT-RPA ;  $65^{\circ}\text{C}$  pour la LAMP). Le résultat d'amplification est détecté en fluorescence. Il faut donc une source de lumière UV et une caméra.

Deux instrumentations sont utilisées pour les expériences sur papier. La première est une installation classique de laboratoire alors que la deuxième est une réalisation sur-mesure plus compacte et transportable.

#### Au laboratoire

**Spécifications techniques** Bien que les amplifications isothermes fonctionnent à température constante, le dispositif chauffant utilisé au laboratoire est un thermocycleur Peltier (MJ Research - PTC 200). Le papier est observé grâce à un microscope Leica (Z16 APO) au grossissement  $\times 0.57$ . La détection de fluorescence est réalisée avec une source de lumière externe (Leica EL 6000) et un filtre cube Leica L5. Des images sont enregistrées à une fréquence de 1 Hz par une caméra sensible (Hamamatsu EM-CCD C900-13) avec un temps d'exposition de 75 ms. Un générateur de délai (EG R&DVision) assure la synchronisation entre l'obturateur (shutter) de la lampe UV et l'acquisition de la caméra de façon à limiter les phénomènes de blanchiment de fluorescence.



**Figure 6.9** – Montage expérimental au laboratoire pour l'amplification et la détection d'acides nucléiques sur papier.

Les propriétés optiques du filtre cube Leica L5 sont compatibles avec tous les fluorophores utilisés. Le filtre d'émission est centré à 480 nm avec une bande passante de  $\pm 20$  nm. Le miroir dichroïque présente une longueur d'onde de coupure à 505 nm. Le filtre d'excitation est centré à 527 nm avec une bande passante de  $\pm 15$  nm.

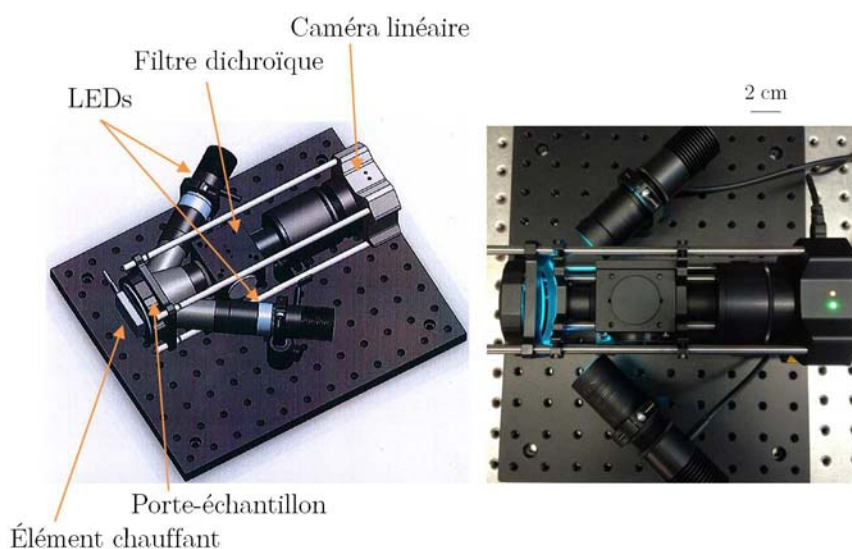
**Traitement d'images** L'analyse d'images est réalisée avec le logiciel ImageJ. Les courbes d'amplification consistent en un suivi du signal de fluorescence au cours du temps pour chaque puits réactionnel. Une normalisation des données est obtenue par soustraction de la première image. Les fluctuations de signal dues aux conditions extérieures sont lissées avec une macro ImageJ qui prend en compte une région de l'image censée rester constante.

Dans cette configuration, l'intégralité du champ de la caméra (2 cm x 2 cm) est observé et enregistré. La mesure de chaque puits réactionnel est réalisée par une moyenne sur toute la surface d'intérêt. Mais les données brutes donnent aussi accès à des mesures locales.

## En Guinée

**Spécifications techniques** Un dispositif sur-mesure a été développé conjointement par MicroFactory et R&D Vision. Il réalise les mêmes fonctions de chauffage et détection de fluorescence à partir d'un équipement plus compact et transportable.

Deux LEDs bleues (Thorlabs M490L3) sont combinées à une première lentille (Thorlabs ACL25416U-A), deux filtres (Thorlabs FES0500 et Thorlabs M4R97-16) et une deuxième lentille (Thorlabs LA1422-A) pour éclairer l'échantillon papier. Le signal de fluorescence émis est collecté par une caméra linéaire (Thorlabs LC-100) à travers une première lentille (Thorlabs ACL3026-A), un filtre dichroïque (Thorlabs MD499), un filtre (Thorlabs FELH0500) et une seconde lentille (Thorlabs ACL3026-A). Le papier est positionné via deux vis, sur un porte-échantillon qui est chauffé par un élément chauffant (PTC DBK HP05), contrôlé par une platine thermique (RS Components PT 1000 ohms) et une sonde de température (Carel IR33). A l'intérieur du boîtier de contrôle de température, un circuit électronique synchronise l'allumage des LEDs avec l'acquisition de la caméra linéaire. Un schéma détaillé de cette instrumentation est présenté en figure 6.10.



**Figure 6.10** – Schéma et photo de l'instrumentation optique pour un système de détection transportable.

L'ensemble de ces éléments est fixé sur une plaque d'essais optique à l'intérieur d'une valise (figure 6.11). Pendant le transport, la valise contient l'instrumentation, le boîtier de contrôle



de température et une multiprise. Pour réaliser une expérience, il faut sortir ces deux derniers éléments et brancher l'instrumentation. Pendant l'expérience, le fait de fermer le couvercle de la valise assure des conditions d'éclairage toujours identiques.



Figure 6.11 – Photos de la valise d'expérience qui contient tout le matériel pour l'instrumentation.

**Traitement d'image** La caméra linéaire enregistre le signal seulement sur une ligne de pixels. Seule une fraction du dispositif papier est mesurée. Avant chaque expérience, un papier blanc faisant office de référence est mesuré. Lors de l'expérience, les mesures sont renormalisées par la référence de sorte à tenir compte de l'éclairage inhomogène.

Une macro Excel réalise l'opération de normalisation des données : soustraction de la première image et division par la référence. Les zones d'intérêt de la puce papier sont détectées automatiquement par la position du maximum d'intensité. La figure 6.12 présente les différentes étapes de traitement des données.

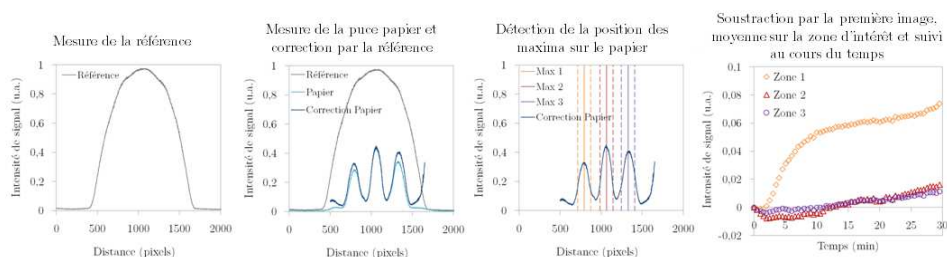
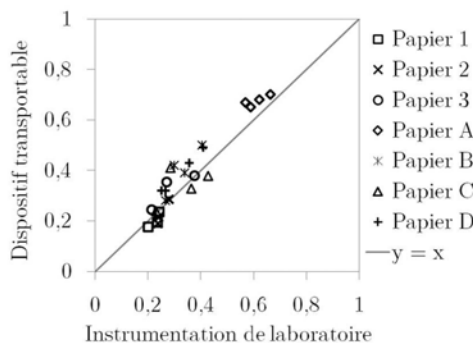


Figure 6.12 – Etapes du traitement de données pour la mesure de l'amplification sur papier par l'instrumentation transportable.

### Comparaison des deux systèmes de détection

Sept dispositifs papier sont préparés : trois (papiers 1 à 3) dans la géométrie compatible avec le dispositif transportable (trois puits réactionnels rectangulaires), quatre (papiers A à D) dans le format adapté à l'instrumentation de laboratoire (quatre puits circulaires). Des expériences de RT-RPA en présence ou non de la cible ARN sont réalisées sur chaque papier. La fluorescence émise par chaque puits réactionnel sur chaque papier est mesurée par les deux



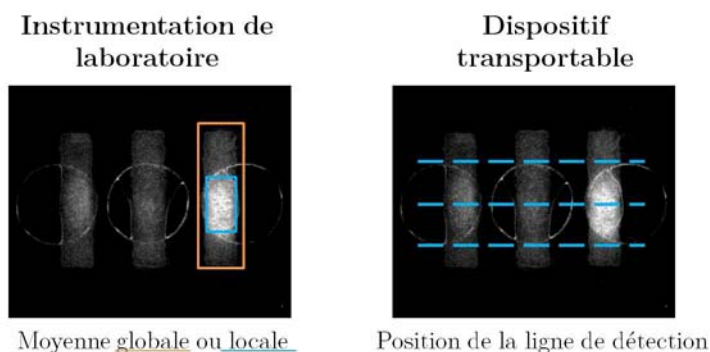
**Figure 6.13** – Mesures de huit dispositifs papier par les deux instrumentations.

instrumentations. Après normalisation des données, les résultats de détection sont comparés et présentés en figure 6.13.

Dans le graphe comparant les mesures du dispositif transportable par rapport à la donnée de l'instrumentation de laboratoire, le rassemblement des points expérimentaux sur la droite  $y = x$  confirme la pertinence des mesures quel que soit le système de détection.

Outre la sensibilité des caméras et la puissance de l'éclairage UV, la différence fondamentale entre les deux dispositifs est le champ de détection. L'instrumentation de laboratoire prend une photo d'une région de 2 cm x 2 cm sur laquelle il est possible de faire des mesures locales ou moyennées sur de plus grandes surfaces. Le dispositif transportable mesure une ligne de 2000 pixels. L'éclairage autorise une ligne de détection de 1250 pixels soit environ 13 mm.

La mesure des puits de réaction est moyennée dans le premier cas sur toute la surface de papier, dans le second cas sur une ligne seulement. Si l'intensité de fluorescence est répartie de manière non homogène dans le dispositif papier, la détection peut être problématique (figure 6.14).



**Figure 6.14** – Différentes configurations de mesures d'un signal inhomogène selon le système expérimental.

Avec l'instrumentation de laboratoire, c'est la taille et la position de la zone de mesure qui vont déterminer la valeur de l'intensité de signal. La mesure par l'instrumentation transportable dépend du positionnement vertical du papier sur le porte-échantillon.

## 6.2 Réalisation de l'amplification LAMP sur papier

La réaction LAMP est une technique d'amplification isotherme d'acides nucléiques extrêmement sensible. A la réplication exponentielle des brins d'ADN, il faut ajouter que la forme de boucle des primers crée des produits de réaction de plus en plus longs. La quantité d'acides nucléiques est donc très importante et peut être détectée par des intercalants d'ADN. Les expériences de cette section sont réalisées sur un ADN modèle de Salmonelle. Pour la détection de virus à ARN, il faudrait ajouter une étape de transcription inverse.

Dans cette section, nous allons décrire la réaction LAMP en microtubes, comme le ferait un biologiste, et comparer avec les résultats obtenus sur papier. L'importance de l'environnement biochimique imposé est mise en évidence en variant les supports papier.

### 6.2.1 Caractérisation de la LAMP en microtube

#### Courbes d'amplification d'ADN

Une expérience de LAMP en microtube est réalisée avec l'instrumentation de laboratoire. Deux tubes contenant le mélange réactionnel sont chauffés à 65 °C et suivis en fluorescence pendant 40 minutes. Un échantillon d'ADN de Salmonelle est ajouté dans l'un des microtubes (figure 6.15). Après 20 minutes de réaction, un fort signal de fluorescence se dégage du microtube contenant l'échantillon positif alors qu'il reste constant dans un cas négatif.

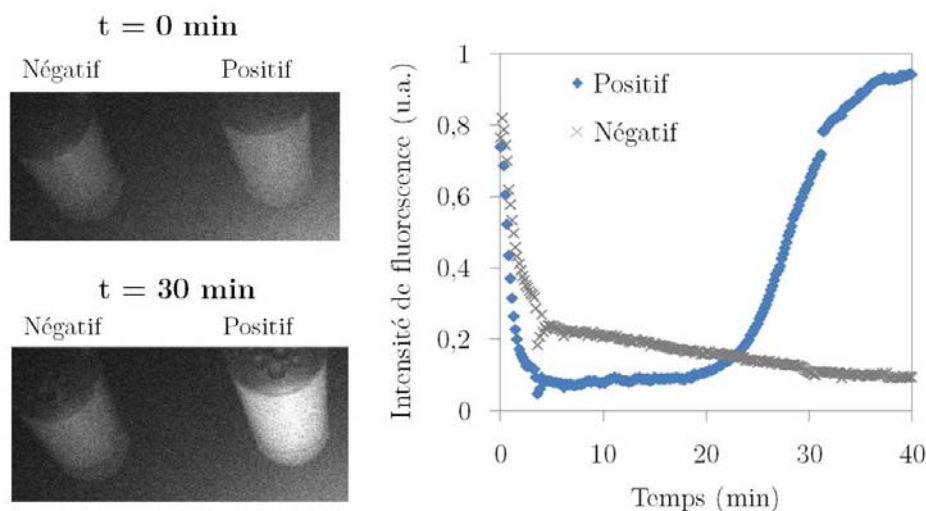


Figure 6.15 – Réaction LAMP en microtubes dans le cas d'échantillons positif ou négatif.

Les courbes d'amplification montrent un régime initial de chute de la fluorescence initiale. Cette transition est due au blanchiment thermique de la fluorescence de l'intercalant pendant la montée en température du milieu réactionnel. Le dispositif expérimental n'est pas optimal pour les réactions en microtubes. Le fond conique des microtubes est simplement posé sur l'élément chauffant : la zone de contact n'est qu'une ligne. Il faut donc un certain temps de diffusion pour que l'intégralité du microtube soit chauffé et un gradient de température persiste pendant toute la réaction.

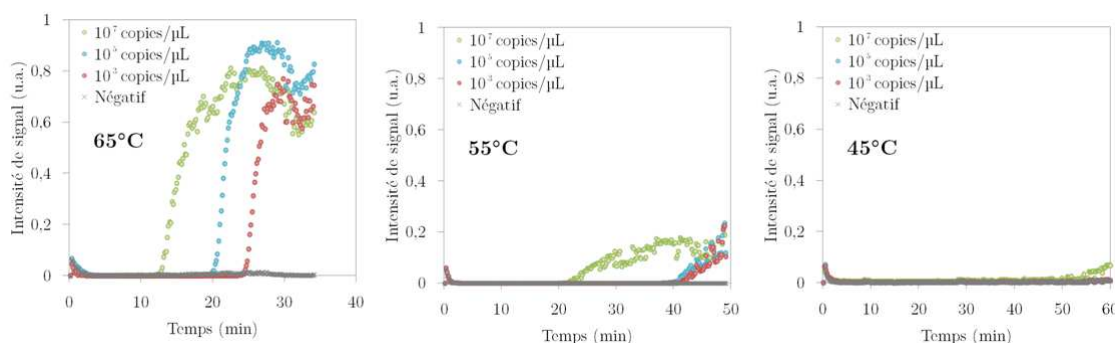
### Sensibilité et dépendance en température

La même expérience d'amplification d'acides nucléiques par LAMP est réalisée en microtubes pour différentes concentrations d'échantillons et en variant la température (figure 6.16).

A 65 ° C, la détection de trois échantillons d'ADN aux concentrations de  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$  copies/ $\mu\text{L}$  est possible en moins de 30 minutes. Plus l'échantillon est concentré, plus l'amplification se produit rapidement.

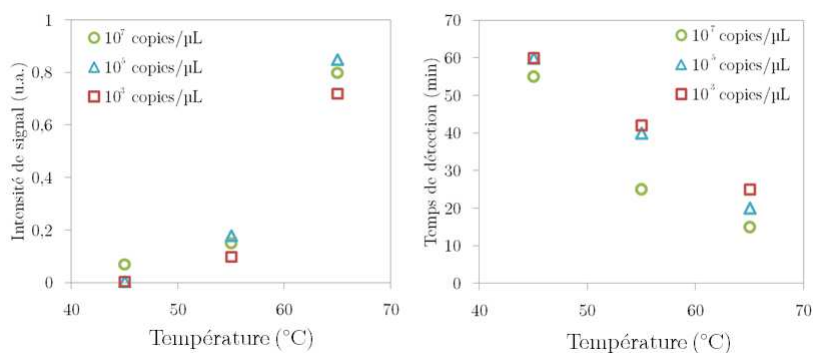
A 55 ° C, l'amplification des échantillons d'ADN prend deux fois plus de temps et atteint des intensités de signal de fluorescence quatre fois plus faibles. Il faut 40 minutes pour amplifier les faibles concentrations d'ADN.

L'amplification d'ADN ne se produit quasiment pas dans les expériences à 45 ° C. Seul l'échantillon le plus concentré émet un très faible signal fluorescent après 50 minutes de réaction.



**Figure 6.16** – Expériences de LAMP en microtubes à différentes températures et pour différentes concentrations d'ADN cible.

Les courbes présentées en figure 6.17 illustrent la dégradation importante des performances d'amplification aux faibles températures. L'intensité de signal et le temps de détection sont affectés par une diminution de 10 ° C par rapport à la température optimale.



**Figure 6.17** – Influence de la température sur l'intensité de signal et le temps de détection, pour l'amplification LAMP de différentes concentrations d'ADN cible.

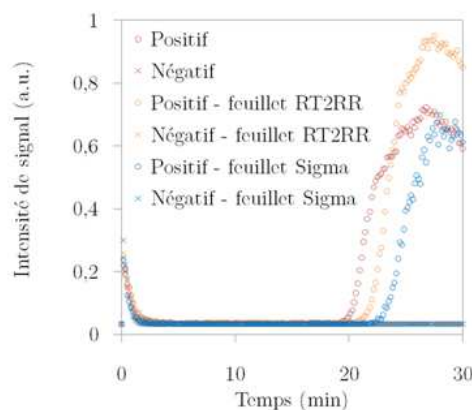
### 6.2.2 Etude de la compatibilité avec les matériaux des puces papier

Les techniques de biologie moléculaire sont sensibles à la présence d'inhibiteurs de réaction. Les phénomènes d'inhibition peuvent agir à différents niveaux comme l'intégrité de l'échantillon (détérioration du matériel génétique) ou l'activité enzymatique. Il est nécessaire de vérifier la bonne compatibilité des matériaux utilisés pour la fabrication des puces papier avec l'amplification LAMP.

#### Recherche d'inhibiteurs d'amplification

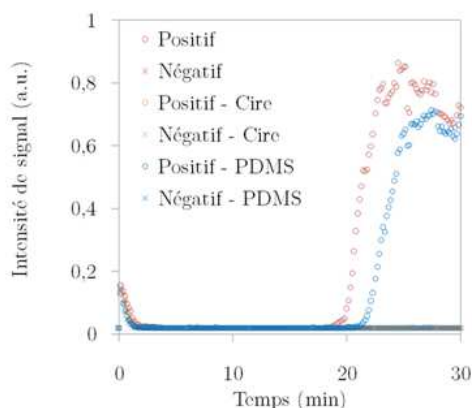
L'expérience consiste à réaliser la réaction en microtubes en présence des éléments à analyser : le papier, les feuillets plastique, la cire, le PDMS. Chaque microtube contient le mélange réactionnel de LAMP et un petit morceau (volume d'environ 10 mm<sup>3</sup>) d'un des matériaux. Pour chaque matériau, deux microtubes sont préparés : un témoin négatif et un contenant la cible ADN.

Deux types de feuillets adhésifs plastique sont utilisés : Sigma Plastic Foil et RT2RR Plastic Foil. Selon le fournisseur, ils sont compatibles avec les réactions PCR. Pour la LAMP en microtubes, la présence de ces feuillets retarde de quelques minutes le temps de détection mais n'affecte pas l'intensité de signal (figure 6.18). Dans le cas du feuillet RT2RR, le signal est même plus fort.



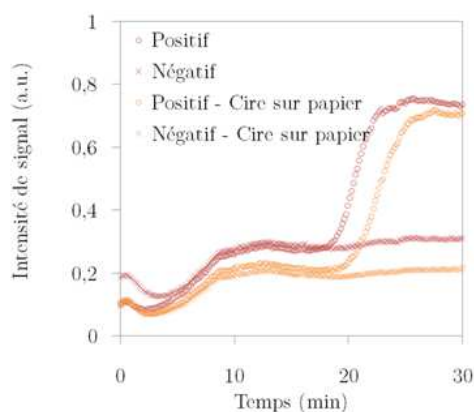
**Figure 6.18** – Effets des feuillets plastiques sur la réaction LAMP en microtubes.

La compatibilité avec la LAMP est analysée pour deux composés constituant les barrières hydrophobes dans le papier : le PDMS et la cire (figure 6.19). Ce premier matériau polymère allonge le temps de détection de quelques minutes sans inhiber l'intensité de signal. Cependant leur fabrication manuelle est fastidieuse et non standardisée. Les zones de papier n'ont alors pas toutes rigoureusement les mêmes dimensions. En présence de cire, aucune amplification n'est observée. La cire utilisée lors de l'impression des motifs sur le papier est un produit commercial dont la composition n'est que partiellement connue.



**Figure 6.19** – Effets du PDMS et de la cire sur la réaction LAMP en microtubes.

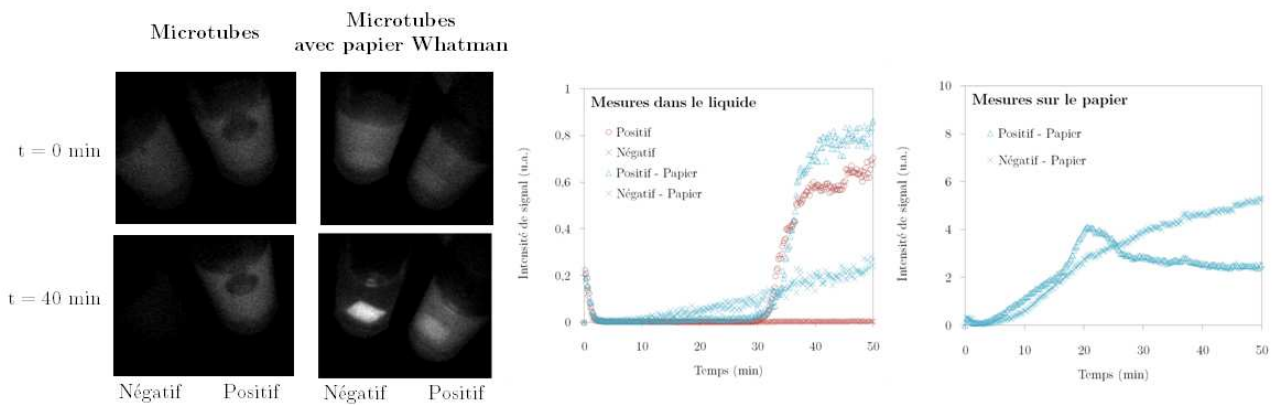
Cette même expérience d'amplification LAMP en microtubes est réalisée avec de la cire imprimée et chauffée sur papier Whatman. Dans ces conditions, l'inhibition par la cire est levée comme le montre la figure 6.20 : l'amplification est ici encore légèrement retardée mais garde son intensité. Le prétraitement thermique subi par la cire avant l'amplification permet donc d'extraire une grande partie des solvants volatils responsables de l'inhibition. Dans la situation précédente, la réaction à 65 °C proche de la température de fusion de la cire suffit à libérer ces composés dans le milieu réactionnel s'ils n'ont pas été extraits avant. Des incertitudes apparaissent sur la biocompatibilité de la cire si elle est utilisée dans d'autres conditions qu'à température ambiante où son état solide la rend plus inerte.



**Figure 6.20** – Effets de la cire imprimée et chauffée, sur la réaction LAMP en microtubes.

L'amplification LAMP d'ADN en microtubes en présence de papier Whatman est analysée et présentée en figure 6.21. Alors que les microtubes témoins positif et négatif donnent des courbes d'amplification standards, la présence du papier donne des comportements différents. En mesurant l'intensité de fluorescence dans le microtube dans le liquide à un endroit différent du papier, l'amplification se produit bien dans le microtube positif : le papier n'inhibe pas la réaction. Dans le microtube négatif, il apparaît un signal non spécifique, qui augmente linéairement au cours du temps. Lorsque cette mesure est réalisée sur le papier, l'intensité de signal est 10 fois plus élevée qu'en l'absence de papier et est complètement non spécifique à

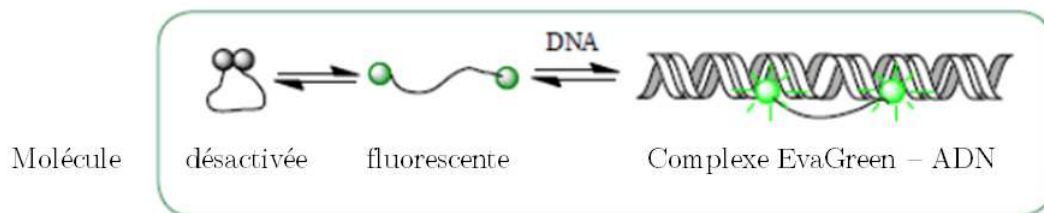
la présence d'ADN. Ce phénomène s'explique par des interactions entre le support papier et l'intercalant d'ADN responsable de la fluorescence.



**Figure 6.21** – Réaction LAMP en microtubes en présence d'un morceau de papier Whatman : mesures de fluorescence dans le liquide et sur le papier.

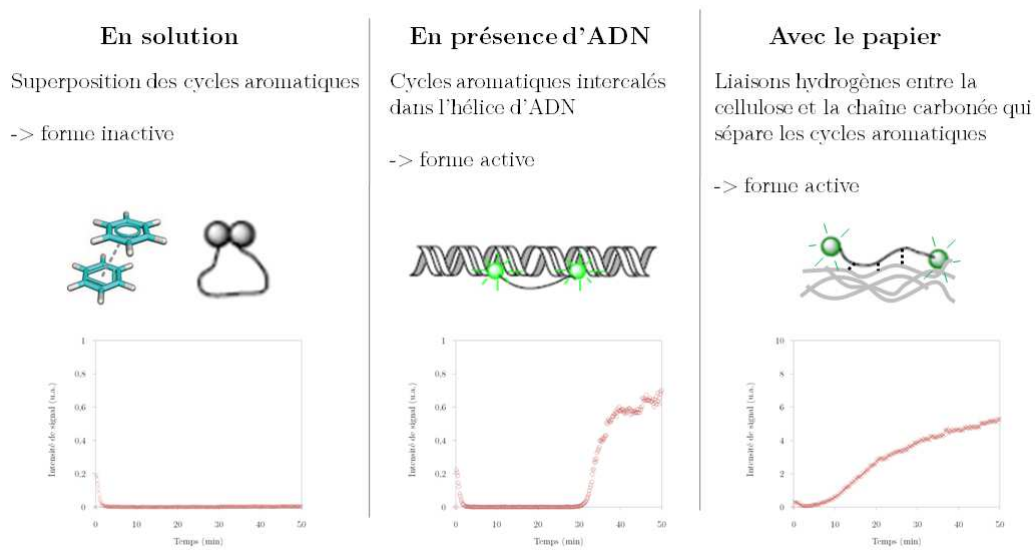
### Interactions papier-intercalant

La détection de l'amplification d'ADN est réalisée grâce à l'intercalant commercial EvaGreen. Cette espèce chimique est constituée de deux cycles aromatiques séparés par une chaîne carbonée (un spacer). Dans une configuration repliée, la superposition des cycles aromatiques désactive la fluorescence. En présence d'ADN, les cycles aromatiques s'insèrent dans la double hélice et l'intercalant se trouve dans une configuration dépliée dans laquelle la fluorescence n'est plus inhibée (figure 6.22).



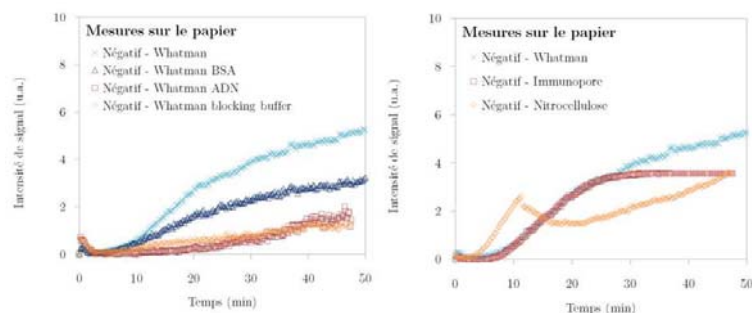
**Figure 6.22** – Principe des interactions intercalant-ADN.

Les expériences en microtubes ont montré qu'en solution l'équilibre entre les deux conformations de l'intercalant est déplacé vers la forme repliée non fluorescente. L'augmentation du matériel génétique lors de l'amplification déplace cet équilibre vers la forme dépliée fluorescente. En présence de papier dans le microtube, l'intercalant au contact de la cellulose se trouve dans la conformation dépliée (figure 6.23). Cette interaction non spécifique à l'ADN peut s'expliquer par les possibles liaisons hydrogènes entre les fibres de cellulose et les fonctions amides de la chaîne carbonée de l'intercalant.



**Figure 6.23** – Forme de l'intercalant selon l'environnement : en solution, en présence d'ADN, dans le papier.

Deux stratégies sont envisagées pour supprimer ces interactions non spécifiques entre le support papier et l'intercalant d'ADN : des traitements chimiques pour rendre inaccessible la cellulose ou utiliser d'autres papiers. La figure 6.24 présente les résultats d'amplification d'un échantillon négatif en présence de papier Whatman associés à différents traitements chimiques ou d'autres supports papier.



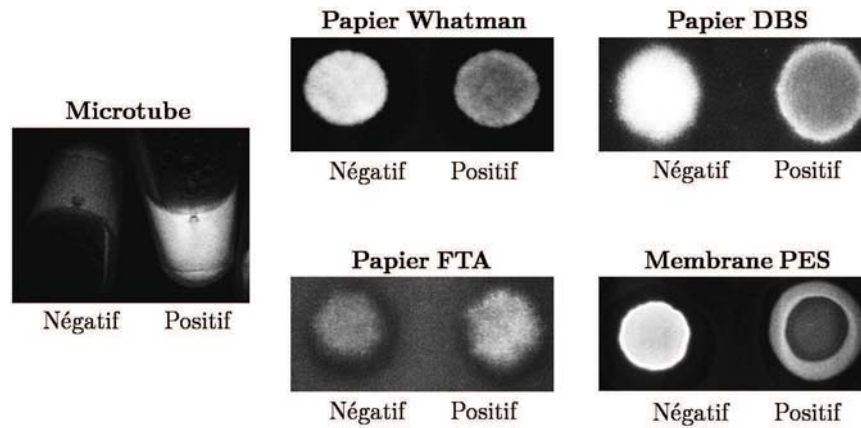
**Figure 6.24** – Réaction LAMP en microtubes en présence de différents supports papier et de papiers Whatman avec différents traitements de surface.

Les papiers Immunopore et nitrocellulose ainsi que le traitement du papier Whatman par la BSA n'aident pas à réduire ce signal non spécifique. En saturant la cellulose du papier Whatman avec une solution tampon ou de l'ADN, le signal de fluorescence est moins intense mais atteint des valeurs supérieures à celles obtenues en fin d'amplification avec un échantillon positif.

Ces interactions papier-intercalant peuvent aussi être mises en avant par le dépôt sur papier du contenu d'un microtube en fin de réaction LAMP. La figure 6.25 présente une image en fluorescence de mélanges réactionnels LAMP en microtubes avec des échantillons négatif et positif. Quelques microlitres de ces solutions sont pipetés sur différents supports papier et



visualisés en fluorescence. Sur les papiers Whatman, DBS et PES, l'intensité de fluorescence entre positif et négatif s'inverse : les microzones papier contenant le mélange réactionnel négatif émettent un signal de fluorescence plus élevé que les puits positifs. Seul le papier FTA conserve les propriétés de fluorescence des microtubes mais l'écart des intensités entre positif et négatif est réduit.



**Figure 6.25** – Dépôt sur différents papiers d'un mélange réactionnel LAMP après amplification pour des échantillons positif et négatif.

Dans tous les cas, le caractère non spécifique de l'intercalant d'ADN est responsable d'interactions avec le support papier et nuit à la détection de l'amplification.

### 6.2.3 Réaction LAMP sur papier

Les expériences d'amplification LAMP sur papier consistent à déposer un mélange réactionnel fraîchement préparé en microtube sur une microzone papier. Quatre puits circulaires sont utilisés pour réaliser plusieurs amplifications en parallèle selon la concentration en ADN de l'échantillon ou des positifs et négatifs en duplicats (figure 6.26). La puce papier est scellée par des feuillets plastique adhésifs pour limiter l'évaporation. L'amplification est suivie en fluorescence pendant 30 minutes à 65 °C. Les microzones sont fabriquées avec des barrières en PDMS pour s'affranchir de la question de la biocompatibilité de la cire. Deux substrats papier sont comparés : le papier Whatman Chromatography grade 1 le plus utilisé dans la microfluidique papier et le papier FTA qui, selon les expériences précédentes, interagit le moins avec l'intercalant d'ADN.

Dans le cas du papier Whatman, l'intensité de fluorescence croît quasi linéairement de manière non spécifique avant d'atteindre un plateau. S'il existe une variabilité des valeurs maximales atteintes dans chaque microzone, il n'y a aucune spécificité qui aide à la détection de l'amplification.

Avec le papier FTA et différentes concentrations en ADN, après 10 minutes d'émission de fluorescence constante, tous les signaux présentent une intensité croissante au cours du temps. L'écart entre les microzones négatives et celles contenant l'ADN cible laisse supposer qu'une contribution à l'augmentation de signal est due à l'amplification.

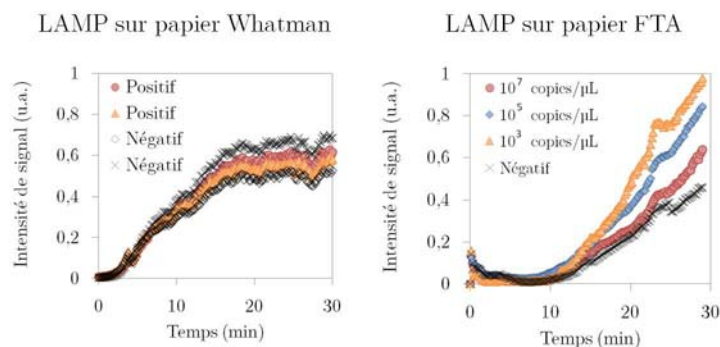


Figure 6.26 – Courbe d'amplification LAMP sur papier en fonction du support.

### Effets de la température

Si l'analyse d'image donne la courbe d'amplification précédente, l'observation directe montre des phénomènes d'évaporation-condensation dans le papier (figure 6.27).

Initialement le liquide est uniformément réparti dans le papier mais le chauffage à  $65^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes crée de nombreuses gouttelettes qui s'évaporent du papier puis se recondensent sur le feuillet plastique. Ces gouttes ne sont pas favorables à la réaction LAMP dans le papier.

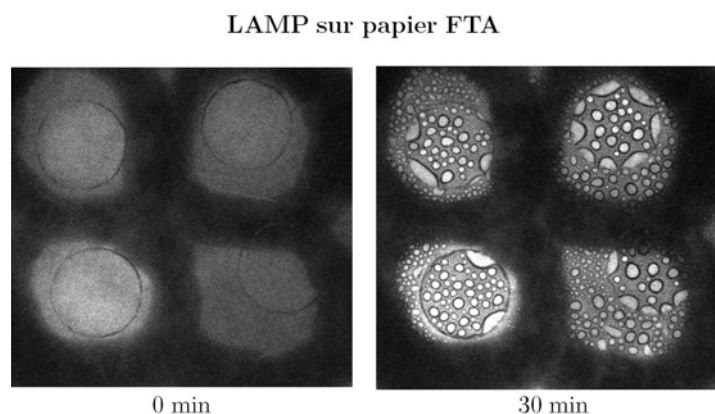


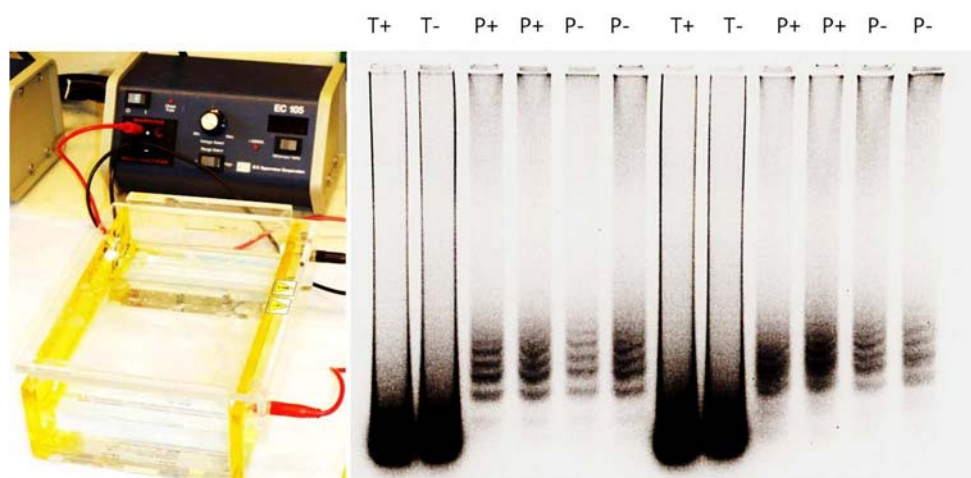
Figure 6.27 – Observation en fluorescence des microzones papier avant et après la réaction d'amplification.

D'abord, elles fractionnent le milieu réactionnel qui n'est alors plus homogène et bien distribué. Ensuite le séchage du papier et leur positionnement sur le feuillet plastique isolent thermiquement les gouttelettes. Le chauffage à  $65^{\circ}\text{C}$  sous le papier diffuse mieux par un liquide qu'à travers une phase vapeur. Enfin, un papier sec est plus fluorescent qu'un papier humide : le liquide dans le milieu poreux atténue la différence d'indice et les multiples diffusions. L'augmentation de signal observé pour des échantillons négatifs est donc due au séchage. Dans le cas d'échantillons positifs, le signal d'amplification dans les gouttelettes s'additionne à celui du séchage.

### Amplification sans intercalant

La détection du matériel amplifié peut être réalisée post-expérience par migration électrophorétique sur gel d'agarose. Cette solution, sans intercalant, ne permet pas un suivi direct : le milieu réactionnel est analysé après amplification.

Des expériences en microtubes et sur papier sont réalisées en parallèle. Les microzones papier sont de simples disques de papier sans barrières, isolés entre deux feuillets adhésifs. Après 30 minutes à 65 ° C, les papiers sont baignés individuellement dans une solution d'éluion. Le matériel élué et le contenu des microtubes témoins sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose comme le montre la figure 6.28.



**Figure 6.28** – Détection d'amplification d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.

T+ : Tube positif - T- : Tube négatif - P+ : Papier positif - P- Papier négatif.

Dans tous les cas, les expériences en microtubes n'ont pas fonctionné correctement : signal important pour les positifs et négatifs, pas de bandes caractéristiques des différentes longueurs d'amplicons.

Les papiers élués sont responsables de signaux intenses en forme de bandes et plus intenses dans le cas des positifs que dans les négatifs. Il semble que l'amplification se produit bien dans le papier mais qu'il existe d'importantes sources de contaminations. Celles-ci peuvent se produire à différents moments de l'expérience : avant l'amplification lors du dépôt des mélanges réactionnels positifs et négatifs sur le papier, après l'amplification lors de l'éluion des papiers, au moment de la migration sur gel lors du dépôt des solutions éluées.

**Bilan de l'amplification LAMP sur papier** Le transfert du protocole biologique de la réaction d'amplification LAMP du microtube vers le papier a mis en évidence plusieurs limites du papier. D'une part, la nature biochimique du support peut présenter des interactions non spécifiques avec les outils de détection de l'amplification, comme les intercalants d'ADN. D'autre part, la manipulation de petits volumes (10 à 20  $\mu$ L) dans un milieu poreux est largement sujette à l'évaporation.

## 6.3 Détection d'ARN Ebola par RT-RPA sur papier

La détection d'une cible biologique par la réaction RT-RPA repose sur l'amplification d'ADN après une étape de transcription inverse qui transforme l'ARN de l'échantillon en ADN. L'amplification à basse température (40 ° C) limite l'évaporation et la détection par un sonde Taqman (fluorophore désactivé lié à une séquence de primers) reste spécifique des acides nucléiques ciblés.

Dans cette section, nous nous intéressons à cette réaction biologique RT-RPA pour l'amplification d'acides nucléiques sur papier. La stratégie reste la même : des études préliminaires en microtubes précèdent les expériences sur papier. La bonne compatibilité de la RT-RPA avec le papier nous a conduits jusqu'à la lyophilisation des réactifs qui sont ainsi stockés et prêts à l'emploi dans le dispositif de diagnostic.

### 6.3.1 Caractérisation de la RT-RPA en microtube

#### Courbes d'amplification d'ARN

La transcription inverse d'ARN en ADN et l'amplification d'ADN sont réalisées par le mélange réactionnel RT-RPA en microtubes en 30 minutes à 40 ° C. L'instrumentation de laboratoire permet de détecter le signal fluorescent de la sonde spécifique à l'amplification d'ADN. Les primers utilisés ciblent une région du matériel génétique du virus Ebola. Les échantillons utilisés sont de petits fragments synthétiques d'ARN Ebola (moins de 500 paires de bases).

Les courbes d'amplification en figure 6.29 montrent l'évolution du signal fluorescent émis par chaque microtube en fonction de la présence de l'échantillon d'ARN cible.

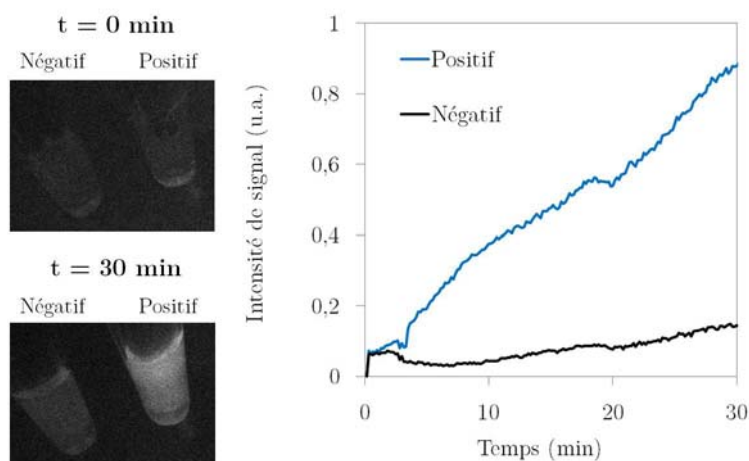


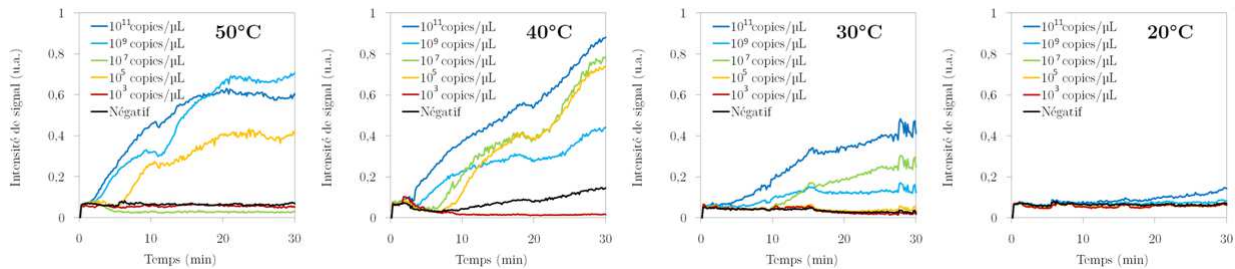
Figure 6.29 – Réaction RT-RPA en microtubes dans le cas d'échantillons positif ou négatif.

Dans le microtube négatif, la fluorescence reste à un niveau inférieur à 0,2 u.a. alors qu'une augmentation importante de l'intensité de signal se développe dès 5 minutes de réaction dans le microtube positif.

### Sensibilité et dépendance en température

La sensibilité analytique de la réaction RT-RPA est estimée en microtubes en fonction de la température. Les courbes d'amplification obtenues pour chaque température de réaction avec une variété de concentrations en ARN cible sont présentées en figure 6.30.

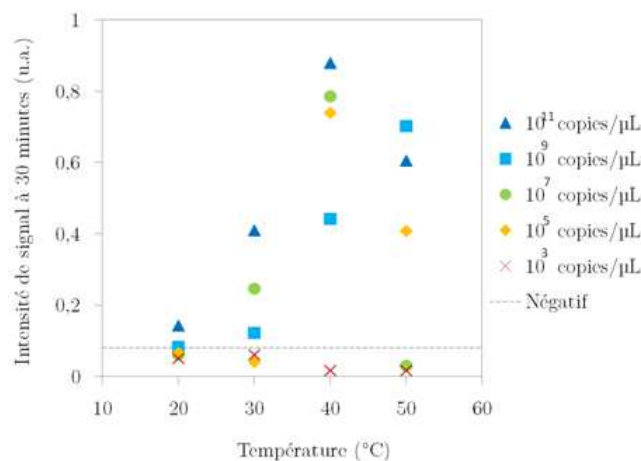
A 40 et 50 °C, les échantillons amplifiés donnent des intensités de signaux supérieures à 0,5 u.a. et la sensibilité analytique est de  $10^5$  copies/ $\mu$ L. A 30 °C, la sensibilité a perdu deux décades et les intensités de signaux sont au mieux de l'ordre de 0,4 u.a. Enfin à 20 °C, seul l'échantillon le plus concentré ( $10^{11}$  copies/ $\mu$ L) est faiblement détecté.



**Figure 6.30** – Expériences de RT-RPA en microtubes à différentes températures et pour différentes concentrations d'ARN cible.

Dans la plupart des cas, le temps de détection est peu affecté par le changement de température : il reste inférieur à 10 minutes. C'est principalement la pente et la valeur maximale de l'intensité de signal qui apparaissent comme des paramètres d'intérêt.

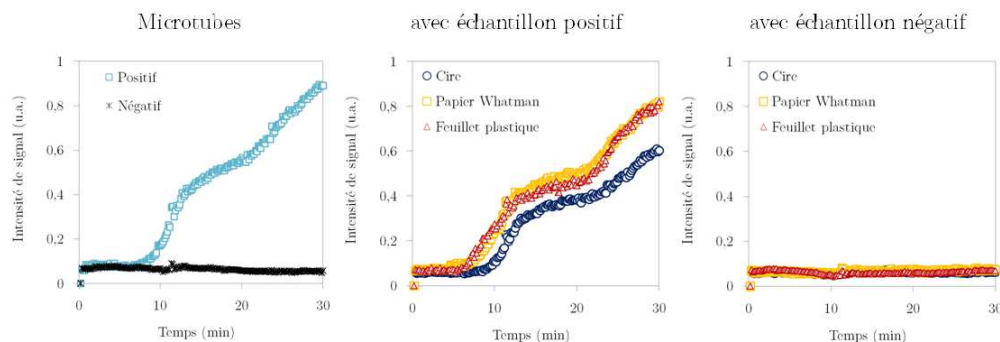
La figure 6.31 présente le bilan de l'influence de la température sur la réaction RT-RPA. Pour chaque concentration, l'intensité maximale de la courbe est reportée en fonction de la température de réaction. Comme prévu par le fournisseur, 40 °C est la température optimale pour une sensibilité et une intensité de signal maximales.



**Figure 6.31** – Influence de la température sur l'intensité de signal pour l'amplification RT-RPA de différentes concentrations d'ARN cible.

### Recherche d'inhibiteurs d'amplification

La biocompatibilité des éléments utilisés pour fabriquer les puces papier est testée en microtubes. Pour cela, un petit morceau (volume de l'ordre de  $10 \text{ mm}^3$ ) de chaque matériau est ajouté dans des microtubes individuels contenant un mélange réactionnel et un échantillon positif ou négatif. Les courbes d'amplification obtenues dans chacune des conditions sont présentées en figure 6.32.



**Figure 6.32** – Amplifications RT-RPA en microtubes en présence des matériaux de fabrication des puces papier.

L'amplification d'un échantillon d'ARN ( $c = 10^9 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ) en présence de cire, de papier Whatman et de feuillet plastique n'est pas significativement différente de l'amplification témoin en microtubes en terme d'intensité de signal et de temps de détection. Dans les microtubes négatifs, aucun signal non spécifique n'est détecté en présence des mêmes matériaux.

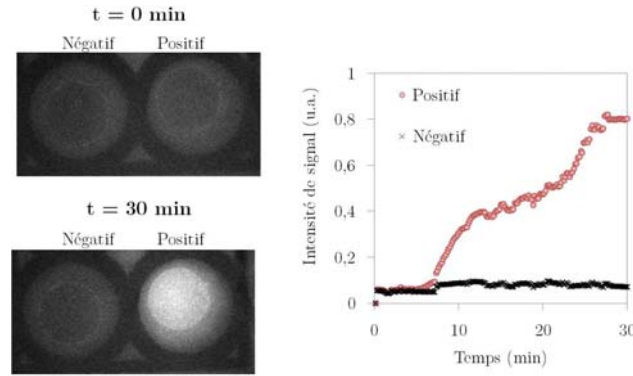
Dans le cas de l'amplification LAMP, de nombreux éléments nuisent à son utilisation sur papier comme l'inhibition par la cire, les interactions papier-intercalant et la température de consigne source d'une évaporation importante. La RT-RPA ne présente jusque là aucune contre-indication au développement d'une puce papier.

### 6.3.2 Réaction RT-RPA sur papier

Les premières expériences d'amplification par la RT-RPA sur papier consistent à déposer un milieu réactionnel fraîchement préparé dans des microzones papier avec barrières de cire. Après ajout d'un échantillon positif ou négatif (ARN cible ou eau), les puits sont scellés par des feuillets plastique. Les papiers sont chauffés à  $40^\circ \text{C}$  et une détection en fluorescence est réalisée toutes les secondes. La courbe d'amplification ainsi que les images de début et fin de réaction sont présentées en figure 6.33.

#### Stockage des réactifs

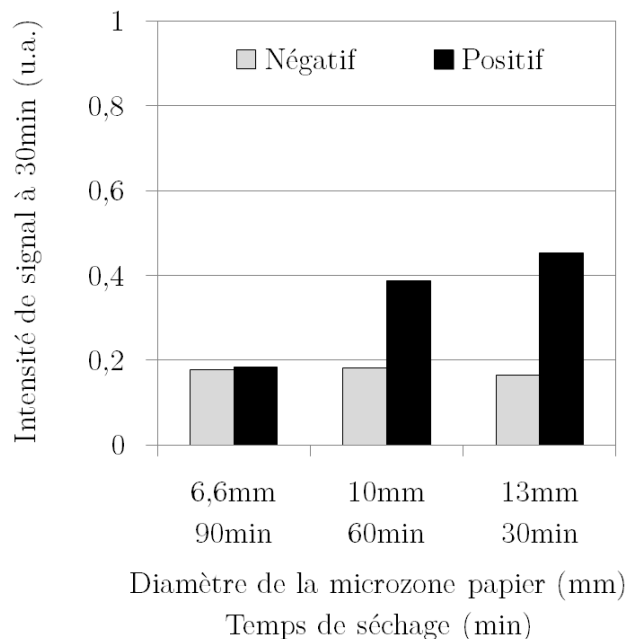
Afin de rendre la puce papier prête à l'emploi, des essais de séchage de réactifs de RT-RPA dans le papier sont réalisés. Pour cela, des fractions V/2 du mélange réactionnel fraîchement préparé et sans échantillon sont déposées sur des microzones papier avec barrières de cire. Ces gouttes de  $25 \mu\text{L}$  sèchent sur papier dans une boîte maintenue à  $10^\circ \text{C}$  sous un flux d'air sec.



**Figure 6.33** – Réaction RT-RPA sur papier avec des échantillons positifs (ARN synthétique à la concentration  $10^7$  copies /  $\mu\text{L}$ )

L'objectif est de maintenir les réactifs à une basse température pendant le séchage pour ne pas dénaturer les enzymes d'amplification. Selon le diamètre de la microzone papier (6,6 mm ; 10 mm ; 13 mm), le temps de séchage est plus ou moins long (de 30 à 90 min).

Les papiers contenant les réactifs séchés sont alors conservés à  $-20^\circ\text{C}$  pendant deux jours. Chaque microzone est alors réhydratée par une goutte d'eau de  $10\ \mu\text{L}$  contenant ou non l'ARN cible. Les résultats d'amplification pour chaque géométrie sont présentés en figure 6.34.



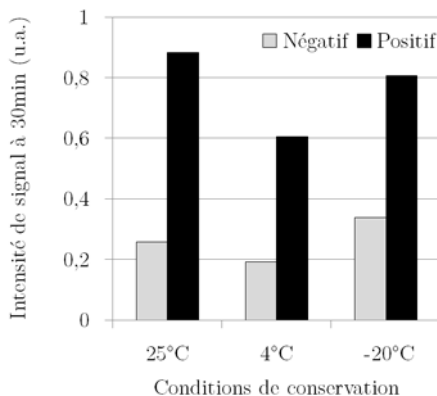
**Figure 6.34** – Intensité de signal finale après amplification d'ARN Ebola sur papier à partir de réactifs RT-RPA séchés sur des microzones de différents diamètres.

Pour la plus petite microzone, aucune amplification n'est observée avec l'échantillon positif. Avec les plus grandes microzones, l'amplification d'un échantillon d'ARN est détectée. Cette expérience montre que plus le temps de séchage des réactifs est long, moins ils sont fonctionnels.

La lyophilisation est une technique de conservation qui préserve mieux les propriétés et struc-

tures tridimensionnelles des composés séchés. Le principe est de solidifier à  $-20^{\circ}\text{C}$  le mélange réactionnel, puis de sublimer le solvant à basse pression.

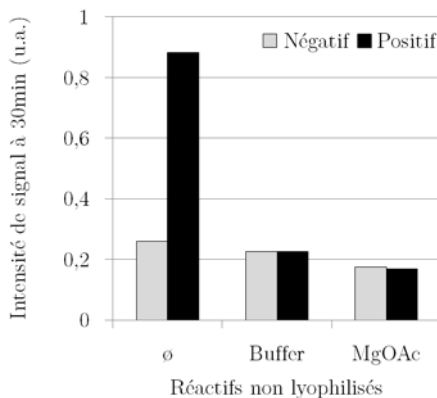
Dans l'expérience suivante (figure 6.35), les réactifs de RT-RPA sont lyophilisés sur des microzones papier. Après deux jours de conservation dans différentes conditions (à température ambiante, au réfrigérateur, au congélateur), chaque puits est réhydraté par  $10\ \mu\text{L}$  d'eau contenant ou non l'ARN cible.



**Figure 6.35** – Résultats d'amplification d'échantillons positif et négatif à partir de réactifs RT-RPA lyophilisés sur microzones papier et conservés dans différentes conditions de température.

Les résultats d'amplification sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus en microtubes, sans stockage des réactifs. L'écart de signaux le plus grand entre positif et négatif est obtenu pour la puce papier conservée à température ambiante. Il est donc possible de stocker les réactifs de RT-RPA dans le papier sans précautions particulières.

Le principe de lyophilisation des réactifs sur papier peut être appliqué à tout le mélange réactionnel ou bien à une partie seulement. Dans cette seconde configuration, les composés non lyophilisés sont utilisés pour la réhydratation des microzones papier lors de l'amplification (figure 6.36). L'ajout ultérieur de solution tampon ou d'acétate de magnésium empêche toute amplification. Il n'y a donc aucun intérêt à fragmenter le mélange réactionnel.



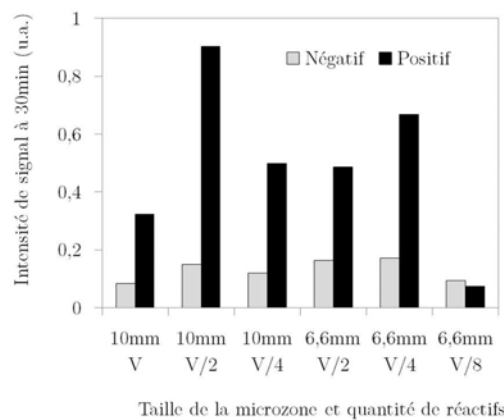
**Figure 6.36** – Amplification RT-RPA sur papier selon la nature du composé non lyophilisé.



### Réhydratation des réactifs

La concentration finale dans chaque microzone dépend de la quantité de réactifs lyophilisés et du volume utilisé pour la réhydratation. Par le confinement imposé, la taille de la microzone a aussi une influence.

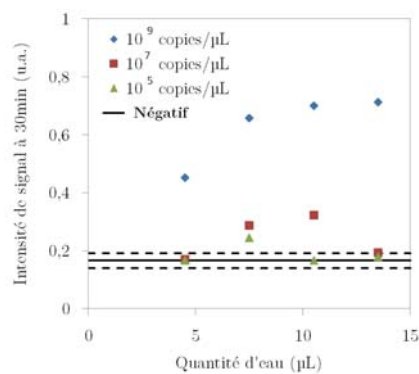
Différentes fractions du mélange réactionnel RT-RPA sont lyophilisées sur des microzones de diamètre 10 et 6,6 mm. Les microzones les plus grandes sont réhydratées avec un volume de 15  $\mu\text{L}$  et les plus petites par 10  $\mu\text{L}$ . Dans ces conditions, l'amplification d'un échantillon positif est comparée au signal émis par un test négatif (figure 6.37).



**Figure 6.37** – Amplification selon la quantité de réactifs lyophilisés et le diamètre de la microzone.

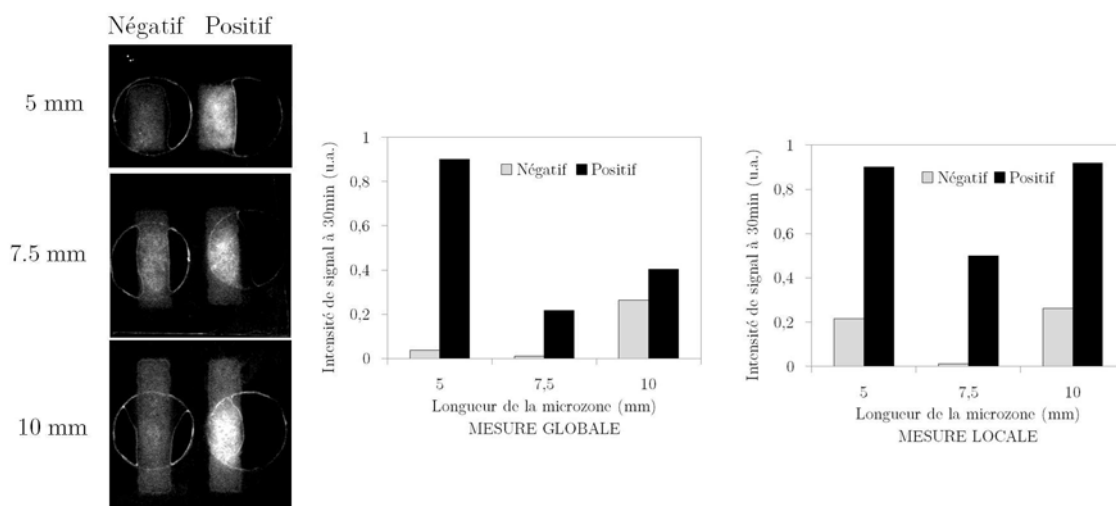
Les meilleurs résultats d'amplification sont obtenus avec une fraction V/2 de réactifs sur les microzones de diamètre 10 mm et avec une fraction V/4 de réactifs pour les microzones de diamètre 6,6 mm.

Dans chaque microzone de diamètre 6,6 mm, une fraction V/4 de réactifs est lyophilisée. Les courbes présentées en figure 6.38 font la synthèse des résultats d'amplification pour différentes concentrations en ARN cible et selon le volume de réhydratation des réactifs. Il existe un volume optimal de réhydratation - 7,5  $\mu\text{L}$  - qui maximise la détection des échantillons.



**Figure 6.38** – Sensibilité de détection par RT-RPA sur papier en fonction du volume de réhydratation des réactifs lyophilisés.

Dans la géométrie rectangulaire, compatible avec le dispositif de détection transportable, un volume V/4 de réactifs est lyophilisé. L'amplification d'échantillons positifs est mesurée globalement sur toute la microzone papier ou localement au niveau de la zone de dépôt de goutte (figure 6.39). Dans les microzones les plus grandes, la répartition spatiale du signal d'amplification est plus inhomogène que dans les petites microzones.



**Figure 6.39** – Amplification RT-RPA sur microzones rectangulaires de différentes longueurs, à partir de réactifs V/4. Mesures globales sur toute la microzone ou locales au niveau du dépôt de goutte.

Ceci s'explique par les deux contributions au signal total : le liquide dans le papier et l'excès de liquide en surface du papier localisé seulement sur la zone de dépôt de goutte. Alors que le papier a une épaisseur de 180  $\mu\text{m}$ , les trois feuillets plastique perforés constituent un réservoir de liquide d'une hauteur de 300  $\mu\text{m}$ . La réaction détectée est donc principalement celle dans la goutte, sur le papier.

### Sensibilité et conservation

La même réaction d'amplification d'ARN Ebola a été réalisée en microtubes et sur papier (géométrie circulaire de diamètre 10 mm) à partir de fractions V/2 de réactifs. Les papiers contenant le mélange réactionnel lyophilisé ont été préparés 2, 6 ou 30 jours avant l'expérience et conservés à température ambiante, emballés avec du desséchant à l'abri de la lumière et de l'humidité. Plusieurs concentrations d'ARN ont été utilisées afin d'estimer la sensibilité du dispositif papier. Les résultats d'amplification sont présentés en figure 6.40.

En microtubes la sensibilité de la réaction RT-RPA atteint  $10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ . Sur papier, la fluorescence intrinsèque cause un bruit de fond plus important sur tous les échantillons et limite la détection à une concentration de  $10^7$  copies/ $\mu\text{L}$ . Un papier préparé un mois à l'avance est toujours fonctionnel mais la dégradation des réactifs ne permet la détection que des échantillons les plus concentrés ( $10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ ).

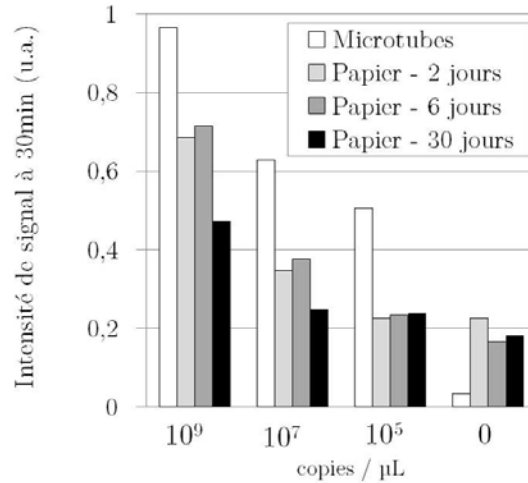


Figure 6.40 – Sensibilité de détection et conservation des réactifs lyophilisés sur papier.

### Choix des primers

L'amplification RT-RPA de la séquence A d'ARN synthétique Ebola est réalisée sur papier avec 12 types de primers. Les réactifs sont lyophilisés dans la géométrie de microzones rectangulaires, compatibles avec l'instrumentation transportable. Deux concentrations en ARN sont analysées ( $10^7$  et  $10^5$  copies/ $\mu$ L) ainsi qu'un contrôle négatif. Les intensités de signal après 20 minutes de réaction sont rassemblées en figure 6.41.

Le primer A3 est celui qui donne l'intensité de signal la plus élevée pour l'échantillon d'ARN à la concentration  $10^7$  copies/ $\mu$ L mais le rapport signal à bruit de 1,3 reste faible pour l'échantillon plus dilué. Des résultats similaires sont obtenus pour les primers A1, A8 et A11.

Seul le primer A atteint un rapport signal à bruit de 2,5 pour la concentration à  $10^5$  copies/ $\mu$ L et une intensité de signal élevée (supérieure à 0,6) pour l'échantillon plus concentré.

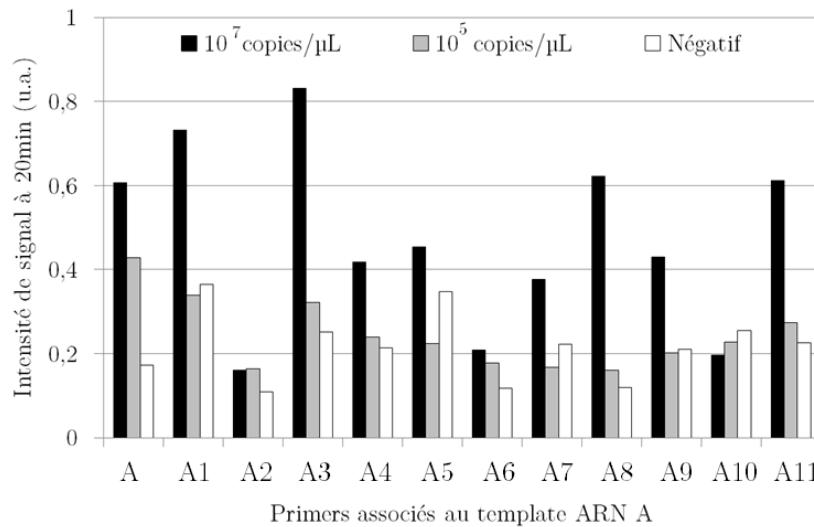
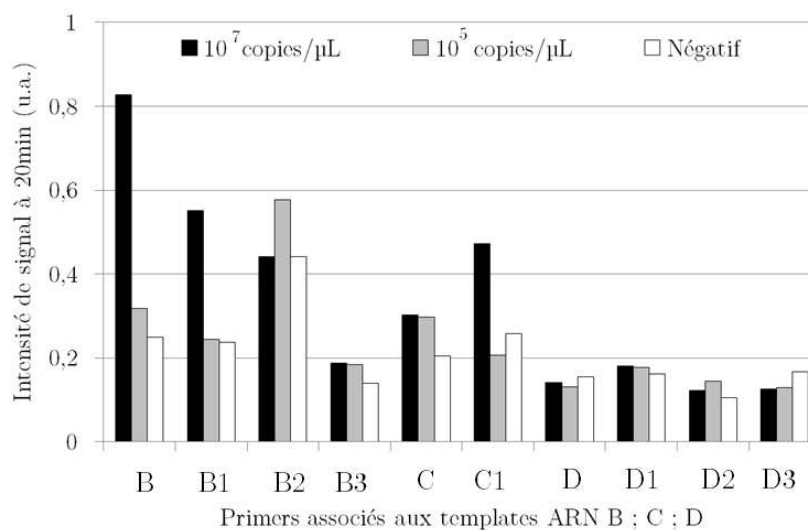


Figure 6.41 – Amplification RT-RPA sur papier par différents primers ciblant l'ARN A.

La même expérience est réalisée avec des primers ciblant les séquences B, C ou D d'ARN synthétiques. La figure 6.42 présente les résultats d'amplification pour deux échantillons d'ARN ( $10^7$  et  $10^5$  copies/ $\mu$ L) et un témoin négatif.

Pour l'ARN B, l'intensité de signal la plus élevée est obtenue avec le primer B pour l'échantillon le plus concentré. La concentration d'ARN à  $10^5$  copies/ $\mu$ L est obtenue avec un modeste rapport signal à bruit de 1,2. Ce même échantillon est plus facilement détecté avec les primers B2 qui pourtant ne permettent pas l'amplification des plus grandes concentrations d'ARN. Les très faibles niveaux de fluorescence émis avec les primers B3 rendent difficile leur détection.



**Figure 6.42** – Amplification RT-RPA sur papier par différents primers ciblant les ARN B, C ou D.

L'échantillon C à la concentration  $10^7$  copies/ $\mu$ L est plus facilement détecté avec les primers C1 mais la plus faible concentration n'est pas amplifiée. Les primers C sont donc plus appropriés pour les applications diagnostiques.

Quels que soient les primers, l'amplification de l'échantillon D n'est pas observée.

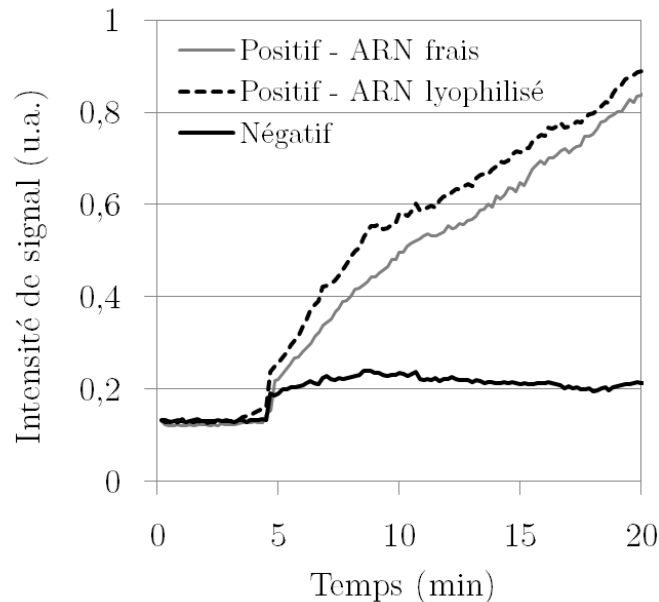
Les primers A, B, C et D ciblent des régions disjointes du génome du virus Ebola. Avec les brins d'ARN synthétiques, il n'est pas possible de prédire lequel aura une meilleure affinité avec l'ARN viral.

### Outils de diagnostic

Avec la conservation des réactifs de RT-RPA séchés dans le papier, la biologie moléculaire se rapproche d'un outil de diagnostic de terrain. Deux fonctions essentielles doivent être analysées pour compléter ce test : des contrôles internes assurant le bon fonctionnement du dispositif et la préparation d'échantillons.

**Contrôles internes et tests échantillons** Pour chaque test d'un échantillon inconnu, il faut s'assurer que les réactifs sont bien fonctionnels et qu'aucune source de contamination n'a pollué le papier. Pour cela, chaque expérience est complétée par deux contrôles internes : l'un positif, l'autre négatif.

Le contrôle négatif est la simple réhydratation des réactifs par de l'eau. Le contrôle positif consiste à vérifier que les réactifs donnent bien un signal d'amplification en présence d'ARN cible. Pour cela, un échantillon d'ARN est lyophilisé en même temps que les réactifs dans l'une des microzones. En figure 6.43, les courbes d'amplification montrent bien que la réaction RT-RPA se produit de la même façon, que l'échantillon d'ARN soit lyophilisé avec les réactifs ou non.



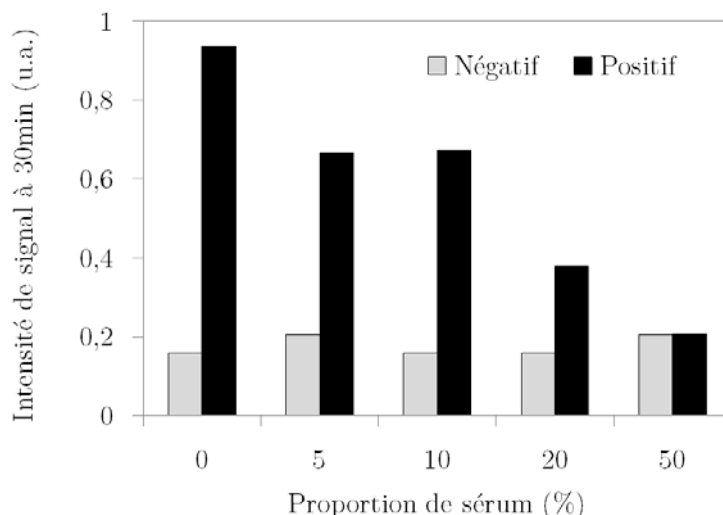
**Figure 6.43** – Courbe d'amplification sur papier à partir de réactifs RT-RPA lyophilisés, en présence d'une solution liquide d'ARN ou d'ARN lyophilisé sur papier.

Pour chaque test d'échantillon inconnu, une puce papier contenant des réactifs RT-RPA lyophilisés dans trois microzones est nécessaire. L'une des microzones contient également l'ARN cible de contrôle. Le test biologique consiste à réhydrater les deux microzones de contrôle par l'eau et la troisième microzone par l'échantillon biologique. L'amplification se produit alors à 40 ° C et est suivie en fluorescence.

**Nature et préparation de l'échantillon biologique** Jusqu'à présent les échantillons utilisés sont des fragments synthétiques d'ARN. La cible du virus Ebola rend difficile l'accès à des échantillons de patients. A partir de sang total, la préparation d'échantillon nécessite la lyse du virus pour libérer les ARN viraux suivie d'une étape de purification qui consiste à isoler le matériel génétique.

Dans un premier temps, la robustesse de la réaction RT-RPA vis à vis des inhibiteurs biologiques est étudiée. La figure 6.44 présente les résultats d'amplification d'ARN synthétiques en présence de différentes dilutions de sérum humain.

Par rapport à une référence d'ARN dilué dans l'eau, plus la proportion de sérum est importante, plus la réaction est inhibée. Un mélange à 50% eau-sérum suffit à empêcher toute amplification. Avec un sérum plus dilué, il est possible de lever partiellement l'inhibition pour rendre possible la détection.



**Figure 6.44** – Inhibition de l'amplification RT-RPA d'ARN en présence de différentes dilutions de sérum.

Compte tenu des précautions extrêmes nécessaires lors de la manipulation du virus Ebola, il n'a évidemment pas été possible d'étudier la lyse du virus et les étapes de préparation d'échantillon sur papier. Cependant, pour se rapprocher de la réalité biologique, les ARN synthétiques ont été remplacés par des ARN viraux extraits de patients guinéens infectés par le virus Ebola.

### 6.3.3 Expériences sur des échantillons cliniques en Guinée

Pour faire face à l'épidémie du virus Ebola en Guinée, les Croix Rouges Française et Guinéenne ont mis en place des Centres de Traitement Ebola (CTE) sur l'ensemble du territoire guinéen. Ces CTE constituent un lieu de diagnostic et de traitement des patients. Des équipes sont également chargées de missions de prévention pour casser la chaîne de propagation du virus et proposent un accompagnement psychologique des familles de malades. Des détails sur l'organisation et les différents services d'un CTE sont présentés en annexe C.

Au sein du CTE, un laboratoire de diagnostic est géré par les équipes de l'Institut Pasteur. Au cours de l'épidémie, l'ARN viral extrait des échantillons biologiques de patients infectés ou non par le virus Ebola, a été conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ce sont ces précieux échantillons que nous avons utilisés pour caractériser les performances de diagnostic de notre dispositif de RT-RPA sur papier, avec le consentement des patients et l'accord du comité d'éthique guinéen. L'analyse des résultats expérimentaux fait appel à des notions définies en annexe A

#### Conditions d'expériences

Le système de détection transportable impose la géométrie rectangulaire des microzones papier. Les résultats expérimentaux obtenus au laboratoire sur ARN synthétique orientent le choix du format de microzones de longueur 5 mm. Une fraction V/4 du mélange réactionnel est lyophilisée dans chaque microzone. Un volume de  $2,5\ \mu\text{L}$  d'ARN synthétique à la concentration  $10^7$  copies/ $\mu\text{L}$  est lyophilisé dans l'une des microzones, c'est le contrôle positif. Cette concentration est volontairement placée à la limite de détection pour s'assurer du bon fonctionnement

des réactifs. Sur chaque papier, le contrôle négatif est positionné entre le contrôle positif et le test échantillon.

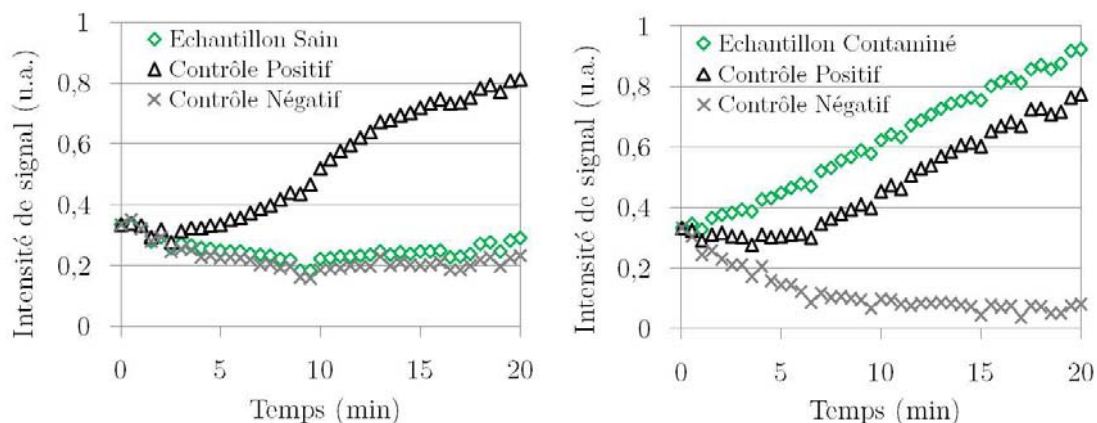
Si en laboratoire c'est le primer A qui a présenté les meilleures performances, il est difficile d'extrapoler pour l'ARN viral les résultats obtenus sur ARN synthétiques. Un lot d'une centaine de papiers est préparé pour chaque type de primers : A, A1, B et Ref.

Les papiers prêts à l'emploi sont conditionnés individuellement dans du papier aluminium, puis par groupes de dix dans des sachets hermétiquement scellés et contenant du desséchant. A l'abri de la lumière et de l'humidité, ils sont transportés en Guinée, jusqu'à Macenta par avion puis par la route pendant la saison des pluies. Ils sont par la suite stockés dans le laboratoire climatisé du CTE. Un délai d'un mois est atteint entre la préparation des papiers et les premières expériences en Guinée.

Les expériences ont été réalisées sur une sélection de 34 échantillons positifs et 16 échantillons négatifs. Des expériences complémentaires a posteriori, en France, sur 18 échantillons de patients sains, ont permis d'atteindre un total de 68 échantillons. Les échantillons positifs ont été choisis de manière à représenter une large gamme de concentration à partir de la donnée du résultat de qRT-PCR. Contrairement à ce qui est préconisé pour l'évaluation des tests diagnostiques, il n'a pas été possible de faire les expériences à l'aveugle.

### Résultats expérimentaux

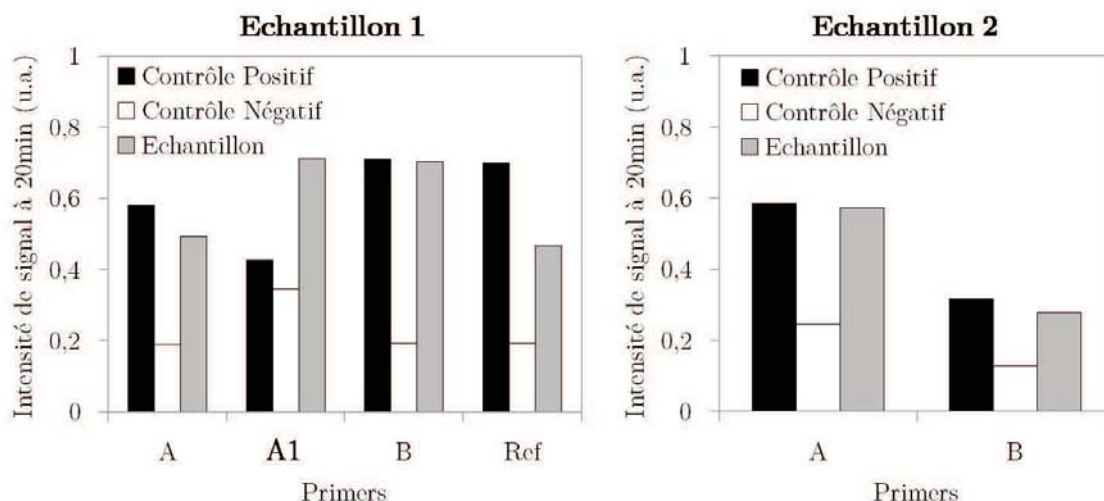
Pour chaque expérience, l'instrumentation transportable donne accès aux courbes d'amplification des trois microzones : le test de l'échantillon et les contrôles positifs et négatifs. Deux exemples de résultats expérimentaux sont présentés en figure 6.45 dans le cas d'échantillons de patient sain et de patient infecté par le virus Ebola.



**Figure 6.45** – Courbes d'amplification RT-RPA sur papier obtenues sur les échantillons guinéens dans le cas de patients sains ou infectés par le virus Ebola, et contrôles associés.

Dans les deux cas, la fluorescence émise par les contrôles correspond bien à leur statut positif ou négatif. L'échantillon de patient reste à un niveau stable lorsqu'il est négatif et augmente presque linéairement au cours du temps s'il est positif.

L'amplification d'un échantillon positif est réalisée sur plusieurs papiers préparés avec des mélanges réactionnels contenant les différents primers. Les résultats d'amplification sont résumés en figure 6.46.



**Figure 6.46** – Résultats d'amplification RT-RPA sur papier, pour des échantillons guinéens selon la séquence des primers.

Pour l'échantillon 1, les courbes d'amplification atteignent des intensités de signal équivalentes pour les primers A et B comparées à la Référence déjà publiée. Avec les primers A1, le contrôle négatif est anormalement élevé. La même expérience est réalisée sur un deuxième échantillon pour affiner la sélection entre les primers A et B. Les faibles niveaux de fluorescence mesurés avec les primers B nous orientent vers le choix des primers A.

### Analyse statistique

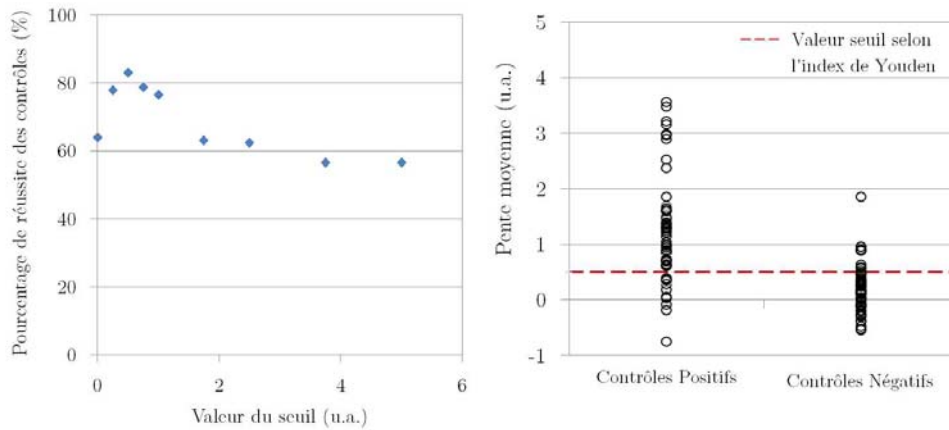
**Critère d'analyse** Pour chaque courbe d'amplification, une moyenne glissante de la pente est calculée sur des intervalles de 5 minutes, de 10 à 20 minutes.

**Résultats sur les contrôles internes** Le statut positif ou négatif des contrôles est défini par la présence ou l'absence d'ARN lyophilisé dans la microzone. En parallèle, le critère de pente permet de classer les résultats obtenus sur papier entre positifs et négatifs selon une valeur seuil. Selon la valeur choisie pour ce seuil, le nombre de contrôles correctement identifiés varie. Il existe donc une valeur seuil optimale qui permet d'identifier au mieux les contrôles positifs et négatifs (figure 6.47), c'est l'index de Youden. Malgré le fait que tous les contrôles positifs contiennent la même quantité d'ARN cible, les courbes d'amplification donnent lieu à une grande variété de pentes. Les contrôles négatifs sont mieux rassemblés autour d'une valeur de pente nulle.

Pour un seuil positionné à 0,5 u.a., 83,1% des contrôles sont considérés comme fonctionnels. Douze contrôles positifs et onze contrôles négatifs sont mal identifiés pour cette valeur de seuil. Dans aucun des cas ces erreurs ne sont réunies au sein d'un même papier. Par conséquent, sur les 68 papiers, seuls 45 présentent simultanément des contrôles positifs et négatifs fonctionnels.

Les contrôles négatifs consistent en une réhydratation par l'eau du milieu réactionnel. Les valeurs de pente sont bien rassemblées entre -1 et 1. Dans les contrôles positifs, l'eau réhydrate les réactifs et un ARN cible lyophilisé, toujours à la même concentration. Tous les papiers ont



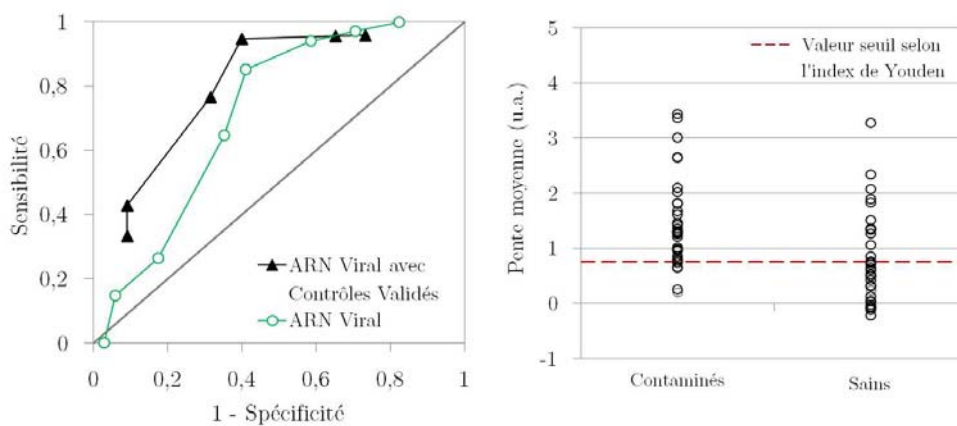


**Figure 6.47** – Analyse des résultats d'amplification des contrôles : identification du statut positif ou négatif selon la valeur de la pente de la courbe.

été préparés à la chaîne, transportés et conservés dans des conditions identiques. Pourtant, il apparaît une grande variabilité de pente caractérisant l'amplification. Les résultats ne montrent pas une grande reproductibilité sur ARN synthétique.

**Analyse d'échantillons** L'analyse statistique des expériences sur les 68 échantillons consiste à classer les résultats dans un tableau 2x2 de contingence. Le statut malade / non-malade est défini par la donnée de qRT-PCR. Pour le résultat de RT-RPA sur papier, il faut choisir une valeur seuil de pente au-delà de laquelle l'échantillon est diagnostiqué positif, en-deçà négatif.

Pour éviter un choix arbitraire de seuil, une courbe ROC résume les performances du test en termes de sensibilité et spécificité pour chaque valeur de seuil (figure 6.48). Une deuxième courbe ROC est établie en ne tenant compte que des papiers dont les contrôles sont correctement identifiés à valeur de seuil donnée.



**Figure 6.48** – Analyse des résultats d'amplification des extraits d'ARN viraux : courbes ROC et distribution des valeurs de pente selon le statut Contaminé ou Sain de l'échantillon.

A partir des courbes ROC, le calcul de l'aire sous la courbe ( $AUC = \text{Area Under Curve}$ ) permet de caractériser les performances de diagnostic du test : 1 dans un cas idéal ; 0,5 en régime aléatoire. Avec l'ARN viral, l'aire sous la courbe ROC est calculée à 0,71. En ne tenant compte que des papiers pour lesquels les contrôles sont bien fonctionnels, ce paramètre atteint 0,80.

Dans ce cas-ci, les tests négatifs sont obtenus par la réhydratation du milieu réaction par une extraction d'ARN ne contenant pas l'ARN cible. La distribution des valeurs de pente est beaucoup plus large que dans le cas des contrôles négatifs. Les échantillons cliniques positifs ont, au contraire des contrôles positifs, des concentrations variées en ARN Ebola. Le paramètre de pente est supérieur à 1 pour 64,7% des tests.

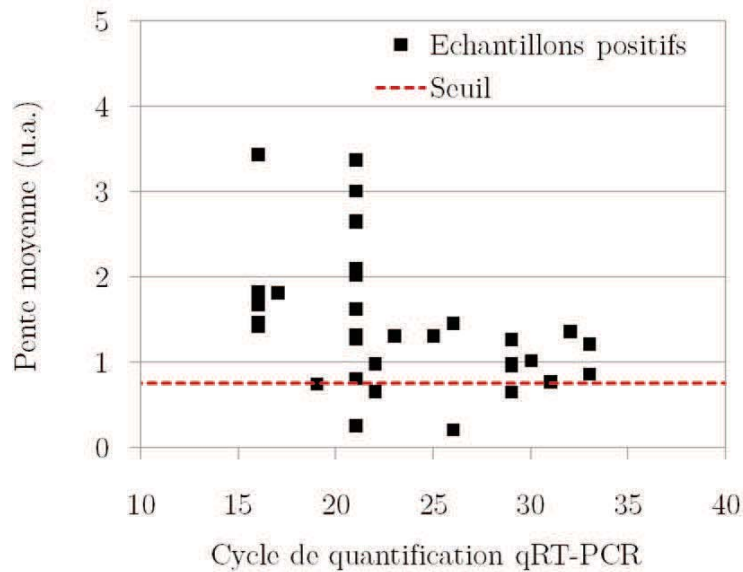
L'index de Youden permet ici encore de sélectionner le seuil qui maximise le nombre de sujets bien classés. Sur la courbe ROC, c'est le point qui minimise la distance entre la courbe et le point  $[0;1]$ . Pour un seuil de 0,75, les performances de sensibilité et spécificité sont respectivement de 85,3% et 58,8% pour l'ensemble des échantillons cliniques. En sélectionnant les expériences pour lesquelles les contrôles ont bien fonctionné, ces indices atteignent 94,7% et 60%. Les tableaux de contingence sont disponibles en figure 6.49 et rendent compte des tailles d'échantillons : 68 pour les ARN viraux, 39 lorsque l'on considère les contrôles.

		ARNs viraux				ARNs viraux avec contrôles valides			
		RT-PCR				RT-PCR			
		Positif	Négatif			Positif	Négatif		
RT-RPA sur papier	Positif	29	14	43	RT-RPA sur papier	Positif	18	8	26
	Négatif	5	20	25		Négatif	1	12	13
		34	34	68			19	20	39

**Figure 6.49** – Tableaux de contingence des expériences RT-RPA sur papier à partir d'ARNs viraux, pour un seuil à 0,75.

Dans une situation d'épidémie, il est préférable de maximiser la sensibilité pour détecter au mieux tous les individus contaminés au risque d'isoler des patients sains. Un seuil de 0,25 élève la sensibilité à 95,8% au détriment de la spécificité qui chute à 26,7%.

Dans la figure 6.50, les résultats d'amplification RT-RPA sur papier d'échantillons positifs sont comparés à la valeur du cycle de détection en qRT-PCR. La valeur de seuil est positionnée à 0,75 comme défini précédemment par la courbe ROC. Il apparaît que même les échantillons détectés tardivement en qRT-PCR (entre 30 et 35 cycles) donc les plus dilués, sont diagnostiqués positifs par les dispositifs papier.



**Figure 6.50** – Analyse des échantillons positifs : pente moyenne de la courbe d’amplification en RT-RPA sur papier en fonction du cycle de quantification en qRT-PCR.

### Conclusions sur les résultats obtenus en Guinée

Ces expériences en Guinée ont donné une opportunité unique de confronter les dispositifs papier et l’instrumentation transportable à des conditions d’un laboratoire de terrain et à des échantillons cliniques.

Si le laboratoire du CTE (équipé, connecté au réseau électrique, climatisé) est encore loin d’une situation au chevet du patient, il a permis d’éprouver l’instrumentation transportable. Après quarante expériences, un problème technique est apparu dans le système chauffant. Le manque de matériel pour le réparer a conduit à utiliser en remplacement un sèche-cheveux. Placé à bonne distance, il a permis d’atteindre les 40 ° C requis au niveau du papier, les expériences se sont bien déroulées.

Dans la littérature, l’amplification d’acides nucléiques sur papier est démontrée dans la plupart des cas sur des systèmes modèles comme E.Coli [154] ou des ARN synthétiques [152, 153, 157, 159]. Nos expériences en Guinée démontrent les performances de diagnostic dans le cas d’un pathogène d’intérêt - le virus Ebola - et à partir d’extraits d’ARN viraux, sur des papiers préparés un mois à l’avance. L’accès à des échantillons de patients est essentiel pour observer toute la diversité biologique en termes de concentrations et de co-infections (paludisme, typhoïde, ...).

## 6.4 Parallélisation des expériences pour un diagnostic multiplexé

Trois géométries multicouches ont été dessinées afin de réhydrater simultanément plusieurs puits réactionnels. Dans une première configuration, il s'agit de réaliser en parallèle les réactions de contrôles positif et négatif ainsi que le test d'un échantillon. Dans un second dispositif papier, neuf puits sont répartis de manière circulaire. Ils constituent trois diagnostics qui incluent systématiquement le test échantillon et les deux contrôles internes. Enfin, une géométrie matricielle propose une généralisation de la parallélisation.

Dans chacun des cas, les propriétés d'écoulement sont observées grâce au transport de colorants et caractérisées par des calculs de diffusion et convection. La parallélisation d'amplification RT-RPA est démontrée dans les deux premières géométries.

### 6.4.1 Etude des propriétés d'écoulement

Des colorants séchés dans les couches internes des puces papier permettent d'illustrer différentes fonctions comme la réhydratation de l'ensemble du dispositif ou l'absence de contaminations croisées entre les puits. Les vitesses d'écoulement sont calculées pour estimer le temps nécessaire à la réhydratation de tous les puits. Enfin, des calculs de diffusion en tenant compte de la température, caractérisent les contaminations croisées.

#### Géométrie à trois puits

La puce papier assurant la réhydratation simultanée de trois puits réactionnels est constituée de quatre épaisseurs contenant : une bandelette, un puits central, trois microcanaux de distribution, trois microzones (figure 6.51).

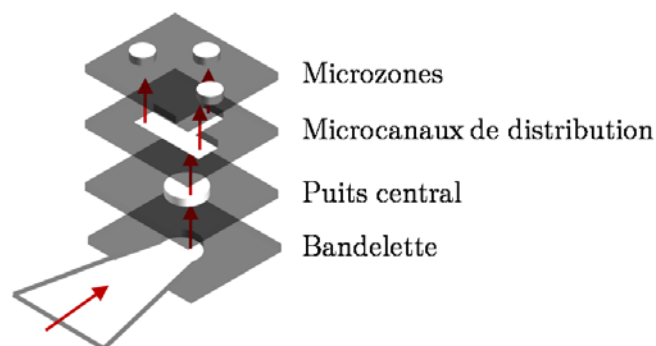


Figure 6.51 – Fonction de chaque épaisseur de la puce papier à trois puits réactionnels.

Un premier régime transitoire consiste à réhydrater l'ensemble du dispositif par la bandelette jusqu'aux microzones. Un régime stationnaire de 30 minutes à 40 ° C laisse le temps à la réaction biologique de se produire. Il faut alors que les puits réactionnels restent bien hydratés.

**Démonstrations colorimétriques** Une première visualisation des écoulements est réalisée en séchant 5  $\mu\text{L}$  de fluorescéine ( $c = 10^{-3}\text{g/mL}$ ) dans le puits central sur le dispositif déplié (figure 6.52). Lorsque la puce papier est repliée, la fluorescéine est stockée à l'intérieur d'une seule épaisseur de papier. La bandelette plongée dans l'eau permet d'initier l'écoulement. Dans le puits central, l'eau dissout la fluorescéine qui est alors transportée jusqu'aux microzones de la dernière épaisseur. Cette expérience démontre deux fonctions de cette géométrie papier : la réhydratation simultanée de trois puits et la distribution de réactifs depuis un réservoir commun.

1. Colorants séchés sur le dispositif déplié



2. Bandelette plongée dans l'eau – dispositif replié

t = 0 min



t = 10 min



**Figure 6.52** – Distribution de la fluorescéine séchée dans le puits central, vers les trois microzones par l'écoulement depuis la bandelette.

L'indépendance entre les microzones est démontrée en utilisant ce même dispositif auquel la dernière épaisseur de papier est ajoutée deux fois (figure 6.53). Des colorants bleu et rouge sont séchés dans les microzones de l'épaisseur intermédiaire, sur le dispositif déplié. L'écoulement d'eau depuis la bandelette jusqu'à la dernière épaisseur de la puce papier transporte chacun des colorants dans une microzone sans mélange d'un puits réactionnel à l'autre.

1. Colorants séchés sur le dispositif déplié



2. Bandelette plongée dans l'eau – dispositif replié

t = 0 min

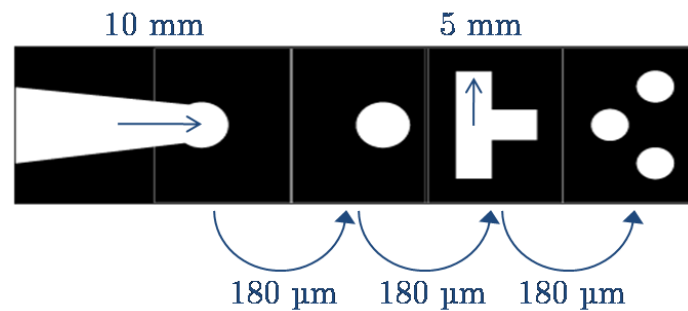


t = 10 min



**Figure 6.53** – Démonstration de l'indépendance des microzones par des colorants bleu et rouge.

**Calculs de diffusion** Les dimensions de la puce papier, résumées en figure 6.54, font que la distance qui sépare la bandelette des puits réactionnels est de 15,5 mm : 10 mm dans la bandelette de papier, 5 mm dans les microcanaux de distribution et  $3 \times 180 \mu\text{m}$  pour le passage d'une épaisseur de papier à l'autre.



**Figure 6.54** – Calcul des distances de parcours de l'écoulement en fonction des dimensions de la puce papier.

A partir de cette distance et d'après les mesures d'avancée du front liquide dans un microcanal droit, présentées dans le chapitre 3, il faudrait 1,7 minute à un écoulement qui suit la loi de Lucas-Washburn pour réhydrater l'ensemble du dispositif. Selon la vitesse moyenne dans le papier annoncée par le fournisseur - 130 mm / 30 min - 3,6 minutes seraient nécessaires pour que l'eau s'écoule depuis la bandelette jusqu'aux microzones. Expérimentalement, le temps de réhydratation du dispositif est d'environ 4 minutes.

L'écart à la loi de Lucas-Washburn s'explique par la géométrie qui impose un élargissement. En effet, le diamètre du puits central est de 5 mm. Dans l'épaisseur suivante, chaque microcanal a une largeur de 2 mm, soit  $3 \times 2 = 6$  mm de largeur cumulée. Cette configuration n'est donc pas équivalente à un microcanal droit et l'élargissement brise l'hypothèse de réservoir infini.

Les caractéristiques de diffusion des espèces en solution sont étudiées dans les deux régimes d'écoulement : d'abord l'écoulement qui remplit initialement le dispositif, puis les 30 minutes de réaction à 40 ° C.

Le nombre de Peclet compare les effets de transport convectif à la diffusion. Avec une vitesse d'écoulement de 0,07 mm/s sur une distance de 15,5 mm, le transport par l'écoulement est bien plus rapide que la diffusion des espèces les plus mobiles (coefficient de diffusion de la fluorescéine  $D = 4,25 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ )

$$Pe = \frac{av}{D} = \frac{15 \times 0,07}{4,25 \times 10^{-4}} = 2,4 \times 10^3 \gg 1 \quad (6.1)$$

Avec un nombre de Peclet très grand devant 1, ce sont donc bien les effets de transport convectif par l'écoulement qui déterminent le déplacement des espèces en solution, de manière unidirectionnelle, depuis la bandelette jusqu'aux microzones.

Dans le régime stationnaire, la pompe capillaire n'agit plus puisque tout le dispositif est rempli par l'eau. Seule la diffusion peut autoriser les contaminations croisées d'une microzone à l'autre. Le temps de diffusion est calculé, dans l'équation 6.2, en tenant compte de la distance (10 mm) séparant deux puits réactionnels et du coefficient de diffusion à 40 ° C (pour la fluorescéine :  $6,10 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ ).

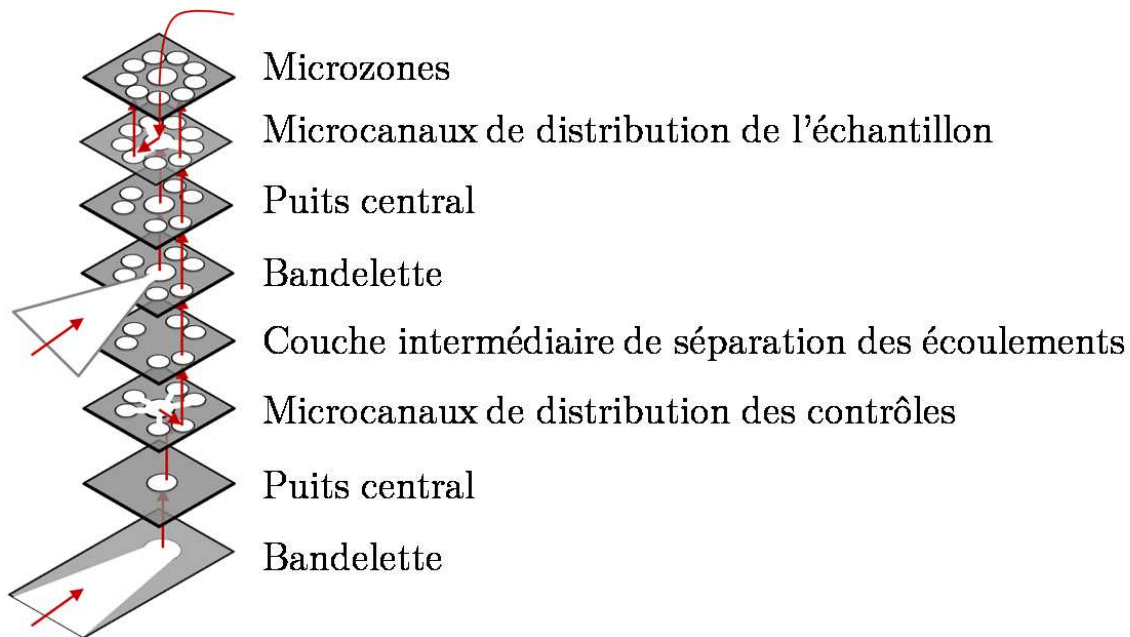
$$t = \frac{a^2}{D} = \frac{10^2}{6,10 \times 10^{-4}} = 1,6 \times 10^5 \text{s} = 45,5 \text{h} \gg 30 \text{min} \quad (6.2)$$

La diffusion peut être négligée puisqu'il lui faudrait le temps de presque 100 réactions pour que les espèces migrent d'une microzone à l'autre.

La géométrie permettant la réhydratation de trois puits réactionnels semble compatible avec l'amplification d'acides nucléiques par RT-RPA : il faut seulement 4 minutes pour que l'eau pompée depuis la bandelette atteigne les microzones, et les 30 minutes de réaction à 40 °C ne suffisent pas à observer de contaminations croisées par diffusion, entre les microzones.

### Géométrie à neuf puits

La puce papier présentée en figure 6.55 permet la réhydratation parallélisée de neuf microzones par deux bandelettes.



**Figure 6.55** – Définition des huit épaisseurs de la puce microfluidique à neuf puits.

Chaque bandelette transporte l'écoulement via un puits central, vers des microcanaux de distribution. Les microzones sont alors réparties de manière circulaire autour du puits central. Une bandelette alimente les microzones liées aux puits de contrôle, l'autre les tests échantillons. Une épaisseur de papier intermédiaire sépare les trajectoires de chaque bandelette. La dernière épaisseur de papier est perforée de sorte que l'échantillon puisse être apporté dans les microcanaux de distribution des puits échantillons.

**Démonstrations colorimétriques** Les trajectoires d'écoulement sont visualisées grâce à des colorants séchés dans la puce papier dépliée (figure 6.56). Un dépôt de fluorescéine séché dans le puits central des trajectoires de contrôle / d'échantillon est transporté par l'écoulement dans tous les puits contrôle / échantillon sans contaminations vers les autres microzones.

1. Colorants séchés sur le dispositif déplié

Contrôles



Echantillon

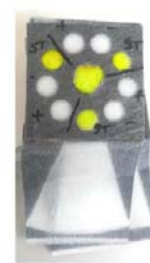


2. Bandelette plongée dans l'eau – dispositif replié

t = 0 min



t = 10 min



**Figure 6.56** – Transport vers les microzones de fluorescéine séchée dans les puits centraux de la puce papier à neuf puits.

L'indépendance entre les microzones est illustrée en figure 6.57 : des colorants bleu et rouge sont séchés dans les microzones de l'avant-dernière épaisseur de papier. L'écoulement depuis les bandelettes jusqu'aux microzones transporte les colorants vers les puits réactionnels sans contaminations croisées.

1. Colorants séchés sur le dispositif déplié



2. Bandelette plongée dans l'eau – dispositif replié

t = 0 min



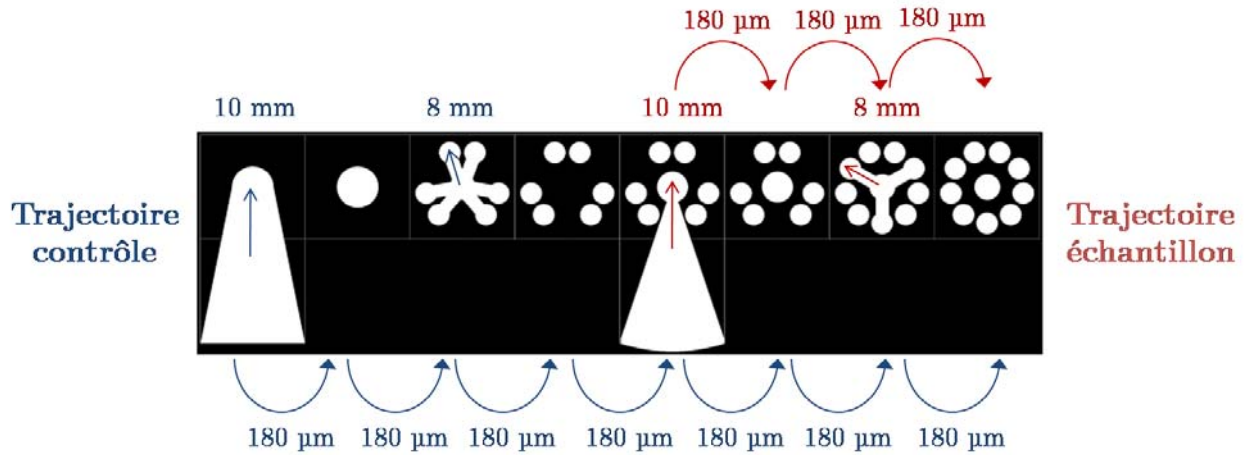
t = 10 min



**Figure 6.57** – Démonstration de l'indépendance des microzones, dans la puce papier à neuf puits, par des colorants bleu et rouge.



**Calculs de diffusion** Les distances de parcours, calculées à partir des dimensions présentées en figure 6.58, pour les trajectoires alimentant les puits contrôle et les puits échantillon sont respectivement de 19,3 mm et 17,5 mm. Selon la vitesse moyenne dans le papier (0,07 mm/s), il faut 4,5 et 4,3 minutes pour les réhydrater.



**Figure 6.58** – Calcul des distances de parcours de l'écoulement en fonction des dimensions de la puce papier, pour chacune des trajectoires contrôle et échantillon.

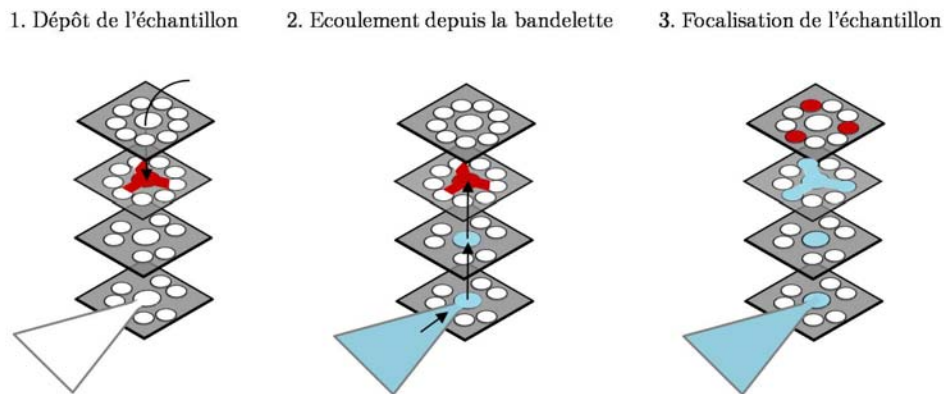
Le puits central de la trajectoire des contrôles a un diamètre de 7 mm. Il distribue l'écoulement vers 6 microcanaux de 2 mm de largeur, soit 12 mm de largeur cumulée. Ce fort élargissement, presque le double, ralentit considérablement l'écoulement. En pratique, il faut presque 10 minutes pour réhydrater tous les puits réactionnels.

En ce qui concerne la trajectoire des puits échantillons, le puits central a un diamètre de 5 mm alors que les trois microcanaux de distribution ont une largeur de 2 mm, soit seulement 6 mm de largeur cumulée. L'élargissement reste faible et modifie donc peu les propriétés d'écoulement.

Dans cette géométrie, la trajectoire menant aux puits échantillons est plus courte et provoque moins d'élargissement que celle liant les puits de contrôle à la bandelette. Ces deux éléments sont responsables d'une différence dans les temps de réhydratation des microzones des tests échantillons et des contrôles.

Les propriétés de transport convectif et de diffusion sont du même ordre de grandeur que dans le dispositif de parallélisation à trois puits. Il n'y a donc pas de contamination croisée possible par diffusion d'une microzone à l'autre.

**Transport de l'échantillon** En raison du volume mort dans le papier, le dépôt de 5 µL d'échantillon au centre des microcanaux de distribution de la deuxième épaisseur de papier ne suffit pas pour alimenter les trois microzones de test échantillon. L'écoulement d'eau depuis la bandelette assure le transport et la focalisation de l'échantillon dans les puits réactionnels (figure 6.59). En laissant les puits réactionnels sujets à l'évaporation, l'écoulement depuis la bandelette est entretenu pendant les 30 minutes de réaction pour éviter le séchage des microzones. Cet écoulement assure un transport maximal de tout l'échantillon.

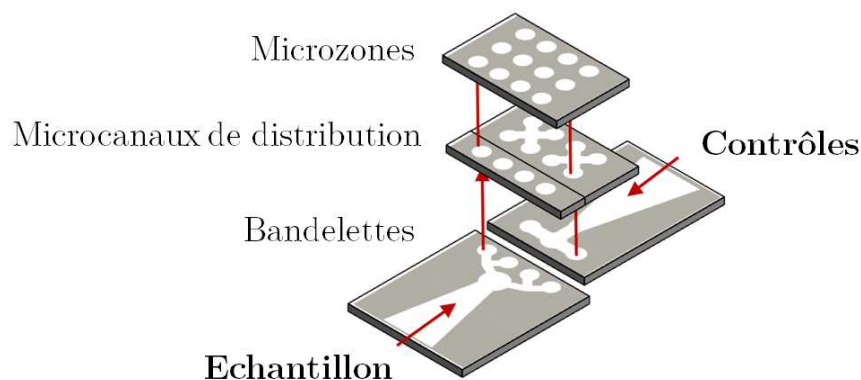


**Figure 6.59** – Dans la géométrie à neuf puits, focalisation spatiale de l'échantillon dans les microzones par l'écoulement depuis la bandelette.

La répartition circulaire des microzones autour de la zone de dépôt de l'échantillon rend difficile la généralisation du dispositif à un plus grand nombre de réactions. En effet, l'augmentation du nombre de microzones s'accompagne alors d'une augmentation des distances ou de la réduction de la taille des microzones. Le premier cas rallonge la durée du régime transitoire. Le deuxième cas nécessite une nouvelle optimisation des volumes et concentrations en réactifs pour un bon fonctionnement de la réaction. La géométrie circulaire peut être remplacée par une configuration matricielle dont les trois colonnes représentent le test échantillon et les deux contrôles internes, et le nombre de lignes est fixé par le nombre de cibles à détecter.

### Géométrie matricielle à douze puits

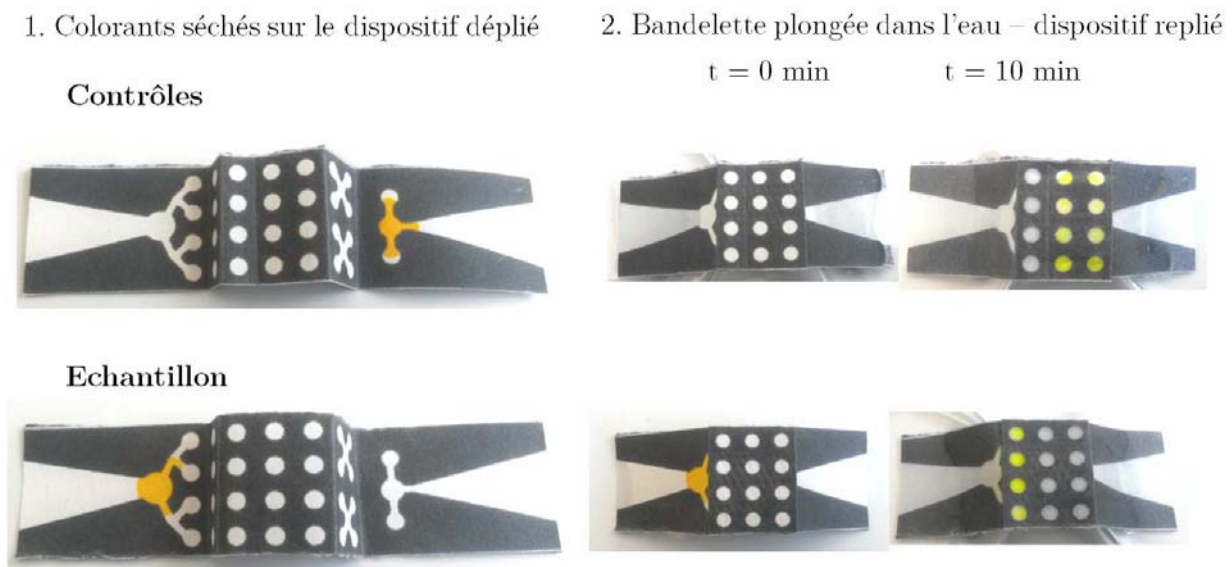
Comme dans la géométrie circulaire à neuf puits, les microzones de la configuration matricielle sont réhydratées par deux bandelettes qui assurent l'indépendance des trajectoires du test échantillon et des contrôles. Ces bandelettes sont réparties de part et d'autre de la puce papier et communiquent directement avec les microcanaux de distribution (figure 6.60). Seules trois épaisseurs de papier sont nécessaires pour distribuer l'écoulement depuis les bandelettes jusqu'aux microzones.



**Figure 6.60** – Définition des trois épaisseurs de la puce matricielle.

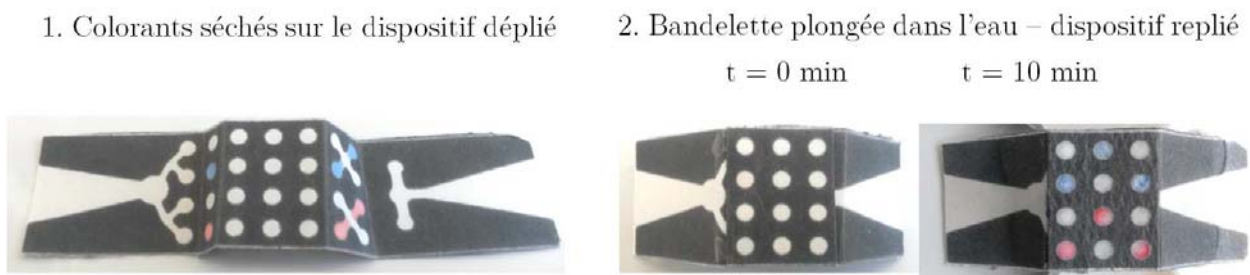
L'extension du dispositif à un plus grand nombre de tests nécessite seulement d'élargir les bandelettes. La lecture des résultats d'analyse semble également plus aisée sur chaque ligne.

**Démonstrations colorimétriques** L'illustration des différentes fonctions est présentée en figure 6.61. De la fluorescéine séchée dans la trajectoire contrôles / échantillon, est transportée respectivement vers les microzones contrôles / échantillon. Ces trajectoires indépendantes permettent de réhydrater spécifiquement les deux tiers du dispositif avec de l'eau et le dernier tiers avec l'échantillon biologique.



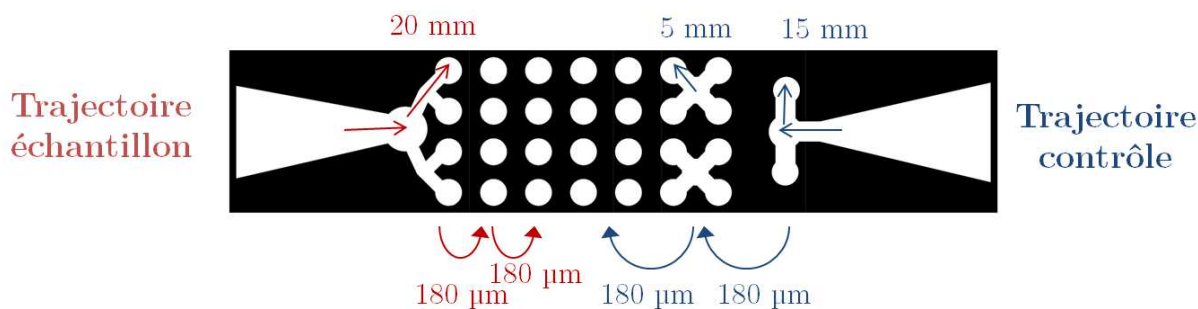
**Figure 6.61** – Transport vers les microzones de fluorescéine séchée dans les puits centraux de la puce matricielle.

Le dépôt de colorants séchés localement dans l'épaisseur de papier intermédiaire, démontre l'indépendance des microzones (figure 6.62). Comme dans les configurations précédentes, la diffusion de composés d'une microzone à l'autre s'effectue sur des temps beaucoup plus longs que ceux nécessaires à l'amplification.



**Figure 6.62** – Démonstration de l'indépendance des microzones de la puce matricielle, par des colorants bleu et rouge.

**Calculs de diffusion** Dans cette géométrie, les distances de parcours (figure 6.63) sont quasiment équivalentes pour les tests échantillons et les contrôles : 20,4 mm. A partir de la vitesse moyenne d'écoulement dans le papier, il faudrait 4,8 min pour réhydrater l'ensemble du dispositif.



**Figure 6.63** – Calcul des distances de parcours de l'écoulement en fonction des dimensions de la puce papier pour chacune des trajectoires contrôle et échantillon.

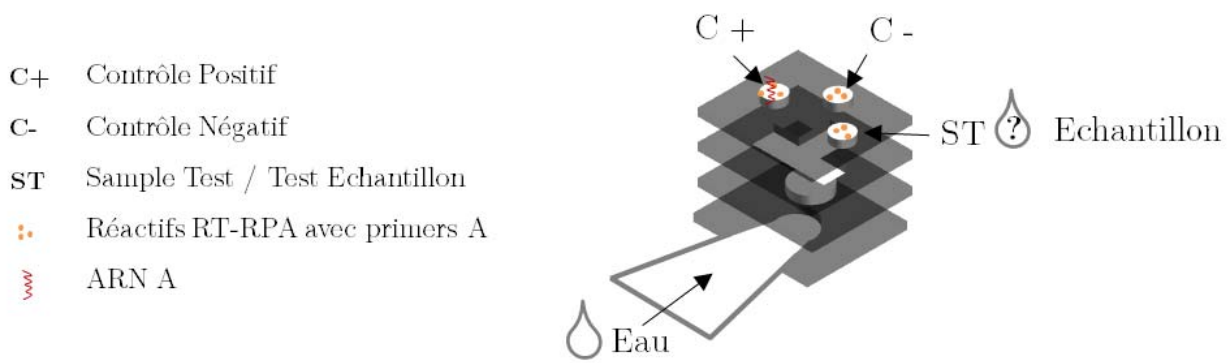
En pratique, les effets d'élargissement sont assez importants, notamment du côté des contrôles : le microcanal de largeur 4 mm à l'extrémité de la bandelette alimente quatre microzones de 5 mm de diamètre, soit 20 mm de largeur cumulée. Pour les contrôles, une bandelette plus large est possible. En revanche, du côté échantillon, afin de limiter les multiples opérations manuelles, il est nécessaire de conserver une zone de dépôt d'échantillon. Ce dernier est alors distribué par l'écoulement vers les microzones. En augmentant le nombre de tests, cet effet d'élargissement est inévitable

## 6.4.2 Résultats biologiques

Les réactifs de la réaction RT-RPA sont lyophilisés dans les microzones des géométries multicouches. Après le régime transitoire de réhydratation, l'amplification à 40 °C est suivie en fluorescence. Les échantillons utilisés sont des brins synthétiques d'ARN Ebola. La démonstration de plusieurs diagnostics simultanés est réalisée avec des primers ciblant des régions disjointes du génome du virus Ebola.

### Géométrie à trois puits

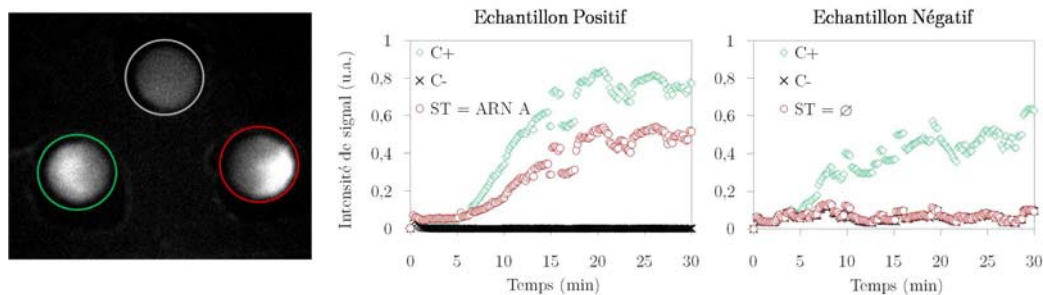
Les trois microzones de cette puce papier doivent réaliser les fonctions de contrôle positif, contrôle négatif et test échantillon. Pour cela, le même mélange réactionnel RT-RPA est lyophilisé et stocké dans chaque microzone. Un ARN cible synthétique est ajouté (5 µL –  $c = 10^7$  copies/µL) dans l'une des microzones, de façon à constituer un contrôle positif. La figure 6.64 présente la localisation des réactifs dans le dispositif papier. Comme dans le cas des colorants, les réactifs sont déposés dans chaque microzone sur la géométrie dépliée. Après lyophilisation, le dispositif peut être replié et conservé jusqu'au moment du diagnostic.



**Figure 6.64** – Position des réactifs dans la puce papier, pour la réalisation parallélisée de trois amplifications RT-RPA.

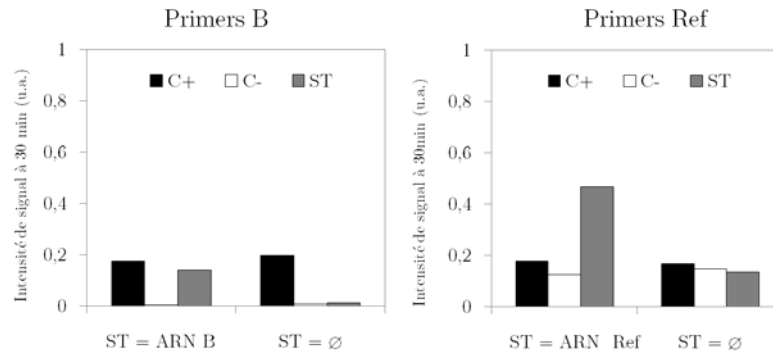
L'utilisation pratique de la puce papier consiste en deux opérations simples : plonger la bandelette dans de l'eau déionisée et déposer une goutte d'échantillon ( $5 \mu\text{L}$ ) dans la microzone de test échantillon. L'écoulement d'eau depuis la bandelette vers les microzones, assure la réhydratation des contrôles positif et négatif. Le dispositif est chauffé à  $40^\circ\text{C}$  et l'imagerie de fluorescence permet la détection de l'amplification.

La figure 6.65 présente les résultats d'amplification obtenus dans la géométrie multicouche à trois puits, à partir des réactifs contenant les primers A. L'échantillon positif contient l'ARN synthétique A alors que l'échantillon négatif n'est constitué que d'eau. Dans tous les cas, les contrôles positifs sont à l'origine d'une augmentation de signal caractéristique de l'amplification alors que le signal émis par le contrôle négatif reste constant. Dans la microzone de test échantillon, la courbe d'amplification dépend de la présence ou non de l'ARN cible.



**Figure 6.65** – Résultats d'amplification RT-RPA avec les primers A dans la géométrie multicouche à trois microzones.

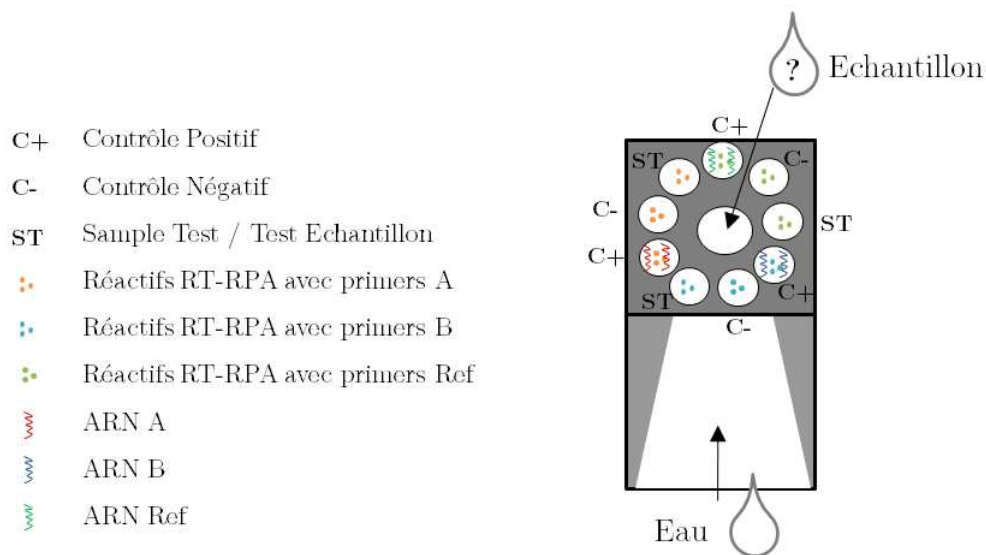
La même expérience d'amplification dans une géométrie papier à trois puits, est réalisée avec les primers B et Ref, en présence ou non des ARN cibles B et Ref. Les résultats d'amplification sont synthétisés en figure 6.66. Chaque primer est responsable d'un signal fluorescent de base et d'un facteur d'amplification de signal différents. Dans tous les cas, la comparaison du signal émis par la microzone de test échantillon avec ceux des contrôles positif et négatif donne l'information diagnostique.



**Figure 6.66** – Résultats d'amplification RT-RPA avec les primers B et Ref dans la géométrie multicouche à trois microzones.

### Géométrie à neuf puits

Avec neuf microzones, le dispositif papier multicouche permet la réalisation de trois diagnostics en parallèle. Comme dans le cas précédent, les réactifs de RT-RPA sont lyophilisés dans chaque microzone de la dernière épaisseur, dans la géométrie dépliée. Les primers A, B et Ref ciblant des régions disjointes du génome Ebola sont utilisés pour chaque lot de trois microzones. Pour chaque primer, une microzone est fonctionnalisée avec l'ARN cible (A, B ou Ref) et constitue le contrôle positif. La figure 6.67 résume le positionnement des réactifs dans la puce papier.



**Figure 6.67** – Position des réactifs dans la puce papier, pour la réalisation parallélisée de neuf amplifications RT-RPA

Le fonctionnement est identique à celui du dispositif à trois puits. Après réhydratation des microzones par les deux bandelettes plongées dans l'eau et le dépôt de l'échantillon dans la zone centrale, le papier est chauffé à 40 °C et observé en fluorescence.

Les résultats d'amplification en présence d'un échantillon contenant l'ARN A sont présentés en figure 6.68. Pour chaque primer, les courbes d'amplification des contrôles positif et négatif sont bien celles attendues : une augmentation de signal de l'ordre de trois fois le niveau initial lorsque l'ARN cible est présent. L'ARN A présent dans l'échantillon déclenche une réaction d'amplification seulement dans la microzone de test échantillon contenant les primers A. En effet, l'émission de fluorescence reste constante dans les microzones de test échantillon contenant les primers B et Ref.

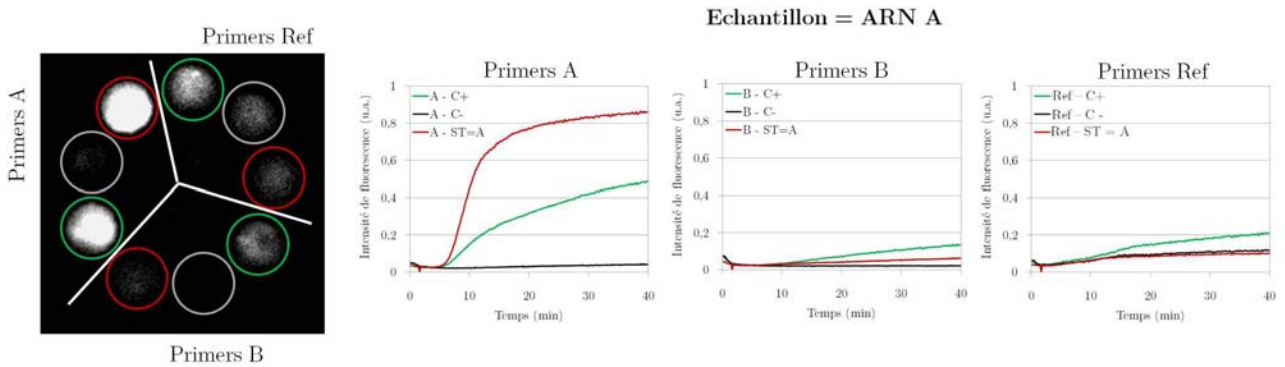


Figure 6.68 – Résultats d'amplification RT-RPA dans chaque microzone du dispositif à neuf puits, avec un échantillon contenant l'ARN A.

La même expérience d'amplification dans une puce papier multicouche à neuf puits est réalisée avec des échantillons contenant les ARN B ou Ref. Les résultats d'amplification sont rassemblés en figure 6.69. Pour une lecture plus facile des données, les signaux de fluorescence sont normalisés pour chaque primer par le niveau de fluorescence du contrôle positif à 30 minutes. Ici encore, la comparaison de l'émission de fluorescence des microzones de test échantillon avec celle des contrôles permet d'identifier la nature de l'échantillon déposé.

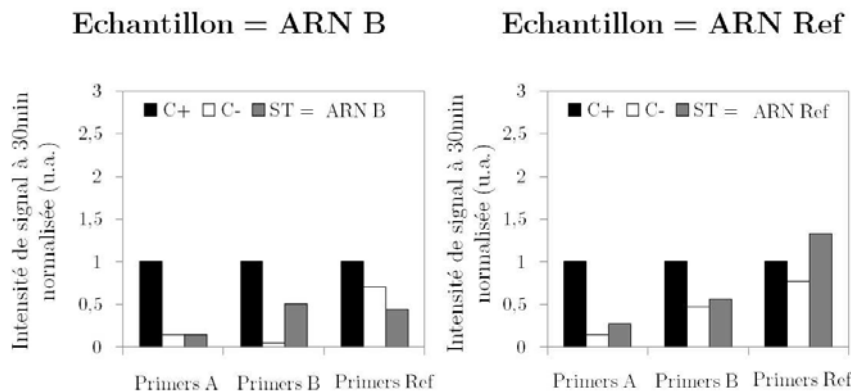


Figure 6.69 – Résultats d'amplification RT-RPA dans chaque microzone du dispositif à neuf puits, avec des échantillons contenant l'ARN B / Ref.

### 6.4.3 Bilan du multiplexage

Pour la géométrie matricielle, aucun résultat biologique n'est présenté car la surface occupée par les douze microzones est trop grande pour le champ de la caméra (2 cm × 2 cm) de l'instrumentation de laboratoire. Cependant le principe de fonctionnement est identique à celui de la géométrie à neuf puits.

Les résultats d'amplification obtenus dans les géométries à trois ou neuf puits démontrent la possibilité de paralléliser les expériences par l'écoulement. La réhydratation simultanée de plusieurs microzones permet la réalisation d'un test de l'échantillon et des contrôles associés. En distribuant l'échantillon vers plusieurs microzones, on obtient plusieurs tests de diagnostic, toujours accompagnés de contrôles.

Expérimentalement, il faut s'assurer du bon contact entre les épaisseurs de papier pour que toutes les microzones soient bien réhydratées. En effet, l'écoulement dans certaines parties de la puce papier provoque le gonflement des fibres de cellulose. Cette expansion du matériau peut déplacer l'épaisseur de papier supérieure et ainsi couper certaines connexions fluidiques.

Les échantillons utilisés sont des brins d'ARN synthétiques de régions disjointes du génome du virus Ebola. Leur détection simultanée peut servir à assurer un suivi des différentes mutations du virus lors d'une épidémie. Selon les performances de diagnostic de chaque primer, cette stratégie peut permettre d'abaisser la limite de détection.

En pratique, en réalisant plusieurs tests de diagnostic en parallèle, l'objectif est de distinguer plusieurs maladies responsables de symptômes similaires. Pour développer cet outil de diagnostic, on s'intéresse à la détection d'autres pathogènes par RT-RPA sur papier.



## 6.5 RT-RPA pour la détection d'autres pathogènes

Contrairement au caractère temporaire des épidémies comme celles du virus Ebola, il existe des infections à plus long terme et généralisées à l'échelle de la population mondiale qui nécessitent aussi des dispositifs de diagnostic rapide. C'est le cas par exemple de la Dengue et d'HIV, pour lesquels l'ampleur de la propagation facilite l'accès aux échantillons de patients. Il n'est donc pas nécessaire de réaliser une étape préliminaire sur ARN synthétique avant de travailler sur ARN viral.

Dans le cas d'HIV, les nombreuses mutations du virus rendent difficile le développement de primers universels ciblant toutes les formes en circulation. Pour la Dengue, la plupart des primers publiés dans la littérature s'hybrident à trois des quatre sérotypes. Pour ces deux pathogènes, un diagnostic multiplexé doit permettre le diagnostic par l'identification simultanée de tous les variants. Le multiplexage pour différencier plusieurs pathogènes reste pertinent.

### 6.5.1 Amplification d'acides nucléiques HIV et Dengue sur papier Whatman

Les mêmes protocoles d'amplification RT-RPA sur papier sont réalisés avec des primers ciblant les ARNs viraux de la Dengue et d'HIV. Dans un premier temps, les réactions préparées en microtubes sont déposées sur papier. Dans un second temps, l'ARN est amplifié sur papier à partir de réactifs lyophilisés.

#### Réaction RT-RPA sur papier

Les expériences sont réalisées sur des microzones papier circulaires, de diamètre 6,6 mm, au format compatible avec l'instrumentation de laboratoire. Comme pour la détection d'Ebola, les écoulements dans le papier Whatman sont confinés par des barrières de cire issues de l'impression par jet d'encre.

**HIV** Les courbes d'amplification RT-RPA sur papier, pour l'ARN HIV, sont présentées en figure 6.70. Pour chaque expérience, les quatre microzones permettent la réalisation simultanée de deux tests négatifs et de deux tests positifs, tous issus de la même préparation du milieu réactionnel.

A titre d'exemple, deux situations sont illustrées. Dans un premier cas, les deux tests positifs présentent bien un signal de fluorescence qui se dégage du bruit de fond défini par la fluorescence des tests négatifs. Le signal caractéristique de l'amplification n'apparaît qu'au bout de 10 minutes de réaction et atteint une intensité de signal plutôt faible : à peine le double du bruit de fond. Lors d'une seconde expérience dans les mêmes conditions, un des tests positifs est responsable d'une augmentation de signal de fluorescence importante, dès la cinquième minute de réaction, alors que le second test positif ne montre aucun signe d'amplification.

Ce problème de reproductibilité a été observé sur une quinzaine d'expériences. Pour des échantillons d'ARN HIV bien détectés en microtubes (concentration de  $10^7$  à  $10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ ), un signal d'amplification par RT-RPA sur papier est observé dans seulement 60% des cas.

Cependant, 93,3% des tests négatifs gardent un signal constant : l'émission d'un signal de fluorescence non spécifique est rarement mesuré.

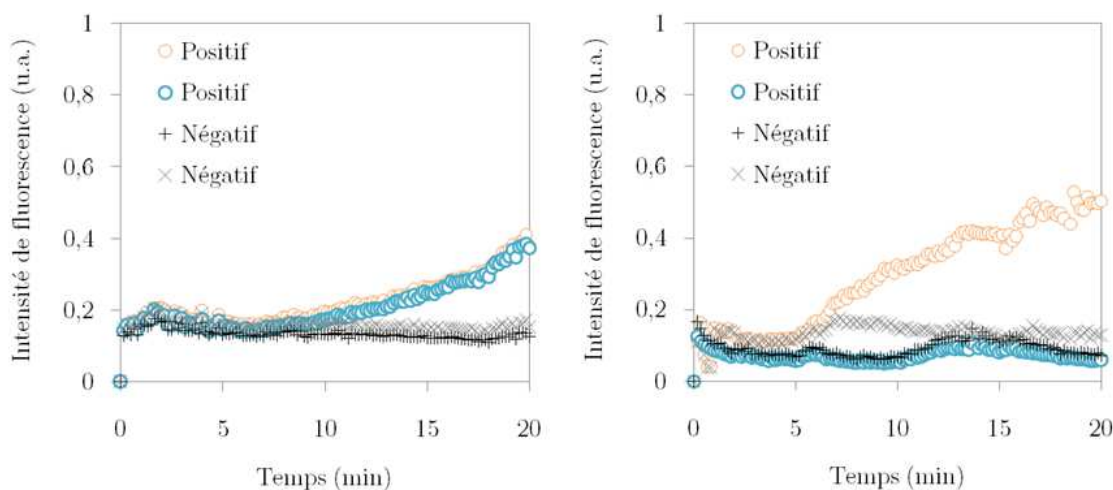


Figure 6.70 – Courbes d'amplification RT-RPA HIV sur papier, réactifs non lyophilisés.

**Dengue** L'amplification d'acides nucléiques de Dengue par RT-RPA sur papier est illustrée en figure 6.71. L'utilisation parallélisée des microzones permet d'apprécier la reproductibilité du diagnostic.

Dans une première expérience, le signal émis par les tests positifs est identique dans les deux microzones, et se dégage clairement du bruit de fond constant des tests négatifs. Dans une seconde expérience, seul un des tests positifs présente un signal d'amplification et la fluorescence d'un des tests négatifs augmente de manière non spécifique à la présence d'ARN cible.

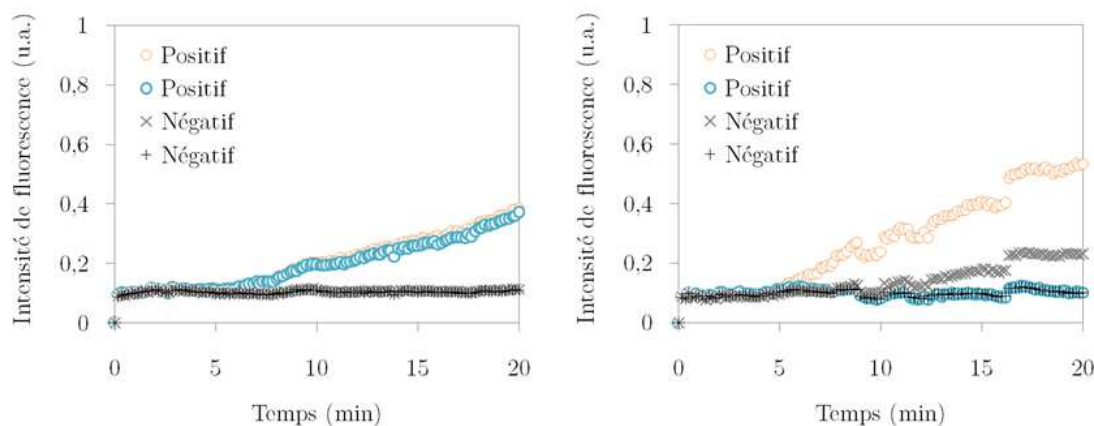


Figure 6.71 – Courbes d'amplification RT-RPA Dengue sur papier, réactifs non lyophilisés.

Sur 101 expériences, une reproductibilité médiocre est obtenue sur papier. La détection d'échantillons positifs, dont la concentration de  $10^6$  à  $10^8$  copies/ $\mu\text{L}$  est bien amplifiée en mi-

crotubes, n'a été correctement mesurée sur papier que dans 49,5% des cas. Les courbes d'amplification montrent peu de signal non spécifique puisque 89,1% des tests négatifs fonctionnent correctement.

### A partir de réactifs lyophilisés

Les mêmes protocoles de lyophilisation des réactifs sont appliqués pour les réactions RT-RPA HIV et Dengue, que pour Ebola. La nomenclature utilisée dans la section 6.3 reste valable : un contrôle négatif correspond à la réhydratation des réactifs par de l'eau ; pour un contrôle positif, l'ARN cible est lyophilisé avec les réactifs ; le test échantillon est la réhydratation du milieu réactionnel par l'échantillon contenant ou non l'ARN cible.

**HIV** Pour le pathogène HIV, les courbes d'amplification sur papier, à partir de réactifs lyophilisés, sont présentées en figure 6.72. Les performances discutables obtenues sur papier ne sont pas améliorées par l'étape de lyophilisation.

Dans un premier exemple, après 20 minutes de réaction, la présence d'ARN cible est faiblement détectée dans le test échantillon et le contrôle positif. En prolongeant la réaction jusqu'à 30 minutes, les tests positifs atteignent des niveaux de fluorescence élevés mais le contrôle négatif est responsable de l'émission d'un signal non spécifique. Une seconde expérience fait apparaître le même comportement pour le contrôle négatif mais, cette fois-ci, les signaux d'amplification du contrôle positif et du test échantillon, ne sont pas suffisants pour se dégager du bruit de fond.

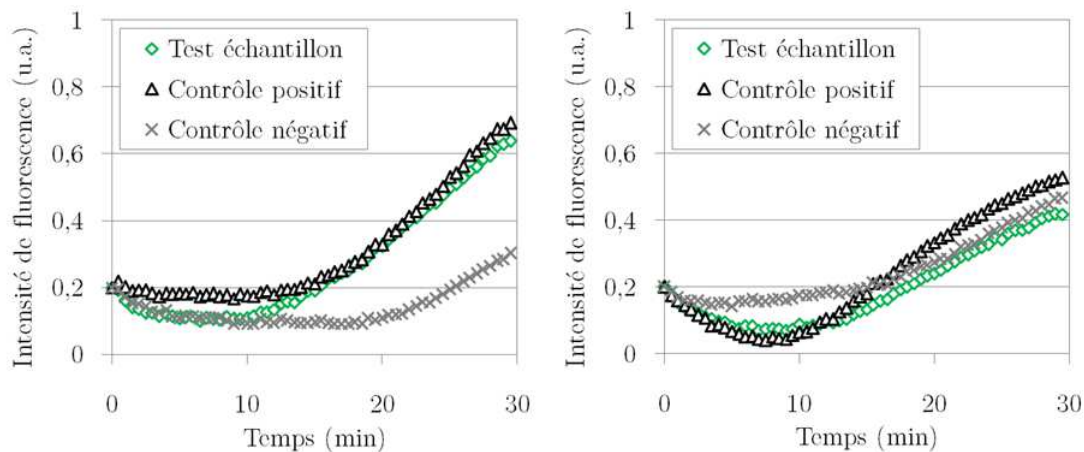
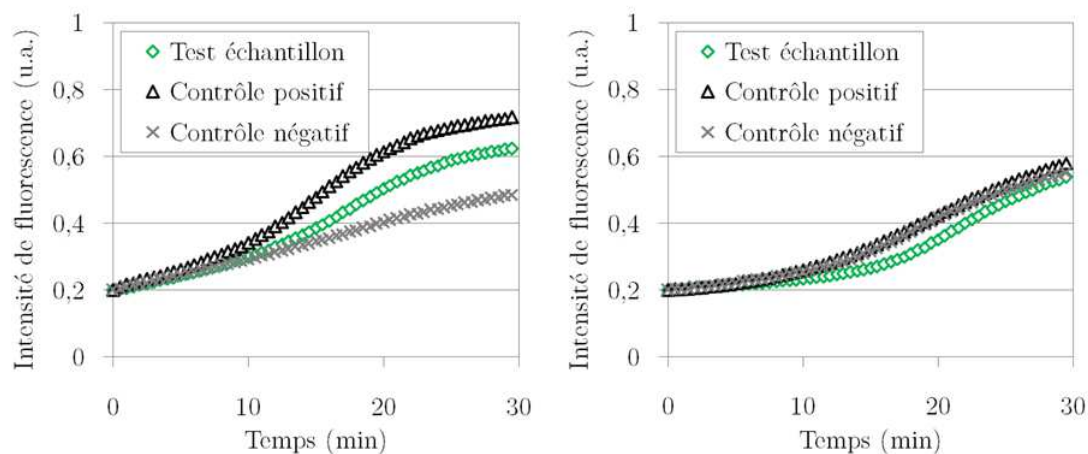


Figure 6.72 – Courbes d'amplification RT-RPA HIV sur papier, réactifs lyophilisés.

Comme dans la configuration des réactifs non lyophilisés, la reproductibilité a été étudiée sur 38 expériences. Seules 44,7% des expériences permettent la détection d'échantillons positifs et 76,4% des contrôles négatifs n'émettent pas de signal d'amplification non spécifique.

**Dengue** Avec l'ARN cible de la Dengue, la réaction RT-RPA lyophilisée sur papier ne permet pas un diagnostic fiable. Les courbes d'amplification sont présentées en figure 6.73.

Dans les deux expériences, le signal de fluorescence du contrôle négatif augmente presque linéairement au cours du temps. Les tests positifs (échantillon et contrôle) peuvent, dans certains cas, après 10 minutes, présenter une augmentation d'intensité de fluorescence caractéristique de l'amplification.



**Figure 6.73** – Courbes d'amplification RT-RPA Dengue sur papier, réactifs lyophilisés.

Sur 43 expériences réalisées, les échantillons positifs sont détectés dans seulement 49,5% des cas et seuls 55,8% des contrôles négatifs restent à des intensités de fluorescence faibles (proches de 0,2 u.a.). Ces statistiques sont proches d'une situation aléatoire et donc sans intérêt diagnostique !

### Bilan des expériences sur papier Whatman

Un tableau récapitulatif des expériences de RT-RPA réalisées sur papier Whatman pour chacun des pathogènes permet de comparer les performances obtenues à partir de réactifs lyophilisés ou non (figure 6.74).

Dans le cas du virus Ebola, les échantillons d'ARN synthétiques de petite taille, aux concentrations de  $10^5$  à  $10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ , sont bien détectés par réaction RT-RPA en microtubes et sur papier. La comparaison avec la RT-qPCR n'a pas été réalisée. Après lyophilisation des réactifs sur papier, l'échantillon le plus dilué est à la limite de détection.

Les résultats obtenus en Guinée, à partir des contrôles positifs et négatifs, sur 68 puces papier stockées pendant un mois, donnent de bonnes performances de diagnostic avec une sensibilité à 82,3% et une spécificité à 83,8% pour l'ARN synthétique. Les échantillons cliniques constitués d'extractions d'ARNs viraux, sont mesurés par RT-qPCR en microtube et par RT-RPA lyophilisée sur papier. Dans ces conditions, la sensibilité est estimée à 85,3% et la spécificité à 58,8% sur ARN viral.

Pour le pathogène HIV, les échantillons d'ARN viral, aux concentrations de  $10^7$  à  $10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ , sont détectés par RT-qPCR aux cycles 15 à 21. Leur détection par RT-RPA en microtubes est

Echantillon			En microtubes		RT-RPA sur papier		
Pathogène	ARN	Concentration (copies/ $\mu$ L)	RT-qPCR	RT-RPA	Frais	Lyophilisé	
Ebola	Synthétique	$10^9$	-	+	+	56 / 68	82,3 %
		$10^7$	-	+	+	+	
		$10^5$	-	+	+	Non reproductible	
		Négatif	-	+	+	57 / 68	83,8 %
	Viral	-	[16-21]	-	-	16 / 18	85,3 %
		-	[22-27]	-	-	4 / 6	
		-	[28-34]	-	-	9 / 10	
		-	Négatif	-	-	20 / 34	58,8 %
HIV	Viral	$10^9$	15	+	60 %	44,7 %	
		$10^8$	18	+			
		$10^7$	21	+			
		Négatif	-	+	93,3 %	76,4 %	
Dengue	Viral	$10^8$	18	+	50 %	44,1 %	
		$10^7$	21	+			
		$10^6$	27	+			
		Négatif	-	+	89,1 %	55,8 %	

**Figure 6.74** – Tableau récapitulatif des résultats d'amplification de différents pathogènes.

fiable mais, sur papier, les performances de diagnostic chutent. Sans lyophilisation, la sensibilité est de 60%, la spécificité atteint 93,3% ; après lyophilisation, la sensibilité tombe à 44,7% et la spécificité 76,4%.

La détection des ARN de Dengue est similaire à celle d'HIV. Les échantillons concentrés de  $10^6$  à  $10^8$  copies/ $\mu$ L, détectés en cycles 18 à 27 par RT-qPCR, sont amplifiés par RT-RPA en microtubes. Sur papier, la sensibilité à 50% reste médiocre alors que la spécificité à 89,1% est satisfaisante. Après lyophilisation, les performances de sensibilité et spécificité plafonnent respectivement à 44,1% et 55,8%.

D'un point de vue génomique, nous avons comparé le pourcentage de bases G-C qui, par leurs trois liaisons hydrogène, peuvent être plus difficiles à désolidariser que les bases A-T à deux liaisons d'hydrogène. Ce paramètre est légèrement plus faible (41,2%) pour le virus Ebola que pour HIV (42,5%) et la Dengue (46,6%). Cette différence ne semble pas suffisante pour détériorer à ce point les résultats d'amplification. Au contraire, les petits génomes des pathogènes HIV (9,2 kb) et Dengue (10,7 kb), par rapport à Ebola (18,9 kb), devraient être plus favorables à l'amplification.

### 6.5.2 Influence de l'environnement imposé par le papier

En l'absence d'autres arguments biologiques expliquant la non-reproductibilité des expériences sur papier pour la détection d'HIV et de Dengue, nous avons cherché à modifier l'environnement biochimique imposé par le papier. Pour cela, les mêmes expériences d'amplification RT-RPA ont été réalisées, avec ou sans lyophilisation des réactifs, sur différents supports papier.

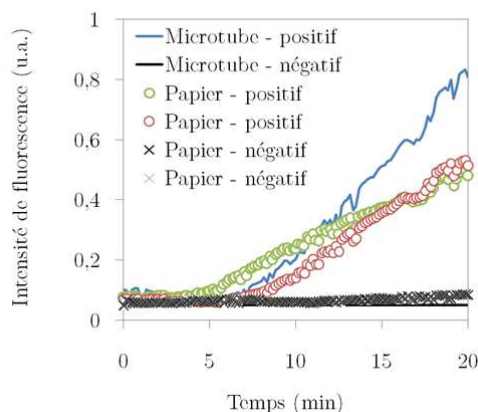
#### Papier Whatman transformé

Contrairement aux microtubes stériles et certifiés sans ribonucléase (enzyme qui catalyse la dégradation d'ARN), le papier chromatographie Whatman est vendu en lots de 200 feuilles de 20 cm × 20 cm, sans conditionnement particulier pour les applications biologiques.

Dans la technologie d'impression de cire, le chauffage à 150 ° assure une étape de dégradation thermique de tout matériel biologique présent dans le papier. Mais les éventuels résidus issus de la fabrication du papier ne sont pas évacués.

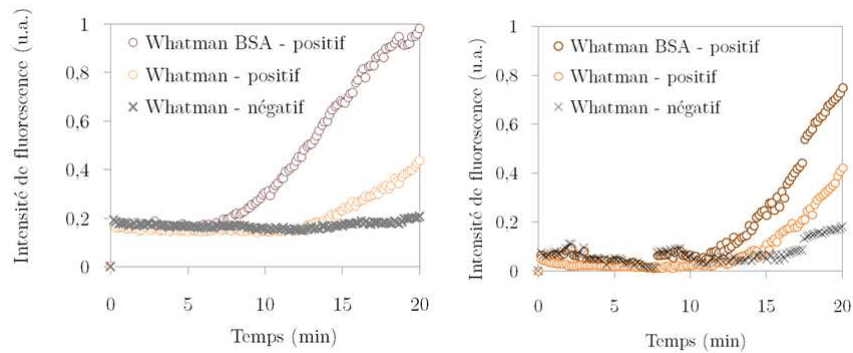
Un procédé simple de lavage est développé pour tenter de rendre le papier plus propre. Pour cela, la puce papier est positionnée sur plusieurs épaisseurs de papier absorbant. Cinq ajouts de 20 µL d'eau stérile sont pipetés successivement dans chaque microzone. La pompe capillaire des papiers absorbants extrait l'eau des microzones, évacuant ainsi d'éventuels résidus dissous dans l'eau.

Dans ces conditions, les courbes d'amplification RT-RPA pour la Dengue sur papier, obtenues à partir de réactifs non lyophilisés, montrent une meilleure reproductibilité avec le microtube (figure 6.75) et d'une expérience à l'autre. En effet, sur 30 expériences, l'ARN de Dengue est amplifié et détecté dans 73,3% des cas et les contrôles négatifs restent à un niveau de bruit de fond dans 96,7% des tests.



**Figure 6.75** – Courbes d'amplification d'ARN Dengue en microtube et sur papier Whatman lavé.

La BSA est une protéine utilisée comme traitement de surface pour limiter l'adsorption non spécifique. L'amplification d'ARN de Dengue par RT-RPA est caractérisée en présence de cette fonctionnalisation chimique (figure 6.76). Les expériences sur papier ne donnent pas une très grande reproductibilité ni en temps de détection, ni en intensité de signal. Pourtant, les performances de diagnostic sont meilleures que sans BSA : 68% de sensibilité et 92% de spécificité sur 25 expériences.



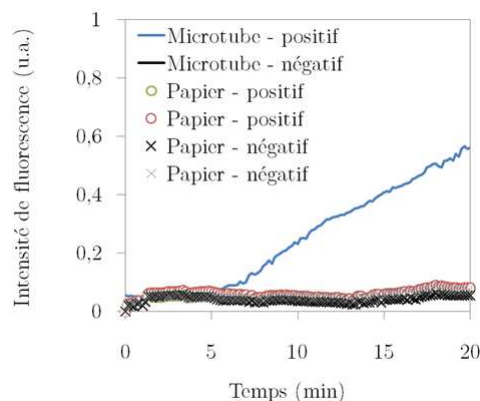
**Figure 6.76** – Courbes d’amplification d’ARN Dengue sur papier Whatman avec traitement de surface BSA.

Ces modifications de papier Whatman ne conservent pas de performances satisfaisantes de diagnostic lors d’expériences d’amplification avec des réactifs lyophilisés.

### Supports non cellulósiques

Pour pallier le manque de contrôle bio-chimique du papier Whatman, deux autres supports papier sont envisagés : un milieu en fibres de verre et un papier filtre en matériau polymère.

**Fibres de verre** L’amplification d’ARN de Dengue par RT-RPA sur papier en fibres de verre est présentée en figure 6.77. Alors que la réaction en microtubes donne une détection claire des échantillons positifs et négatifs, le signal de fluorescence reste constant pour toutes les réactions sur papier.

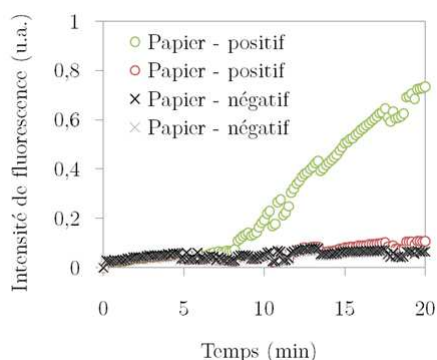


**Figure 6.77** – Courbes d’amplification d’ARN Dengue en microtubes et sur papier en fibres de verre.

Contrairement aux fibres de cellulose, les fibres de verre n’absorbent pas le liquide et limitent l’adsorption non spécifique des ARN, facilitant ainsi leur disponibilité pour la réaction. Le matériau est aussi censé être plus inerte chimiquement. Expérimentalement, aucune amplification n’est observée dans ce support.

**Membrane PES** Décrit dans la littérature [155, 158] comme le matériau le plus compatible avec les techniques d'amplification d'acides nucléiques, les membranes PES sont des milieux poreux polymères dont la taille de pores est bien contrôlée. Vendus sous emballages individuels stériles, le fournisseur annonce un état de surface qui minimise l'adsorption.

L'amplification RT-RPA d'acides nucléiques de Dengue est réalisée sur membrane PES. Les courbes d'amplification présentées en figure 6.78 montrent une intensité de signal et un temps de détection très satisfaisants mais une seule des microzones contenant l'ARN cible fonctionne. Sur une vingtaine d'expériences, une sensibilité de 73,3% est atteinte, ainsi qu'une spécificité de 89,5%.



**Figure 6.78** – Courbes d'amplification d'ARN Dengue sur membrane PES.

La lyophilisation des réactifs sur membrane PES est responsable d'une dégradation importante des performances de diagnostic. Sur 17 expériences, la sensibilité chute à 41,1% et la spécificité à 76,5%.

Les expériences d'amplification d'acides nucléiques pour les pathogènes HIV et Dengue ont montré les limites de la technologie papier. Le manque de contrôle de l'environnement biochimique est responsable d'une non-reproductibilité des résultats, ce qui est rédhibitoire pour les contraintes draconiennes d'une application de diagnostic médical. Une meilleure compréhension des mécanismes régissant les interactions entre le support papier et la réaction d'amplification est indispensable pour généraliser cette technologie à un grand nombre de cibles biologiques.



## 6.6 Ce qu'il faut retenir

**Du microtube au papier** Le transfert de la biologie moléculaire depuis l'environnement bien contrôlé du laboratoire jusqu'aux dispositifs papier pour le terrain nécessite plusieurs étapes clés, décrites en figure 6.79.

A partir d'une réaction bien optimisée en microtubes, la biocompatibilité de chaque matériau des puces papier est vérifiée. La même réaction d'amplification peut alors être réalisée sur papier. Si les expériences sur papier démontrent de bonnes performances de diagnostic, par rapport à celles obtenues en microtubes, des stratégies de lyophilisation des réactifs dans le papier sont envisagées. Ce sont alors les fonctions de conservation et de réhydratation qui sont étudiées. A partir de ce papier prêt à l'emploi, la modification de la géométrie des écoulements donne accès au multiplexage par la parallélisation des réactions.

Un dispositif complet de diagnostic doit fonctionner de façon autonome, de l'échantillon au résultat (sample-to-result devices). Pour cela, la préparation d'échantillons reste une étape cruciale à intégrer dans la puce papier. Une détection colorimétrique et une réaction d'amplification à température ambiante permettraient un diagnostic sans équipement extérieur.



**Figure 6.79** – Etapes de développement pour l'amplification d'acides nucléiques sur papier.

**LAMP** Les réactions d'amplification LAMP sur papier ont mis en avant des problèmes de biocompatibilité avec la cire. Sa composition chimique est inerte à l'ambiante, mais le fonctionnement de la LAMP à 65 °C approche sa température de fusion.

L'amplification d'acides nucléiques ne peut être appréciée sans l'étape suivante de détection. Des interactions non spécifiques entre le support papier et l'intercalant d'ADN ont compliqué le suivi de la réaction biologique. Le caractère bio-compatible du papier Whatman ne peut donc pas être pris comme une affirmation universelle.

De petits volumes dans le papier, à 65 °C, sont également largement soumis à l'évaporation, qui fractionne en gouttelettes le milieu réactionnel. Contrairement à différents exemples dans la littérature, nous n'avons pas réussi à réaliser une amplification LAMP sur papier satisfaisante.

**RT-RPA** Le fonctionnement à 40 °C de la réaction RT-RPA limite les problèmes d'évaporation ainsi que les effets inhibiteurs de la cire. Les expériences préliminaires en microtubes ne montrent aucun problème de bio-compatibilité pour chacun des matériaux utilisés pour la fabrication des puces papier.

L'amplification d'acides nucléiques par RT-RPA a ainsi pu être démontrée à partir de réactifs lyophilisés dans le papier. L'optimisation en laboratoire, sur ARN synthétique Ebola, a permis

de trouver les meilleures conditions de taille de microzones papier et de réhydratation des réactifs. Des contrôles internes sont intégrés dans chaque puce papier.

Les performances de diagnostic sur systèmes modèles ont pu être comparées à celles obtenues à partir d'échantillons cliniques en Guinée. Les expériences préparées pour ce voyage ont démontré la robustesse des dispositifs papier qui, préparés un mois à l'avance, ont atteint une sensibilité de 85.3% sur ARN viral. Les six échantillons cliniques nécessitant plus de 30 cycles PCR pour leur détection, ont bien été détectés par nos expériences de RT-RPA sur papier. Une instrumentation transportable a également été développée pour permettre les expériences hors du laboratoire.

Le format de microzones individuelles est dépassé pour exploiter la pompe capillaire naturelle du papier. L'écoulement d'eau au sein de dispositifs multicouches assure la réhydratation simultanée de plusieurs milieux réactionnels, notamment pour l'automatisation d'un test échantillon associé à deux contrôles internes. La parallélisation des expériences est étendue jusqu'à neuf puits permettant trois diagnostics multiplexés, par RT-RPA sur papier.

La généralisation de l'amplification RT-RPA sur papier à d'autres pathogènes a mis en lumière des problèmes de non-reproductibilité des expériences. Une amélioration importante des résultats a été permise en utilisant un papier Whatman lavé ou une membrane PES stérile, mais ces performances ne sont pas conservées après lyophilisation des réactifs.

La combinaison des différentes expériences permet d'envisager un dispositif papier idéal pour le diagnostic parallélisé de plusieurs pathogènes : une structure hybride faite de plusieurs matériaux papier devrait permettre de bénéficier des propriétés d'écoulement de la cellulose et d'un environnement biochimique contrôlé pour les milieux réactionnels.



---

## Conclusions et Perspectives

---

**Contributions et perspectives du projet de recherche** Dans cette thèse, le papier a été étudié d'un point de vue académique, avec l'étude de la distribution spatiale d'échantillons dans le papier et l'analyse des interfaces papier-microsystèmes. Il a aussi été utilisé comme support d'innovations proches de l'application de diagnostic médical avec un immunoessai et de la biologie moléculaire sur papier.

L'impression de barrières de cire dans le papier confine spatialement les écoulements capillaires. La diffusion de la cire y assure un contraste hydrophile-hydrophobe dans une épaisseur partielle ou totale du milieu poreux. Ce paramètre permet la distinction des écoulements d'imbibition capillaire en volume et d'étalement de goutte en surface du papier.

Si des modèles comme la loi de Lucas-Washburn décrivent bien macroscopiquement l'avancée d'un front liquide dans le papier, une meilleure description des écoulements serait une contribution importante dans la microfluidique papier. Des techniques de PIV dans un papier artificiel transparent donneraient des informations préliminaires sur les profils de vitesses dans la microfluidique papier.

La focalisation spatiale d'échantillons dans le papier est rendue possible par la combinaison de l'évaporation, de la pompe capillaire, de la géométrie des écoulements et des interactions chromatographiques. Dans ces conditions, la dispersion spatiale et le volume mort du papier sont dépassés pour atteindre des limites de détection proches des sensibilités de laboratoire. L'étude sur la fluorescéine donne un facteur d'amplification de 1000.

Pourtant, l'application de ces procédés à une réaction biologique, comme un immunoessai pour la détection d'un marqueur cardiaque, n'a pas permis d'atteindre une sensibilité record inférieure à 1 ng/mL. La focalisation hydrodynamique peut rester pertinente dans le cas d'étapes de préparation d'échantillons et de détection afin de limiter les pertes.

Les dispositifs hybrides associant papier et microsystèmes permettent l'élution de composés séchés dans le papier. Les performances d'élution ont été caractérisées avec différentes familles de composés et dans plusieurs géométries microfluidiques. Ces interfaces papier-microsystèmes doivent permettre l'analyse automatisée d'échantillons séchés dans le papier par des réactifs

stockés dans le même format. Toutes les opérations d'analyse seraient alors déclencher par un simple écoulement d'eau, éventuellement compléter d'huile pour une mise en goutte.

D'un point de vue biologique, l'éluion d'acides nucléiques apporterait une contribution pour le diagnostic néonatal des maladies génétiques. Maximiser les résultats obtenus à partir d'un prélèvement de sang séché, sans le dégrader dans son intégralité, devrait permettre l'analyse efficace de précieuses banques d'échantillons biologiques.

Le papier apparaît également comme un support de stockage de petits volumes d'échantillons. Par exemple, la mouche tsétsé véhicule, par sa salive, des infections parasitaires comme la maladie du sommeil via le tripanosome. Le recueil des quelques microlitres de salive sur le papier, permettrait une éluion en microsystèmes et la détection des formes infectieuses du parasite.

La biologie moléculaire sur papier n'est apparue que très récemment dans la littérature. Nos contributions à la parallélisation des expériences et sur la détection d'un virus d'intérêt, dans des échantillons cliniques, incluant des contrôles internes, se placent parmi les développements pionniers du domaine. Pourtant une meilleure compréhension des interactions papier-réactions d'amplification est indispensable afin d'atteindre une généralisation à de nombreux pathogènes.

Dans la perspective d'un diagnostic complet sur papier, il faut inclure la préparation d'échantillons dans les procédures sur papier. Une simplification de cette étape peut consister à travailler sur un matériel génétique libre, disponible en quantité et ne nécessitant pas de lyse cellulaire. Pour cela, la détection d'une mutation génétique comme la drépanocytose, largement répandue sur le continent africain, serait une première cible commerciale viable. Cette application est également pertinente dans le cas du diagnostic néonatal des maladies génétiques.

**Opinions sur la microfluidique papier** Le papier apparaît comme un support idéal des applications diagnostiques. Il présente les avantages de pompe capillaire autonome, de stockage des réactifs et d'incinération des dispositifs souillés, tout en restant d'un coût très faible.

Les considérations financières sont à modérer par le coût intrinsèque des réactifs. Dans l'exemple de la RT-RPA, un kit de 96 réactions est vendu 411€ par le fournisseur, soit plus de 4€ par réaction. Dans nos expériences, un quart du volume réactionnel standard est utilisé sur chaque microzone. Un test échantillon associé à deux contrôles coûte alors 3,2€ en réactifs, auxquels il faut ajouter 0,18€ dans le cas de microtubes ou 0,006€ pour le support papier. Cette différence est significative mais peut être atténuée par les techniques d'industrialisation des procédés et reste minime au regard du prix des réactifs.

Le papier comme plateforme bioactive bénéficie de nombreuses propriétés qui peuvent être mises à profit pour les différentes phases du diagnostic. L'état de surface global ou localement modifié définit l'adsorption non spécifique, la capture biochimique des analytes en solution, la rétention chromatographique. La structure poreuse impose une filtration qui sépare les composés par critère stérique. L'écoulement assure une fonction d'automatisation des différentes fonctions prévues par la géométrie et évite les multiples opérations manuelles, notamment celles de pipetages. La grande variété des supports papier disponibles forme un catalogue de fonctions biochimiques qui permettent de s'adapter à chaque configuration. Mais cette diversité nécessite d'être ordonnée suivant des critères rationnels de sélection.

Malgré les nombreuses innovations de la microfluidique papier en laboratoire, pourquoi aucune application n'atteint le développement d'un produit commercial disponible sur le marché actuellement ? Les raisons expliquant cette barrière sont, entre autres, les contraintes strictes imposées par le secteur du diagnostic médical et l'accès difficile et règlementé aux échantillons cliniques nécessaires à la validation d'un test. Une entreprise a besoin de compétences variées et d'importants moyens financiers pour supporter les procédures longues précédant une mise sur le marché de produits générant peu de bénéfices et profits.

L'identification même du marché cible n'est pas évidente. La microfluidique papier a été développée dans un esprit philanthropique pour répondre à des inégalités d'accès au diagnostic médical. Inscrire cette innovation dans un modèle économique capitaliste standard risquerait d'écarter les populations les plus démunies des bénéficiaires/clients. Les structures de l'économie sociale et solidaire, les fondations ou les organismes à but non lucratif offrent des alternatives intéressantes comme le propose G.M. Whitesides avec *Diagnostics for All*. Dans le futur, il serait intéressant d'accompagner les développements scientifiques et technologiques de la microfluidique papier, d'innovations économiques pour allier démarche entrepreneuriale pérenne et bénéfice sociétal.



---

## Evaluation des tests diagnostiques

---

Un nombre grandissant d'équipes de recherche travaillent sur des dispositifs de diagnostics médicaux, notamment dans le domaine de la microfluidique papier. Pourtant, peu de résultats de leurs travaux aboutissent à une exploitation commerciale accessible au personnel médical ou au grand public [165]. Pour qu'une innovation ait toutes ses chances de sortir du laboratoire, les chercheurs doivent dès le début avoir en tête les contraintes et critères de validation future [166]. Pour des questions de santé publique et de coût, le diagnostic doit avoir un intérêt : par exemple, le fait que la connaissance de la maladie en limite la transmission (épidémies, transmissions verticales mère-enfant, ...). Si un traitement existe, il faut qu'il soit accessible aux patients. Cette annexe rassemble les principaux éléments du cours "*Evaluation des Tests Diagnostiques*" de l'Institut Pasteur, par Muriel Vray, suivi du 7 au 11 mars 2016.

### A.1 Phases de développement d'un test diagnostique

Le diagnostic se distingue du dépistage car il s'adresse à un individu particulier présentant des symptômes et dont l'objectif est de limiter les complications. Le dépistage se positionne dans une phase pré-clinique sur une large population sans symptômes. Le besoin en dépistage dépend du risque d'exposition ou de la prévalence de la maladie suivant certains critères (âge, sexe, situation géographique, comportements à risque ...) Un dispositif de diagnostic est d'abord testé en laboratoire avant d'être appliqué à des situations modèles. La dernière étape permet d'évaluer les performances prospectives du test, en situation de dépistage.

#### A.1.1 Preuve de Concept

Cette phase exploratoire est réalisée dans les conditions de laboratoire. L'objectif est de vérifier que la cible du diagnostic est bien différente dans les cas malades/non-malades et d'identifier les mécanismes d'action.

Un grand nombre d'analyses doivent être réalisées pour documenter au mieux le test : protocole d'utilisation détaillé, résistance et influence aux conditions extérieures (température,



humidité, ...), conditions de recueil et préparation de l'échantillon biologique, ... Les échantillons analysés doivent représenter les différents niveaux de sévérité de la maladie, y compris les non-malades présentant une pathologie proche (types de symptômes ou d'agents infectieux).

La reproductibilité du test diagnostique peut être approchée suivant plusieurs angles :

- la variabilité biologique (mesures sur un même sujet à deux moments différents),
- la variabilité selon l'opérateur sur un même prélèvement,
- la reproductibilité de la mesure (plusieurs mesures sur un même échantillon),
- la variabilité entre le test et une mesure de référence.

Les performances des tests qualitatifs peuvent être caractérisées par le coefficient Kappa qui quantifie la proportion d'accords entre deux groupes de résultats normalisée par la probabilité d'accords aléatoires.. La concordance pour des mesures quantitatives s'apprécie par le diagramme de Bland et Altman ou le coefficient de corrélation intra-classe.

### A.1.2 Etude de cas-témoins

Cette seconde phase de validation est réalisée hors du laboratoire par le personnel auquel est destiné le test, sur des patients dont on connaît déjà le statut malade/non-malade. C'est un positionnement rétrospectif par rapport à un test de référence qui permet d'estimer la probabilité d'avoir un résultat positif chez les malades et un résultat négatif chez les non-malades.

L'objectif est donc d'utiliser le test dans des situations réelles par des opérateurs différents et avec une plus grande diversité de patients. Les modalités de cette étude doivent répondre aux critères de la grille STARD (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy).

Parmi les points les plus importants figurent :

- critères d'inclusion/d'exclusion de l'étude,
- choix du test de référence,
- tous les patients doivent recevoir les deux tests sans ordre préférentiel systématique (la cible de l'étude et la référence),
- les opérateurs effectuent ces tests à l'aveugle, sans duplicats.

### A.1.3 Application à une cohorte

Cette dernière étape se place dans les mêmes conditions que l'étude de cas-témoins mais de manière prospective : on ne connaît pas le statut malade/non-malade des patients. Ce dépistage s'effectue sur une large population (cohorte) dite à risques soit suite à une exposition (contexte infectieux), soit par des critères les rendant plus susceptibles de développer la pathologie (âge, sexe, prédisposition, ...).

A cause du grand nombre de patients et pour des raisons éthiques, il n'est souvent pas possible de réaliser systématiquement le test de référence en plus du nouveau test. Notamment, si le test de référence est invasif ou présente des risques, il n'est pas approprié de le réaliser chez des patients n'ayant aucun symptôme. Pour les besoins de l'étude, une solution statistique consiste à le réaliser seulement sur un sous-ensemble aléatoire.

## A.2 Définition des indices de performances

Dans chacune des phases de validation, le test peut être évalué par des indices de performances. Ceux-ci rendent compte de l'accord entre le résultat du test et le statut malade/non-malade.

### A.2.1 Sensibilité, spécificité

Dans le cas de valeurs qualitatives binaires, on utilise un tableau de contingence 2x2 présenté en figure A.1. Ce tableau permet de comparer le résultat donné par le test de diagnostic avec le statut du patient. Il résume également le nombre d'échantillons de l'étude ainsi que la prévalence de la maladie (nombre de sujets malades par rapport au nombre de sujets sains).

Statut \ Résultat	Statut		
	Malade	Non-Malade	
Test Positif	Vrai Positif	Faux Positif	Nombre de tests positifs
Test Négatif	Faux Négatif	Vrai Négatif	Nombre de tests négatifs
	Nombre de sujets malades	Nombre de sujets non-malades	Nombre total de sujets

Figure A.1 – Tableau de contingence 2x2

Les "vrais positifs" et "vrais négatifs" définissent les cas d'accord entre le statut du patient et le résultat du test. Les "faux négatifs" et "faux positifs" décrivent la situation contraire.

La sensibilité du test est définie par la probabilité d'obtenir un test positif quand le sujet est malade (équation A.1). La spécificité est l'aptitude du test à identifier correctement les sujets non malades (équation A.2). On peut également définir l'efficacité du test comme le nombre de sujet bien classés (équation A.3).

$$Se = \frac{Vrai\ Positif}{Nombre\ de\ sujets\ Malades} \quad (A.1)$$

$$Sp = \frac{Vrai\ Négatif}{Nombre\ de\ sujets\ Non - Malades} \quad (A.2)$$

$$e = \frac{Vrai\ Positif + Vrai\ Négatif}{Nombre\ total\ de\ sujets} \quad (A.3)$$

Mais la construction même du tableau de contingence dépend du seuil qui classe les résultats du test. Dans le cas de valeurs quantitatives, ce seuil est une valeur définie arbitrairement. En modifiant cette valeur, on change les performances du test, notamment sensibilité et spécificité.

Selon le contexte, l'un des deux peut être privilégié. Dans le cas d'une maladie contagieuse, il est essentiel d'identifier toutes les personnes malades ce qui correspond à une grande sensibilité et un petit nombre de Faux Négatifs. Au contraire, si un diagnostic positif donne lieu à des conséquences lourdes, il faut que tous les résultats positifs correspondent vraiment à des sujets malades. C'est alors la spécificité qui est privilégiée et implique un nombre minimal de Faux Positifs.

Puisqu'elles dépendent du seuil, les valeurs de sensibilité et de spécificité ne sont donc pas les plus appropriées pour caractériser complètement un outil de diagnostic.

### A.2.2 Courbe ROC

Une courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) est une représentation graphique des performances d'un test diagnostique, indépendamment de la valeur du seuil. La courbe représente l'évolution de (1-Spécificité) en fonction de la Sensibilité pour chaque valeur de seuil (figure A.2).

Les cas limites sont :

- la diagonale - qui passe par les points  $[0;0]$  et  $[1;1]$ . Elle correspond à une situation purement aléatoire et donc sans intérêt diagnostique.
- une courbe au plus proche de l'axe des ordonnées et de la ligne horizontale  $y=1$ . C'est le meilleur outil de diagnostic avec une sensibilité et une spécificité toujours égales à 1.

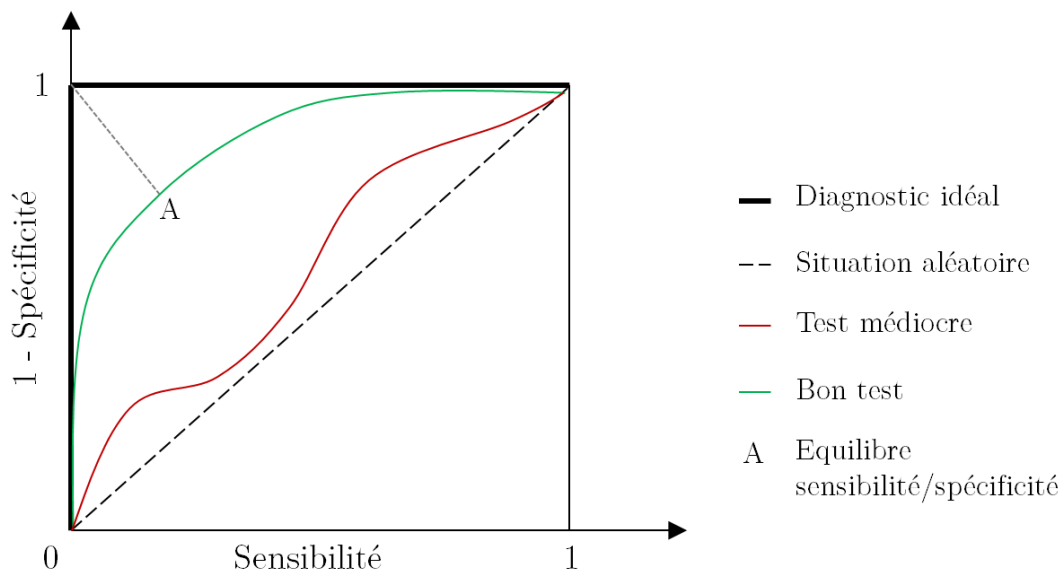


Figure A.2 – Courbe ROC

Dans la réalité, les outils de diagnostic sont donc entre ces deux cas limites. La comparaison de plusieurs courbes est possible par appréciation visuelle et/ou par le calcul de l'aire sous la courbe ( $AUC = \text{Area Under Curve}$ ). Selon les cas limites, ce paramètre AUC vaut 1 pour un test idéal et 0,5 dans le cas aléatoire.

Cet outil graphique permet également la sélection du meilleur seuil selon le contexte. Il

peut s'agir d'un seuil maximisant la spécificité ou la sensibilité. Une situation d'équilibre peut également être choisie et correspond à une maximisation du nombre de sujets bien classés. Graphiquement, c'est le point minimisant la distance de la courbe ROC au point  $[0;1]$ .

## A.3 Discussion des biais

Le statut malade/non-malade est souvent indiscutable dans les situations de preuve de concept et d'étude de cas-témoin. Mais les patients d'une cohorte sont dans une zone grise de diagnostic. Il faut donc être très attentif aux biais statistiques générés par la construction même de l'étude. De plus, il n'existe pas toujours de Gold Standard auquel se référer.

### A.3.1 Construction de l'étude

La grille STARD ([www.stard-statement.org](http://www.stard-statement.org) [167]) rassemble l'ensemble des critères essentiels pour la validation d'un test diagnostique.

Elle inclut la description de la méthode :

- étude prospective ou rétrospective,
- nombre de patients et critères d'inclusions,
- choix du test de référence,
- caractéristiques du test analysé,
- méthodes d'analyses des résultats.

Il existe de nombreux biais qui sont sources d'erreurs systématiques et altèrent l'estimation des performances de diagnostic. Le biais d'intégrité est observé lorsque l'opérateur connaît à l'avance le statut du patient. Un test à l'insu évite ce type d'erreur. Le biais de vérification consiste à répéter un test en cas de doute, ce qui perturbe également l'analyse statistique qui en découle. Le test étudié et celui de référence doivent être faits dans un ordre aléatoire et dans un intervalle de temps court.

### A.3.2 Définition du Gold Standard

Un Gold Standard est un test de diagnostic fiable à 100% qui permet de statuer sans aucun doute sur le statut malade/non-malade. Mais c'est un concept théorique qui existe rarement dans la réalité. Dans la pratique, les tests de diagnostics sont comparés à un test de référence considéré comme le plus fiable.

Or les outils présentés dans la section A.2 estiment les performances d'un test de diagnostic par comparaison avec le test de référence qui n'est pas un Gold Standard. Si le nouveau test est meilleur que la référence, cette analyse va détecter des désaccords entre les deux tests et les considérer comme des erreurs du nouveau test. Ainsi les performances du test de diagnostic sont sous-estimées.

### **A.3.3 Analyse de classes latentes**

D'autres stratégies d'évaluation des tests diagnostics ne reposent pas sur une comparaison avec une référence. Par exemple, l'analyse de classes latentes consiste à comparer le test de diagnostic avec un ensemble de tests indépendants. L'état malade/non-malade reste une variable non-observée (latente).

Par exemple, un test génétique peut être comparé à un ensemble de trois autres tests (test sérologique, culture cellulaire, examen clinique). On peut émettre l'hypothèse que si deux tests sur trois sont positifs, le patient est considéré malade. Les performances du test de diagnostic sont alors estimées par rapport à ce critère. Avec un grand nombre de tests indépendants, on s'affranchit des erreurs des tests de référence et on obtient une meilleure visibilité sur le statut biologique.

---

### Protocoles biologiques d'amplification d'acides nucléiques

---

DEPUIS l'amplification d'acides nucléiques par PCR, de nouvelles configurations de primers permettent de s'affranchir des cycles thermiques. Les protocoles biologiques consistent à mélanger en microtubes tous les ingrédients nécessaires à la réaction : les primers, les enzymes d'amplification, les quatre désoxyribonuléotides, un élément de détection (sonde ou intercalant d'ADN) et des ions pour tamponner la solution. La plupart de ces composés sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant utilisation.

#### **B.1 LAMP : loop-mediated isothermal amplification**

Les réactifs pour réaliser l'amplification d'ADN par la technique LAMP sont obtenus commercialement chez le fournisseur OptiGene. Le kit ISO004-nd contenant l'enzyme GspSSD LF DNA polymérase, est utilisé pour l'amplification d'ADN de Salmonelle. Pour chaque réaction, il faut ajouter les primers spécifiques de la cible du diagnostic :  $0,8\ \mu\text{M}$  de primers FIP,  $0,8\ \mu\text{M}$  de primers BIP,  $0,2\ \mu\text{M}$  de primers F3,  $0,2\ \mu\text{M}$  de primers B3,  $0,4\ \mu\text{M}$  de primers Loop F,  $0,4\ \mu\text{M}$  de primers Loop B. Cette préparation ne contient pas d'éléments de détection. L'ajout d'un intercalant d'ADN, comme EvaGreen ou SybrGreen, permet la détection de l'amplification en fluorescence.

A la solution de  $25\ \mu\text{L}$  de réactifs,  $5\ \mu\text{L}$  d'échantillon, extraits d'ADN, sont ajoutés. Le microtube est alors placé dans une instrumentation assurant le chauffage à  $65^{\circ}\text{C}$  pendant 60 minutes et une lecture en fluorescence aux longueurs d'onde compatibles avec les propriétés optiques de l'intercalant d'ADN.

#### **B.2 RT-RPA : reverse transcription and recombinase proteins amplification**

La réaction RT-RPA est disponible commercialement chez le fournisseur TwistDX. Il s'agit donc d'un kit dont la composition exacte n'est pas disponible.

### **B.2.1 Préparation du mélange réactionnel**

Selon les recommandations du fournisseur TwistDX, le milieu réactionnel pour une RT-RPA *exo-kit* est préparé avec les composants ci-dessous :

- 2,1  $\mu\text{L}$  d'une solution de primers Forward à la concentration 10  $\mu\text{M}$ ,
- 2,1  $\mu\text{L}$  d'une solution de primers Reverse à la concentration 10  $\mu\text{M}$ ,
- 0,6  $\mu\text{L}$  d'une solution de primers Sonde à la concentration 10  $\mu\text{M}$ ,
- 29,5  $\mu\text{L}$  de solution tampon de réhydratation,
- 6,7  $\mu\text{L}$  d'eau.

Ces 41  $\mu\text{L}$  sont utilisés pour remettre en solution le mélange lyophilisé par le fournisseur. 5  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont ajoutés contenant ou non l'ARN cible. 4  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acétate de magnésium ( $c = 280 \mu\text{M}$ ) sont pipetés dans le bouchon de chaque tube. Des étapes de centrifugation et vortex assurent le mélange de tous les composés.

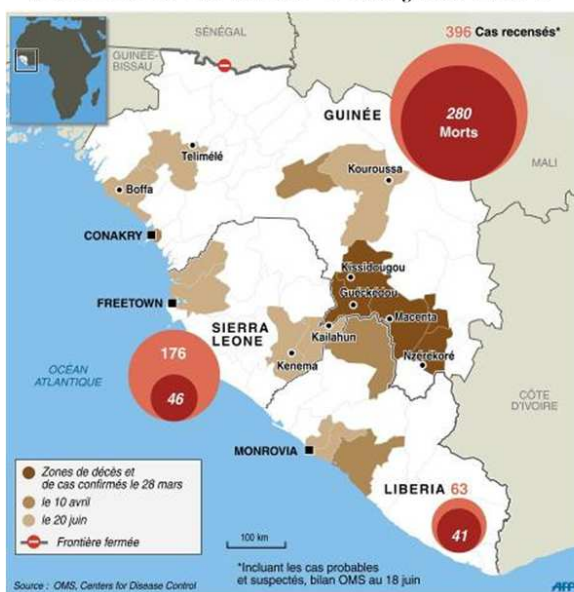
### **B.2.2 Expérience d'amplification**

Le milieu réactionnel est chauffé à 40 °C pendant 20 à 30 minutes, et suivi en fluorescence aux longueurs d'onde de la sonde FAM.

## Un centre de traitement Ebola à Macenta en Guinée

MACENTA est une ville qui compte environ 40 000 habitants et est située dans la région de N'Zérékoré. En février 2014, les tout premiers cas de fièvres hémorragiques du virus Ebola sont signalés en Guinée forestière dans les préfectures de Gueckedou, Macenta et Kissidougou. Dès avril 2014, le Ministère de la Santé au Liberia confirme la présence du virus Ebola sur son territoire. En juin 2014, l'épidémie se propage jusqu'aux régions côtières plus urbaines de Guinée et de Sierra Leone. Rapidement, l'épidémie surprend par son ampleur géographique et son lourd bilan humain. Dès septembre 2014, 5 435 cas d'infections par le virus Ebola sont comptabilisés et responsables de 2 679 décès.

Situation en mars-avril-juin 2014



Bilan en août 2016

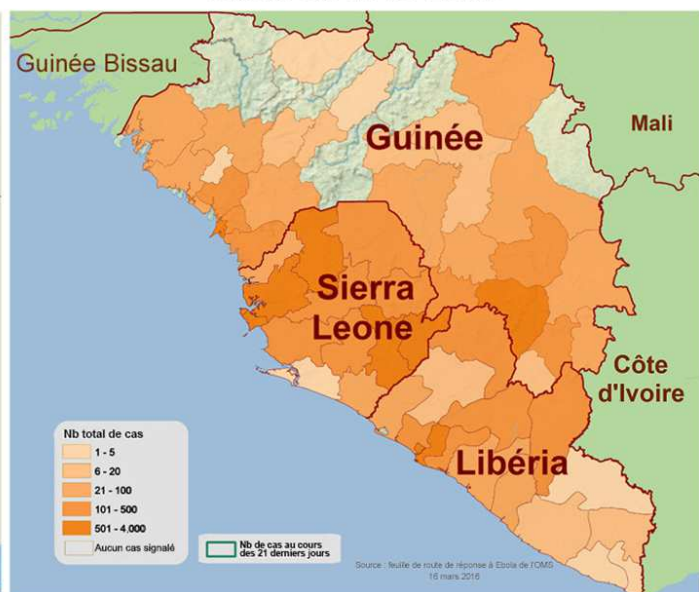


Figure C.1 – Répartition géographique des infections par le virus Ebola en 2014 et 2016.



La Croix Rouge française est intervenue à partir d'avril 2014 en Guinée pour contribuer à la lutte contre Ebola. Les premières missions ont consisté à sensibiliser les populations (modes de transmissions, gestion des personnes suspectées d'être infectées), désinfecter des bâtiments contaminés, distribuer du chlore/savon, mettre en place des enterrements sécurisés des personnes décédées d'Ebola, suivre les cas contacts pendant la durée d'incubation du virus.

En complément de deux Centres de Traitement Ebola (CTE) déjà mis en place en Guinée par Médecins Sans Frontières Belgique, la Croix Rouge française ouvre un CTE à Macenta le 18 novembre 2014. S'il n'existe pas de traitement contre la maladie à virus Ebola, une prise en charge des patients et un traitement symptomatique (réhydratation et gestion de la douleur) améliorent grandement les chances de survie et empêchent la propagation du virus.

Le diagnostic est assuré dans un laboratoire d'analyse géré par l'Institut Pasteur et accueillant des initiatives de recherche pilotées par l'INSERM et le CEA.

## C.1 Carnets de voyage

L'arrivée en Guinée se fait par l'aéroport international de Conakry, la capitale. J'y passe une nuit avant de repartir le lendemain matin vers la Guinée forestière. Toute la logistique des déplacements est assurée par la Croix Rouge française. Un chauffeur m'amène donc de bon matin à l'aéroport national où les services aériens humanitaires (UNHAS : United Nations Humanitarian Air Service) organisent des vols internes pour convoier matériel et personnel vers les régions guinéennes inaccessibles par la route en saison des pluies. Pour ces mêmes raisons météorologiques, de nombreux vols sont annulés, par chance le mien a bien lieu. Le petit avion d'un vingtaine de places me conduit jusqu'à N'Zérékoré où un autre chauffeur de la Croix Rouge m'attend pour les 2h30 de route qui nous séparent de Macenta.



Figure C.2 – Trajet de Conakry à Macenta.

Il existe un petit aéroport à Macenta qui ne peut accueillir que des hélicoptères. Ils sont utilisés régulièrement pour le ravitaillement de consommables, notamment les réactifs réfrigérés nécessaires au diagnostic médical.



**Figure C.3** – A 30 min de piste de Macenta, un hélicoptère permet le ravitaillement logistique.

A Macenta, plusieurs bâtiments (logements, hôtels, hangars) sont loués par la Croix Rouge française pour accueillir les bureaux, loger les expatriés et conserver les stocks logistiques. Toutes les fonctions d'intendance sont effectuées par des employés guinéens : gardiennage, cuisine, entretien, ... Pendant mon séjour (août 2015), seuls 8 expatriés étaient présents à Macenta pour assurer le fonctionnement du laboratoire de diagnostic, la gestion du CTE et l'encadrement des équipes guinéennes de sensibilisation. L'absence de patients depuis mars 2015 a permis de réduire les effectifs tout en maintenant la vigilance. Au plus fort de l'épidémie, ce sont plus de 50 expatriés et 250 employés nationaux qui ont été mobilisés.



**Figure C.4** – Lieu de vie à Macenta, mont Woko et marché en centre ville.

Le contexte épidémique impose des conditions de sécurité strictes : à l'entrée de chaque site de la Croix Rouge française, il faut se laver les mains à l'eau chlorée et un gardien vérifie notre température corporelle par un thermomètre infrarouge. Les contacts humains sont également proscrits, même entre expatriés. Un salut à distance est préféré à une poignée de main.



**Figure C.5** – Mesures de prévention à l'entrée de chaque site de la Croix Rouge.

## C.2 Organisation du Centre de Traitement Ebola

Le CTE de Macenta est un vaste terrain occupé par de nombreuses tentes de la Croix Rouge française et un seul bâtiment qui abrite le laboratoire d'analyses. Le sol est recouvert de gravier pour éviter les inconvénients d'une terre boueuse, surtout pendant la saison des pluies.



Figure C.6 – Centre de Traitement Ebola à Macenta.

Le site est organisé autour de trois pôles : les services techniques, l'accueil du public, la prise en charge des patients. Seule cette dernière zone est définie comme à "haut risque" en raison de la présence potentielle de personnes infectées par le virus Ebola. Les deux autres zones sont dites à "bas risque".

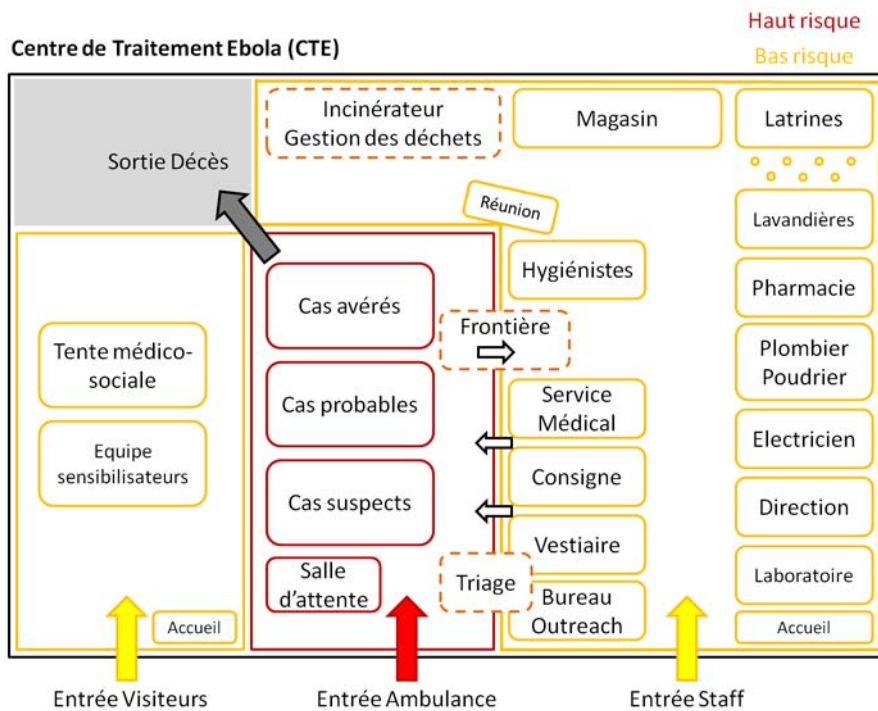


Figure C.7 – Organisation des différents services du CTE

### C.2.1 Services techniques

Le fonctionnement du CTE nécessite de nombreux services aux compétences variées.

Le **Bureau Outreach** dispose de tout le matériel nécessaire pour aller chercher une personne et la ramener en toute sécurité au CTE. Ils ont également des kits pour permettre les enterrements communautaires sécurisés. Une tente **Consigne** abrite le stock de vêtements de travail pour tous les employés du CTE, qui se changent dans les **Vestiaires**. Dans un petit bâtiment se trouve l'**électricien** du CTE, en charge de la maintenance de tout le réseau électrique. En effet, le CTE doit pouvoir fonctionner 24h/24. Plus loin, un employé assure les fonctions de **plombier/poudrier** : il s'occupe du réseau d'eau chlorée et d'eau javellisée qui alimente tout le site. Un service de **Laverie** (les "lavandières") est chargé du lavage des tenues du personnel soignant. Les stocks matériels sont conservés dans le **Magasin**. La **Pharmacie** assure l'inventaire et la distribution des médicaments. Le **Service Médical** rassemble les médecins et infirmiers qui travaillent au plus près des patients. Le CTE dispose également d'une gestion autonome des déchets avec un **Incinérateur**.

### C.2.2 Accueil des patients

La prise en charge des patients dans la zone à haut risque est organisée selon plusieurs étapes. Un examen clinique est réalisé dans la tente de triage pour poser un premier diagnostic et confirmer ou non la suspicion d'infection par le virus Ebola. Les patients sont ensuite répartis et pris en charge dans les tentes de soin. La gravité de leur état, les symptômes présents et le résultat du diagnostic de laboratoire définissent leur statut : cas suspect, cas probable, cas avéré.

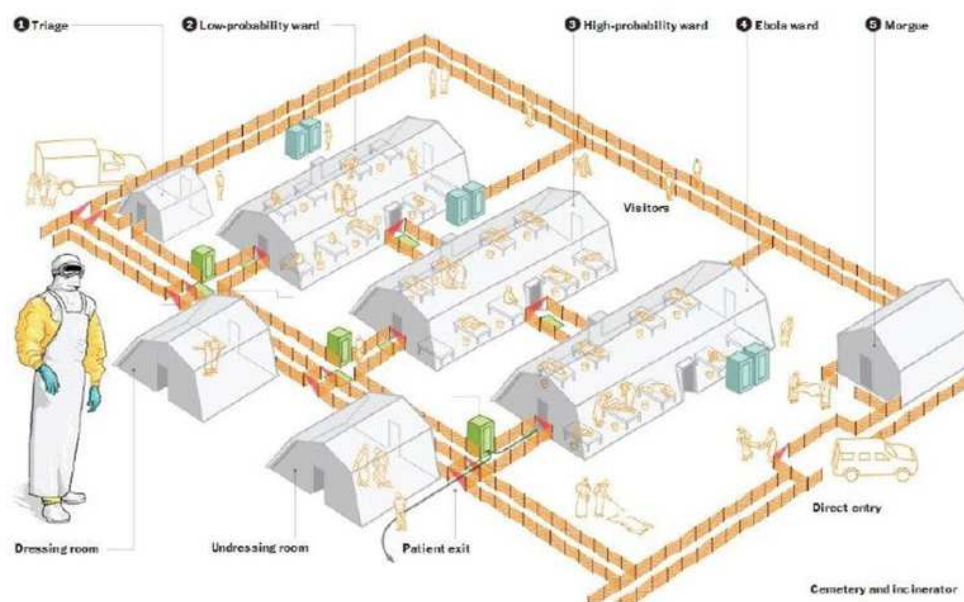


Figure C.8 – Plan de la zone à haut risque

### Protection du personnel soignant

Le travail du personnel soignant au chevet du patient nécessite des équipements de protection individuelle fiables contre le virus Ebola. Pour cela, une tenue complète associée à trois paires de gants, des lunettes, des bottes, un masque, une cagoule et un tablier sont nécessaires. La procédure d'habillage est stricte et est réalisée à l'aide d'un co-équipier qui s'assure du bon respect de toutes les étapes.



Figure C.9 – Tenue de protection individuelle.

Dans la zone à haut risque, n'importe quelle manipulation médicale autour d'un patient est accompagnée du travail d'un hygiéniste. Ce dernier désinfecte en permanence tout ce qui est touché/souillé par le patient. La tenue de protection rend fatigant et difficile le travail dans la zone à haut risque. Les missions sont donc effectuées en binômes afin que les co-équipiers veillent l'un sur l'autre et agissent en cas de malaise. La durée de travail dans la zone à haut risque est limitée à 45 minutes. Un tableau de service permet la surveillance de toutes les équipes.



Figure C.10 – Travail des hygiénistes et tableau des personnes en service.

### Communications entre les zones bas-risque et haut-risque

L'entrée du personnel soignant dans la zone à haut risque se fait par l'intermédiaire de deux barrières espacées d'un mètre, séparant les services techniques de l'espace de soin. Le transfert de matériel vers les patients est possible par de simples plans inclinés.

La sortie du personnel soignant est beaucoup plus encadrée. Cette frontière haut risque/bas risque est équipée de nombreuses poubelles remplies d'eau chlorée à différentes dilutions, de pédiluves et de sprays pour désinfecter l'intégralité du matériel et de la tenue. Le processus de déshabillage et de décontamination est long et très précis. Chaque geste est dicté par un hygiéniste-sprayer qui désinfecte méticuleusement chaque objet. La tenue est rincée dans plusieurs bassines d'eau chlorée puis claire avant d'être transférée aux lavandières.



Figure C.11 – Voies de communication avec la zone à haut risque.

### Procédures de diagnostic

Le laboratoire d'analyses est un petit bâtiment de quatre pièces : la pièce infectieuse dans laquelle sont reçus les échantillons, un laboratoire pour la préparation des mix PCR, un petit bureau et une pièce de stockage du consommable. Le rôle de ce laboratoire est de tester la présence du virus Ebola dans des échantillons biologiques. Ces prélèvements viennent de plusieurs contextes : patients venus au CTE, décès suspect dans la région, suivi des personnes guéries.



Figure C.12 – Laboratoire d'analyse dans le CTE.

Le transport des échantillons de manière sécurisée, est réalisé en plaçant le prélèvement infectieux dans plusieurs contenants tous désinfectés. Au laboratoire, ils sont transportés directement

dans la pièce infectieuse qui nécessite un équipement de protection individuelle important. Les étapes de préparation d'échantillons qui consistent à inactiver le virus et extraire les acides nucléiques, sont réalisées dans une boîte à gants. L'extraction peut alors sortir de la pièce infectieuse, vers le laboratoire pour l'amplification et la détection PCR.

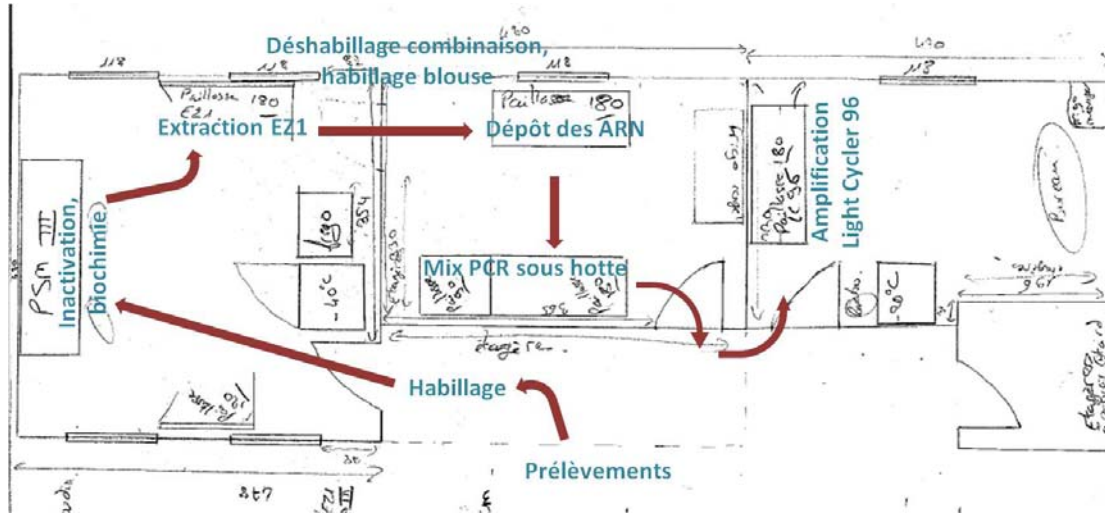


Figure C.13 – Procédure et trajectoire de diagnostic après réception d'un échantillon.

### C.2.3 Rôle social

L'enraiment de l'épidémie Ebola repose principalement sur des actions de prévention pour lutter contre la propagation virale. Pour cela, des équipes de sensibilisateurs communautaires sont formées par la Croix Rouge française, pour transmettre à l'ensemble de la population les bonnes pratiques d'hygiène et la conduite à tenir auprès de patients suspects. Ils font le tour des communautés, même les plus éloignées et les plus réticentes. Certains villages épargnés par l'épidémie refusent de laisser entrer ceux qui ont été au plus proche du virus par crainte d'une recrudescence de l'épidémie.



Figure C.14 – Prévention sur la transmission du virus Ebola et kit de sortie fourni aux guéris.

Chaque patient déclaré guéri et autorisé à sortir, se voit remettre un kit contenant quelques vêtements, de la nourriture, les principaux accessoires d'hygiène. Un téléphone, une carte SIM et une carte pré-payée sont fournis pour faciliter le contact entre le CTE et le patient en cas de nouveaux symptômes.

Des équipes psycho-sociales assurent des entretiens individuels et des groupes de paroles sur différentes thématiques. Leurs buts sont d'accompagner le retour à la vie normale des personnes guéries d'Ebola et des familles endeuillées. Leur travail est essentiel dans la reconstruction psychologique et pratique post-Ebola : de nombreux cas d'exclusion sociale sont à déplorer.

Un grand merci à Béatrice pour la réalisation des expériences papier en plus de toute l'activité de diagnostic, et à Moriba pour son sourire quotidien au laboratoire, ainsi qu'à toutes les personnes rencontrées lors de ce voyage.



**Figure C.15** – Béatrice qui réalise nos expériences papier, Moriba Povogui laboratin guinéen, moi en tenue de travail.





---

## Communications scientifiques

---

### Présentations orales

L. Magro, “Review of paper microfluidics fabrication”, *Workshop IPGG*, Paris, France, 24 avril 2014.

L. Magro, B. Jacquelin, J.-C. Manuguerra, F. Monti, J. Vanhomwegen, P. Lafaye, P. Tabeling, “Genetic-based diagnostic on paper”, *Conférence  $\mu$ TAS 2015*, Gyeongju, Corée du Sud, 25-29 Octobre 2015.

L. Magro, G. Ber, P. Le Floch, F. Monti, J. Guibourdenche, P. Tabeling, “Coupling microfluidics and spectrometry for quantitative elution of dried samples on paper.”, *Séminaire mensuel IPGG*, Paris, France, 9 juin 2016.

### Sessions posters

L. Magro, C. Albert, P. Le Floch, F. Monti, P. Tabeling, “ $\mu$ -Paper Analytical Devices : solutions to improve sensitivity”, *GDR Micro Nano Systèmes - Micro Nano Fluidique 2014*, Palaiseau, France, 7-8 Juillet 2014.

L. Magro, B. Jacquelin, J. Guibourdenche, P. Lafaye, J.-C. Manuguerra, J. Vanhomwegen, F. Monti, P. Tabeling, “Ebola - Le papier : un outil de diagnostic de terrain”, *Cérémonie de remise des bourses L'Oréal-UNESCO - For Women in Science*, Paris, France, 30 septembre 2015.

### Brevets

L. Magro, F. Monti, P. Tabeling, “Support de stockage et de concentration d'un composé non volatil et dispositif le comportant”, *Demande de brevet n ° FR1360985*, déposée le 8 novembre 2013, extension PCT le 6 novembre 2014.

L. Magro, F. Monti, P. Tabeling, “Procédés de stockage, transport et déstockage d’un composé non volatil”, *Demande de brevet n ° FR1360986*, déposée le 8 novembre 2013, extension PCT le 6 novembre 2014.

L. Magro, F. Monti, P. Tabeling, “Procédé de stockage et de concentration d’un composé non volatil”, *Demande de brevet n ° FR1360987*, déposée le 8 novembre 2013, extension PCT le 6 novembre 2014.

L. Magro, B. Jacquelin, P. Lafaye, J.-C. Manuguerra, F. Monti, A. Sakuntabhai, J. Vanhomwegen, P. Tabeling, “Dispositif de diagnostic par amplification isotherme d’ADN”, *Demande de brevet n ° FR1551189*, déposée le 13 février 2015, extension PCT le 12 février 2016.

### Publications scientifiques

L. Magro, B. Jacquelin, C. Escadafal, P. Garneret, A. Kwasiborski, J.-C. Manuguerra, F. Monti, A. Sakuntabhai, J. Vanhomwegen, P. Lafaye, P. Tabeling, “Paper-based RNA detection and multiplexed analysis for Ebola virus diagnostics”, *Article en cours de soumission*.

L. Magro, B. Jacquelin, C. Escadafal, P. Garneret, A. Kwasiborski, J.-C. Manuguerra, F. Monti, A. Sakuntabhai, J. Vanhomwegen, P. Lafaye, P. Tabeling, “Paper microfluidics for nucleic acids amplification testing (NAAT)”, *Lab on a Chip, Revue en cours de soumission*.

### Médiation scientifique

Invitée au *UpFest* à la Bellevilloise, “Bienvenue demain”, 20 juin 2015.

Animatrice pendant la *Nuit des Chercheurs* : stand sur la microfluidique papier, Espace Pierre-Gilles de Gennes, 25 septembre 2015.

Lauréate de la bourse L’Oréal-UNESCO 2015 - *For Women in Science*.

Invitée pendant la Social Good Week, “Le numérique se réincarne”, *SoScience!*, 6 novembre 2015.

Intervenante dans des lycées pour promouvoir les carrières scientifiques notamment celles des jeunes filles, programme “L’Oréal - *For Girls in Science*”, de novembre 2015 à mai 2016.

Ambassadrice de la Fondation PremUp comme scientifique engagée pour la *Journée de la Femme*, 8 mars 2016.

Invitée pour le tournage d’une vidéo de vulgarisation scientifique pour la chaîne Youtube de

l'ESPCI Paris, "Projet Lutétium", diffusion à partir du 20 septembre 2016.

### **Publications grand public**

Articles de presse - octobre 2015 : l'*Observatoire de la réussite*, le *Quotidien du médecin*, *Elle.fr*, *Vanity Fair*, les *Portes de Provence*, le *Dauphiné*, ...

Infographie *Le Monde - supplément Sciences*, paru le 27 octobre 2015

Reportage France 5 dans *Le Magazine de la Santé*, diffusé le 3 décembre 2015.



---

## Bibliographie

---

- [1] Pavan Sukhdev and Nick Nuttall. A brief for policymakers on the green economy and millennium development goals. *Green Economy*, 2010.
- [2] Craig A. Lehmann. The future of home testing : implications for traditional laboratories. *Clinica Chimica Acta*, 323(1-2) :31–36, 2002.
- [3] B.G. Celler, N.H. Lovell, and J. Basilakis. Using information technology to improve the management of chronic diseases. *Medical Journal of Australia*, 179(5) :242–246, 2003.
- [4] M.L. Kilgore, S.J. Steindel, and J.A. Smith. Evaluating stat testing options in an academic health center : therapeutic turnaround time and staff satisfaction. *Clinical Chemistry*, 44(8) :1597–1603, 1998.
- [5] J. McCord, R.M. Nowak, P.A. McCullough, C. Foreback, S. Borzak, G. Tokarski, M.C. Tomlanovich, G. Jacobsen, and W.D. Weaver. Ninety-minute exclusion of acute myocardial infarction by use of quantitative point-of-care testing of myoglobin and troponin i. *Circulation*, 104(13) :1483–1488, 2001.
- [6] Siu Ming Ng, Padma Krishnaswamy, Robin Morrissey, Paul Clopton, Robert Fitzgerald, and Alan S. Maisel. Ninety-minute accelerated critical pathway for chest pain evaluation. *American Journal of Cardiology*, 99 :611–617, 2001.
- [7] C.G. Fraser. Optimal analytical performance for point of care testing. *Clinica Chimica Acta*, 307(1-2) :37–43, 2001.
- [8] B. Delaney, S. Wilson, D. Fitzmaurice, C. Hyde, and R. Hobbs. Near-patient tests in primary care : setting the standards for evaluation. *Journal of Health Service Research Policy*, 5(1) :37–41, 2000.
- [9] Piia von Lode. Point-of-care immunotesting : Approaching the analytical performance of central laboratory methods. *Clinical Biochemistry*, 38 :591–606, 2005.
- [10] U.R. Jahn and H. Van Aken. Near patient testing : point of care or point of costs and convenience. *British Journal of Anaesthesia*, 90(4) :425–427, 2003.
- [11] R. Grieve, R. Beech, J. Vincent, and J. Mazurkiewicz. Near patient testing in diabetes clinics : appraising the costs and outcomes. *Health Technology Assessment*, 3(5), 1999.
- [12] *An introduction to Microfluidics*. Oxfords, 2010.

- [13] Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, Manish J. Butte, and George M. Whitesides. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie*, 46 :1318–1320, 2007.
- [14] Edward W. Washburn. The dynamics of capillary flow. *The Physical Review*, 17(3) :273–284, 1921.
- [15] Reza Masoodi and Krishna M. Pillai. Darcy’s law-based model for wicking in paper-like swelling porous media. *AIChE*, 56(9) :2257–2268, 2010.
- [16] Luc Gervais and Emmanuel Delamarche. Toward one-step point-of-care immunodiagnos- tics using capillary-driven microfluidics and pdms substrates. *Lab on a Chip*, 9 :3330–3337, 2009.
- [17] M.I. Mohammed and M.P.Y. Desmulliez. Autonomous capillary microfluidic system with embedded optics for improved troponin i cardiac biomarker detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 61 :478–484, 2014.
- [18] David Juncker, Heinz Schmid, Ute Drechsler, Heiko Wolf, Marc Wolf, Bruno Michel, Nico de Rooij, and Emmanuel Delamarche. Autonomous microfluidic capillary system. *Analytical Chemistry*, 74 :6139–6144, 2002.
- [19] N. Scott Lynn and David S. Dandy. Passive microfluidic pumping using coupled capil- lary/evaporation effects. *Lab on a Chip*, 9 :3422–3429, 2009.
- [20] Glenn M. Walker and David J. Beebe. An evaporation-based microfluidic sample concen- tration method. *Lab on a Chip*, 2 :57–61, 2002.
- [21] Jacques Leng, Barbara Lonetti, Patrick Tabeling, Mathieu Joanicot, and Armand Ajdari. Micro-evaporators for kinetic exploration of phase diagrams. *Physical Review Letters*, 96(8), 2006.
- [22] L. Courbin, J.C. Bird, M. Reyssat, and H.A. Stone. Dynamics of wetting : from inertial spreading to viscous imbibition. *Journal of Physics : Condensed Matter*, 21, 2009.
- [23] H.P.G. Darcy. Détermination des lois d’écoulement de l’eau à travers le sable.
- [24] D.A. Lockington, J.Y. Parlange, and M. Lenkopane. Capillary absorption in porous sheets and surfaces subject to evaporation. *Transport in Porous Media*, 68 :29–36, 2007.
- [25] Raymond John Roberts. *Liquid penetration into paper*. PhD thesis, The Australian National University, 2004.
- [26] Elain Fu, Stephen A. Ramsey, Peter Kauffman, Barry Lutz, and Paul Yager. Transport in two-dimensional paper networks. *Microfluid Nanofluid*, 10 :29–35, 2011.
- [27] Wouter van der Wijngaart. Capillary pumps with constant flow rate. *Microfluid Nano- fluid*, 16 :829–837, 2014.
- [28] Juhwan Park, Joong Ho Shin, and Je-Kyun Park. Pressed paper-based dipstick for de- tection of foodborne pathogens with multistep reactions. *Analytical Chemistry*, 88 :3781–3788, 2016.
- [29] L.H. Tanner. The spreading of silicone oil drops on horizontal surfaces. *Journal of Physics : Applied Physics*, 12(9) :1473–1484, 1979.
- [30] W.B. Hardy. The spreading of fluids on glass. *Philosophical Magazine*, 38(49), 1919.

- [31] Robert N. Wenzel. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial and Engineering Chemistry*, 28(8) :988–994, 1936.
- [32] A.B.D. Cassie and S. Baxter. Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday Society*, 1944.
- [33] Robert D. Deegan, Olgica Bakajin, Todd F. Dupont, Greb Huber, Sidney R. Nagel, and Thomas A. Witten. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, 389 :827–829, 1997.
- [34] Noosheen Walji and Brendan D. MacDonalrd. Influence of geometry and surrounding conditions on fluid flow in paper-based devices. *Micromachines*, 7 :73–86, 2016.
- [35] Kevin M. Schilling, Anna L. Lepore, Jason A. Kurian, and Andres W. Martinez. Fully enclosed microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*, 84 :1579–1585, 2012.
- [36] Jing Wang, Zongyuan Chen, Paul L. A. M. Corstjens, Michael G. Mauka, and Haim H. Bau. A disposable microfluidic cassette for dna amplification and detection. *Lab on a Chip*, 6 :46–53, 2006.
- [37] Changchun Liu, Eran Geva, Michael Mauk, Xianbo Qiu, William R. Abrams, Daniel Malamud, Kelly Curtis, S. Michele Owen, and Haim H. Bau. An isothermal amplification reactor with an integrated isolation membrane for point-of-care detection of infectious diseases. *Analyst*, 136 :2069–2077, 2011.
- [38] Manoharanehru Branavan, Ruth E. Mackay, Pascal Craw, Angel Naveenathayalan, Jeremy C. Ahern, Tulasi Sivanesan, Chris Hudson, Thomas Stead, Jessica Kremer, Neha Garg, Mark Baker, Syed T. Sadiq, and Wamadewa Balachandran. Modular development of a prototype point of care molecular diagnostic platform for sexually transmitted infections. *Medical Engineering and Physics*, pages 1–8, 2016.
- [39] Lu Zhang, Yi Zhang, Chunyan Wang, Qiang Feng, Fei Fan, Guojun Zhang, Xixiong Kang, Xuzhen Qin, Jiashu Sun, Yinghui Li, and Xingyu Jiang. Integrated microcapillary for sample-to-answer nucleic acid pretreatment, amplification, and detection. *Analytical Chemistry*, 86 :10461–10466, 2014.
- [40] Wupeng Gan, Bin Zhuang, Pengfei Zhang, Junping Han, Li Cai-Xia, and Peng Liu. A filter paper-based microdevice for low-cost, rapid, and automated dna extraction and amplification from diverse sample types. *Lab on a Chip*, 14(19) :3719–3728, 2014.
- [41] Maowei Dou, Delfina C. Dominguez, XiuJun Li, Juan Sanchez, and Gabriel Scott. A versatile pdms/paper hybrid microfluidic platform for sensitive infectious disease diagnosis. *Analytical Chemistry*, 86 :7978–7986, 2014.
- [42] Ana Gisela Cunha and Alessandro Gandini. Turning polysaccharides into hydrophobic materials : a critical review. part 1. cellulose. *Cellulose*, 17 :875–889, 2010.
- [43] Rober Pelton. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(8) :925–948, 2009.
- [44] Julie Credou and Thomas Berthelot. Cellulose : from biocompatible to bioactive material. *Journal of Materials Chemistry*, 2 :5767–4788, 2014.



- [45] Sabina Di Risio and Ning Yan. Bioactive paper through inkjet printing. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 24(3) :661–684, 2010.
- [46] Jia Li and Joanne Macdnald. Advances in isothermal amplification : novel strategies inspired by biological processes. *Biosensors and Bioelectronics*, 64 :196–211, 2015.
- [47] P. Kubelka and F. Munk. Ein beitrage zur optik der farbanstriche. *Zeitschrift fur technische Physik*, 12 :593–601, 1931.
- [48] Elizabeth Evans, Ellen Flávia Moreira Gabriel, Wendell Karlos Tomazelli Coltro, and Carlos D Garcia. Rational selection of substrates to improve color intensity and uniformity on microfluidic paper-based analytical devices. *Analyst*, 139(9) :2127–2132, 2014.
- [49] Jielong Su, Mohammad Al-Tamimi, and Gil Garnier. Engineering paper as a substrate for blood typing bio-diagnostics. *Cellulose*, 19 :1749–1758, 2012.
- [50] Roger E. Luckham and John D. Brennan. Bioactive paper dipstick sensors for acetylcholinesterase inhibitors based on sol-gel/enzyme/gold nanoparticle composites. *Analyst*, 135 :2028–2035, 2010.
- [51] Ellen F.M. Gabriel, Paulo T. Garcia, Thiago M.G. Cardoso, Flabio M. Lopes, Felipe T. Martins, and Wendell K.T. Coltro. Highly sensitive colorimetric detection of glucose and uric acid in biological fluids using chitosan-modified paper microfluidic devices. *Analyst*, 2016.
- [52] Geertruida A. Posthuma-Trumpie and Aart van Korf, Jakob an Amerongen. Lateral flow (immuno)assay : its strengths, weaknesses, opportunities and threats. a literature survey. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 393 :569–582, 2009.
- [53] Erin M. Fenton, Monica R. Mascarenas, Gabriel P. Lopez, and Scott S. Sibbett. Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. *Applied Materials and Interfaces*, 1(1) :124–129, 2009.
- [54] Jinfang Nie, Yuanzhi Liang, Yun Zhang, Shangwang Le, Dunnan Li, and Songbai Zhang. One-step patterning of hollow microstructures in paper by laser cutting to create microfluidic analytical devices. *Analyst*, 138 :671–677, 2013.
- [55] Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, Benjamin J. Wiley, Malancha Gupta, and George M. Whitesides. Flash : A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 8 :2146–2150, 2008.
- [56] Derek A. Bruzewicz, Meital Reches, and George M. Whitesides. Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. *Analytical Chemistry*, 80(9) :3387–3393, 2008.
- [57] Emanuel Carrilho, Andres W. Martinez, and George M. Whitesides. Understanding wax printing : A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical Chemistry*, 81 :7091–7095, 2008.
- [58] Xiao Li and Xinyu Liu. Fabrication of three-dimensional microfluidic channels in a single layer of cellulose paper. *Microfluid Nanofluid*, 16 :819–827, 2014.
- [59] Regina Verena Taudte, Alison Beavis, Linzi Wilson-Wilde, Claude Roux, Philip Doble, and Lucas Blanes. A portable explosive detector based on fluorescence quenching of pyrene deposited on coloured waxprinted mpads. *Lab on a Chip*, 13 :4164–4173, 2013.

- [60] Xu Li, Junfei Tian, Thanh Nguyen, and Wei Shen. Paper-based microfluidic devices by plasma treatment. *Analytical Chemistry*, 80 :9131–9134, 2008.
- [61] Qiaohong He, Cuicui Ma, Xianqiao Hu, and Hengwu Chen. Method for fabrication of paper-based microfluidic devices by alkylsilane self-assembling and uv/o<sub>3</sub> patterning. *Analytical Chemistry*, 85 :1327–1331, 2013.
- [62] Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, and George M. Whitesides. Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Physics of the National American Society*, 105(50) :19606–19611, 2008.
- [63] Chien-Ching Wang, Jonathan W. Hennek, Ashok A. Kumar, Wen-Jie Lan, Judy Im, Barbara S. Smith, Mengxia Zhao, and George M. Whitesides. A paper-based pop-up electrochemical device for analysis of beta-hydroxybutyrate. *Analytical Chemistry*, 2016.
- [64] Y.L. Han, W. Wang, J. Hu, G. Huang, S. Wang, W.G. Lee, T.J. Lu, and F. Xu. Benchtop fabrication of three-dimensional reconfigurable microfluidic devices from paper-polymer composite. *Lab on a Chip*, 13(24) :4745–4754, 2013.
- [65] Ana C. Glavan, Ramses V. Martinez, E. Jane Maxwell, Anand Bala Subramaniam, Rui M. D. Nunes, Siowling Soh, and George M. Whitesides. Rapid fabrication of pressure-driven open-channel microfluidic devices in omniphobic rf paper. *Lab on a Chip*, 13 :2922–2930, 2013.
- [66] Martin M. Thuo, Ramses V. Martinez, Wen-Jie Lan, Xinyu Liu, Xinyu xBarber, Manza B. J. Atkinson, Dineth Bandarage, Jean-Francis Bloch, and George M. Whitesides. Fabrication of low-cost paper-based microfluidic devices by embossing or cut-and-stack methods. *Chemistry of Materials*, 26(14) :4230–4237, 2014.
- [67] Jennifer L. Osborn, Barry Lutz, Elain Fu, Peter Kauffman, Dean Y. Stevens, and Paul Yager. Microfluidics without pumps : reinventing the t-sensor and h-filter in paper networks. *Lab on a Chip*, 10(20) :2637–2824, 2010.
- [68] Jared Houghtaling, Tinny Liang, Gregory Thiessen, and Elain Fu. Dissolvable bridges for manipulating fluid volumes in paper networks. *Analytical Chemistry*, 85(23) :11201–11204, 2013.
- [69] Barry Lutz, Tinny Liang, Elain Fu, Sujatha Ramachandran, Peter Kauffman, and Paul Yager. Dissolvable fluidic time delays for programming multistep assays in instrument-free paper diagnostics. *Lab on a Chip*, 13 :2840–2848, 2013.
- [70] P.J.W. He, I.N. Katis, R.W. Eason, and C.L. Sones. Engineering fluidic delays in paper-based devices using laser direct-writing. *Lab on a Chip*, 15 :4054–4061, 2015.
- [71] Bhushan J. Toley, Jessica A. Wang, Mayuri Gupta, Joshua R. Buser, Lisa K. Laffleur, Barry R. Lutz, Elain Fu, and Paul Yager. A versatile valving toolkit for automating fluidic operations in paper microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 15(6) :1432–1444, 2015.
- [72] Marc A. Unger, Hou-Pu Chou, Todd Thorsen, Axel Scherer, and Stephen R. Quake. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 288 :113–118, 2000.
- [73] Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, and George M. Whitesides. Diagnostics for the developing world : Microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*, 82 :3–10, 2010.

- [74] Xu Li, Junfei Tian, and Wei Shen. Progress in patterned paper sizing for fabrication of paper-based microfluidic sensors. *Cellulose*, 17 :649–659, 2010.
- [75] Bernard M. Branson. Rapid tests for hiv antibody. *AIDS Reviews*, 2 :76–83, 2000.
- [76] Feng Wu, Hang Yuan, Changhua Zhou, Mao Mao, Qian Liu, Huaibin Shen, Yu Cen, Zhifeng Qin, Lan Ma, and Ling Song Li. Multiplexed detection of influenza a virus subtype h5 and h9 via quantum dot-based immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*, 77 :464–470, 2016.
- [77] Hao Yang, Ding Li, Rong He, Qin Guo, Kan Wang, Xueqing Zhang, Peng Huang, and Daxiang Cui. A novel quantum dots-based point of care test for syphilis. *Nanoscale Research Letter*, 5 :875–881, 2010.
- [78] Nathalie Khreich, Patricia Lamourette, Hervé Boutal, Karine Devilliers, Christophe Créminon, and Hervé Volland. Detection of staphylococcus enterotoxin b using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. *Analytical Biochemistry*, 377 :182–188, 2008.
- [79] Yiseul Ryu, Zongwen Jin, Mun Suk Kang, and Hak-Sung Kim. Increase in the detection sensitivity of a lateral flow assay for a cardiac marker by oriented immobilization of antibody. *BioChip Journal*, 5(3) :193–198, 2011.
- [80] Tuija Teerinen, Timo Lappalainen, and Tomi Erho. A paper-based lateral flow assay for morphine. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 406(24) :5955–5965, 2014.
- [81] B. Capolaghi, B. Charbonnier, M. Dumontet, B. Hennache, J. Henninot, T. Laperche, A. Lavoine, G. Lefevre, C. Morin, and D. Pateron. Recommandations sur la prescription, le dosage et l’interprétation des troponines cardiaques. *Annales de Biologies Cliniques*, 63(3) :245–261, 2005.
- [82] Xu Han, Shanghao Li, Zhili Peng, Abdelhameed M. Othman, and Roger Leblanc. Recent development of cardiac troponin i detection. *American Chemical Society Sensors*, 1 :106–114, 2016.
- [83] J. Todd, B. Freese, A. Lu, D. Held, J. Morey, R. Livingston, and P. Goix. Ultra-sensitive flow-based immunoassay using single-molecule counting. *Clinical Chemistry*, 53(11) :1990–1995, 2007.
- [84] Chao-Kai Hsu, Hsin-Yu Huang, Wan-Rung Chen, Wataru Nishie, Hideyuki Ujiie, Ken Natsuga, Shu-Ting Fan, Hsi-Kai Wang, Julia Yu-Yun Lee, Wei-Lun Tsai, Hiroshi Shimizu, and Chao-Min Cheng. Paper-based elisa for the detection of autoimmune antibodies in body fluid—the case of bullous pemphigoid. *Analytical Chemistry*, 86(9) :4605–4610, 2014.
- [85] A. Apilux, Y. Ukita, M. Chikae, O. Chailapakul, and Y.. Takamura. Development of automated paper-based devices for sequential multistep sandwich enzyme-linked immunosorbent assays using inkjet printing. *Lab on a Chip*, 13(1) :126–135, 2013.
- [86] Dong Hwan Choi, Seok Ki Lee, Young Kyoung Oh, Byeong Woo Bae, Sung Dong Lee, Sanghyo Kim, Yong-Beom Shin, and Min-Gon Kim. A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (lfa) method for the analysis of troponin i. *Biosensors and Bioelectronics*, 25 :1999–2002, 2010.

- [87] R. Guthrie and A. Susie. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 32, 1963.
- [88] Thomas W. McDade, Sharon Williams, and J. Josh Snodgrass. What a drop can do : Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography*, 44(4) :899–925, 2007.
- [89] Edward R.B. McCabe. Utility of pcr for dna analysis from dried blood spots on filter paper blotters. *PCR Methods and Applications*, 1(2) :99–106, 1991.
- [90] Sharon Cassol, Teresa Salas, M. John Gill, Michael Montpetit, James Rudnik, Cheikh Tidiane Sy, and Michael V. O’Shaughnessy. Stability of dried blood spot specimens for detection of human immunodeficiency virus dna by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(12) :3039–3042, 1992.
- [91] Chung-Chen Li, Ingrid A. Beck, Kristy D. Seidel, and Lisa M. Frenkel. Persistence of human immunodeficiency virus type 1 subtype b dna in dried-blood samples on fta filter paper. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8) :3847–3849, 2004.
- [92] Sujit R. Jangam, Douglas H. Yamada, Sally M. McFall, and David M. Kelso. Rapid, point-of-care extraction of human immunodeficiency virus type 1 proviral dna from whole blood for detection by real-time pcr. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(8) :2363–2368, 2009.
- [93] Ingrid A. Beck, Kathryn D. Drennan, Ann J. Melvin, Kathey M. Mohan, Arnd M. Herz, Jorge Alarcon, Julia Piscocoya, Carlos Velasquez, and Lisa M. Frenkel. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 subtype b dna in dried blood samples for diagnosis in infants in the field. *Journal of Clinical microbiology*, 39(1) :29–33, 2001.
- [94] S.P. Parker and W.D. Cubitt. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *Journal of Clinical Pathologies*, 52 :633–639, 1999.
- [95] Sara Mercader, David Featherstone, and William J. Bellini. Comparison of available methods to elute serum from dried blood spot samples for measles serology. *Journal of Virological Methods*, 137 :140–149, 2006.
- [96] abcam. Elisa sample preparation guide. Technical report.
- [97] Magda Anastassova Dineva, Lourdes Mahilum-Tapay, and Helen Lee. Sample preparation : a challenge in the development of point-of-care nucleic acid based assays for resource-limited settings. *Analyst*, 132 :1193–1199, 2007.
- [98] H. Alfthan, C. Haglund, J. Dabek, and U.H. Stenman. Concentrations of human choriongonadotropin, its beta-subunit, and the core fragment of the beta-subunit in serum and urine of men and nonpregnant women. *Clinical Chemistry*, 38(10) :1981–1987, 1992.
- [99] Samir A. Bhakta, Rubiane Borba, Mario Jr Taba, Carlos D. Garcia, and Emanuel Carriho. Determination of nitrite in saliva using microfluidic paper-based analytical devices. *Analytica Chimica Acta*, 809 :117–122, 2014.
- [100] L.F. Hofman. Human saliva as a diagnostic specimen. *Journal of Nutrition*, 131(5) :1–5, 2001.
- [101] Sarah J. Vella, Patrick Beattie, Rebecca Cademartiri, Anna Laromaine, Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, Katherine A. Mirica, and George M. Whitesides. Measuring

- markers of liver function using a micropatterned paper device designed for blood from a fingerstick. *Analytical Chemistry*, 84 :2883–2891, 2012.
- [102] Nira R. Pollock, Sarah McGray, Donn J. Colby, Farzad Noubary, Huyen Nguyen, The Anh Nguyen, Sariah Khormae, Sidhartha Jain, Kenneth Hawkins, Shailendra Kumar, Jason P. Rolland, Patrick D. Beattie, Nguyen V. Chau, Vo M. Quang, Cori Barfield, Kathy Tietje, Matt Steele, and Bernhard H. Weigl. Field evaluation of a prototype paper-based point-of-care fingerstick transaminase test. *PLOS One*, 8(9), 2013.
- [103] D. Sadowski, H. Cohen, L. Laine, P. Greenberg, J. Goldstein, M. Mihalov, and A.F. Cutler. Evaluation of the flexure hp whole blood antibody test for diagnosis of helicobacter pylori infection. *American Journal of Gastroenterology*, 93(11) :2119–2123, 1998.
- [104] Koji Matsuura, Kuan-Hung Chen, Cheng-Han Tsai, Wenqian Li, Yuka Asano, Keiji Naruse, and Chao-Min Cheng. Paper-based diagnostic devices for evaluating the quality of human sperm. *Microfluid Nanofluid*, 16 :857–867, 2014.
- [105] F. Osman and A. Rowhani. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by rt-pcr and real time pcr. *Journal of Virological Methods*, 133 :130–136, 2006.
- [106] H. Ahmed, E. MacLeod, G. Hide, S. Welburn, and K. Picozzi. The best practice for preparation of samples from fta cards for diagnosis of blood borne infections using african trypanosomes as a model system. *Parasites and Vectors*, 4, 2011.
- [107] Xiaoxi Yang, Omid Forouzan, Theodore P. Brown, and Sergey S. Shevkoplyas. Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices. *Lab on a Chip*, 12 :274–280, 2012.
- [108] Liyun Guan, Rong Cao, Junfei Tian, Heather McLiesh, Gil Garnier, and Wei Shen. A preliminary study on the stabilization of blood typing antibodies sorbed into paper. *Cellulose*, 21 :717–727, 2014.
- [109] Mohammad Al-Tamimi, Wei Shen, Rania Zeineddine, Huy Tran, and Gil Garnier. Validation of paper-based assay for rapid blood typing. *Analytical Chemistry*, 84 :1661–1668, 2012.
- [110] Mohidus Samad Khan, George Thouas, Wei Shen, Gordon Whyte, and Gil Garnier. Paper diagnostic for instantaneous blood typing. *Analytical Chemistry*, 82 :4158–4164, 2010.
- [111] Jacqueline C. Linnes, Andy Fan, Natalia M. Rodriguez, Bertrand Lemieux, Huimin Kong, and Catherine M. Klapperich. Paper-based molecular diagnostic for chlamydia trachomatis. *RSC Advances*, 4 :42245–42251, 2014.
- [112] Christopher F. Fronczek, Tu San Park, Dustin K. Harshman, Ariana M. Nicolinia, and Jeong-Yeol Yoon. Paper microfluidic extraction and direct smartphone-based identification of pathogenic nucleic acids from field and clinical samples. *RSC Advances*, 4 :11103–11110, 2014.
- [113] A. V. Govindarajan, S. Ramachandran, G. D. Vigil, P. Yager, and K. F. Bohringer. A low cost point-of-care viscous sample preparation device for molecular diagnosis in the developing world ; an example of microfluidic origami. *Lab on a Chip*, 12 :174–181, 2012.

- [114] Sharon Y. Wong, Mario Cabodi, Jason Rolland, and Catherine M. Klapperich. Evaporative concentration on a paper-based device to concentrate analytes in a biological fluid. *Analytical Chemistry*, 86 :11981–11985, 2014.
- [115] Brittany Rohrman and Richards-Kortum Rebecca. Inhibition of recombinase polymerase amplification by background dna : A lateral flow-based method for enriching target dna. *Analytical Chemistry*, 87 :1963–1967, 2015.
- [116] Pierre Aubry. Le diagnostic biologique des maladies infectieuses en zones tropicales. *Médecine Tropicale*, 2014.
- [117] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. Specific enzymatic amplification of dna in vitro : the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb SYmp Quant Biol*, 1986.
- [118] Tsugunori Notomi, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi, Toshihiro Yonekawa, Keiko Watanabe, Nobuyuki Amino, and Tetsu Hase. Loop-mediated isothermal amplification of dna. *Nucleic Acids Research*, 28(12) :63–70, 2000.
- [119] Yasuyoshi Mori, Kentaro Nagamine, Norihiro Tomita, and Tsugunori Notomi. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289 :150–154, 2001.
- [120] Nathan A. Tanner, Yinhua Zhang, and Thomas C. Evans. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using ph sensitive dyes. *BioTechniques*, 58(2) :59–68, 2015.
- [121] Xuewu Yu, Lin Shi, Xiaoping Lv, Wei Yao, Minghui Cao, Hanxun Yu, Xiurong Wang, and Shimin Zheng. Development of a real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Virology Journal*, 12 :76–93, 2015.
- [122] Allison L. Dauner, Indrani Mitra, Theron Jr. Gilliland, Sajeewane Seales, Subhamoy Pal, Shih-Chun Yang, Carolina Guevara, Jiann-Hwa Chen, Yung-Chuan Liu, Tadeusz J. Kochel, and Shuenn-Jue L. Wu. Development of a pan-serotype reverse transcription loop mediated isothermal amplification assay for the detection of dengue virus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 83(1), 2015.
- [123] Lucjan Strekowski and Beth Wilson. Noncovalent interactions with dna : An overview. *Mutation Research*, 623 :3–13, 2007.
- [124] Olaf Piepenburg, Colin H. Williams, Derek L. Stemple, and Niall A. Armes. Dna detection using recombination proteins. *PLOS Biology*, 4(7) :1115–1121, 2006.
- [125] Milena Euler, Yongjie Wang, Doris Heidenreich, Pranav Patel, Oliver Strohmeier, Sydney Hakenberg, Matthias Niedrig, Frank T. Hufert, and Manfred Weidmann. Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of bioterror agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(4) :1110–1117, 2013.
- [126] Mingjuan Yang, Yueha Ke, Xuesong Wang, Hang Ren, Wei Liu, Huijun Lu, Wenyi Zhang, Shiwei Liu, Guohui Chang, Shuguang Tian, Lihua Wang, Liuyu Huang, Chao Liu, Ruifu Yang, and Zeliang Chen. Development and evaluation of a rapid and sensitive ebv-rpa test for rapid diagnosis of ebola virus disease. *Nature Scientific Reports*, 6, 2016.

- [127] P. Craw and Wamadeva Balachandran. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics : a critical review. *Lab on a Chip*, 12 :2469–2486, 2012.
- [128] Myriam Vincent, Yan Xu, and Huimin Kong. Helicase-dependant isothermal dna amplification. *EMBO Reports*, 5 :795–800, 2004.
- [129] M.E. Gabrielle, van der Vliet, Rianne A.F. Schukkink, Bob van Gemen, Y. Schepers, and Y. Klatser. Nucleic acid sequence-based amplification (nasba) for the identification of mycobacteria. *Microbiology*, 139 :2423–2429, 1993.
- [130] Girish Nallur, Chenghua Luo, Linhua Fang, Stephanie Cooley, Varshal Dave, Jeremy Lamber, Kari Kukanskis, Stephen Kingsmore, Roger Lasken, and Barry Schweitzer. Signal amplification by rolling circle amplification on dna microarrays. *Nucleic Acids Research*, 2001.
- [131] David F. Williams. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29 :2941–2953, 2008.
- [132] Ian G. Wilson. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10) :3741–3751, 1997.
- [133] T. B. Christensen, C. M. Pedersen, K. G. Grondahl, T. G. Jensen, A. Sekulovic, D. D. Bang, and A. Wolff. Pcr biocompatibility of lab-on-a-chip and mems materials. *Journal of Micromechanics and microengineering*, 17 :1527–1532, 2007.
- [134] Rimantas Kodzius, Kang Xiao, Jinbo Wu, Xin Yid, Xiuqing Gong, Ian G. Foulds, and Weijia Wen. Inhibitory effect of common microfluidic materials on pcr outcome. *Sensors and Actuators*, 161 :349–358, 2012.
- [135] Hisatoshi Kaneko, Takashi Kawana, Eiko Fukushima, and Tatsuo Suzutani. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of Biochemistry and Biophysics, Methods*, 70 :499–501, 2007.
- [136] Antonella Ravaggi, Daniele Primi, and Elisabetta Cariani. Direct pcr amplification of hev rna from human serum. *Genome Research*, 1 :291–292, 1992.
- [137] Leo L.M. Poon, Bonnie W.Y. Wong, Edmund H.T. Ma, Kwok H. Chan, Larry M.C. Chow, Wimal Abeyewickreme, Noppadon Tangpukdee, Kwok Y. Yuen, Yi Guan, Sornchai Looareesuwan, and J.S. Malik Peiris. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria : Detecting plasmodium falciparum dna directly from heat treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clinical Chemistry*, 52(2) :303–306, 2006.
- [138] Boon-Teong Teoh, Sing-Sin Sam, Kim-Kee Tan, Mohammed Bashar Danlami, Meng-Hooi Shu, Jefree Johari, Poh-Sim Hooi, David Brooks, Olaf Piepenburg, Oliver Nentwich, Annelies Wilder-Smith, Leticia Franco, Antonio Tenorio, and Sazaly AbuBakar. Early detection of the dengue virus using reverse transcription-recombinase polymerase amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(3) :830–859, 2015.
- [139] Allison J. Lopatkin and Lingchong You. Synthetic biology looks good on paper. *Cell*, 159 :717–719, 2014.
- [140] Christof M. Niemeyer, Michael Adler, and Ron Wacker. Immuno-pcr : high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *TRENDS in Biotechnology*, 23(5) :208–216, 2005.

- [141] Jered Singleton, Jennifer L. Osborn, Lorraine Lillis, Kenneth Hawkins, Dylan Guelig, Will Price, Rachel Johns, Kelly Ebels, David Boyle, Bernhard Weigl, and LaBarre Paul. Electricity-free amplification and detection for molecular point-of-care diagnosis of hiv-1. *PLOS One*, 9(11), 2014.
- [142] Brittany A. Rohrman, Veronica Leautaud, Elizabeth Molyneux, and Rebecca R. Richards-Kortum. A lateral flow assay for quantitative detection of amplified hiv-1 rna. *PLOS One*, 7(9), 2012.
- [143] Ana Catarina Araujo, Yajing Sonj, Joakim Lundeberg, Patrik L. Stahl, and Harry Brumer. Activated paper surfaces for the rapid hybridization of dna through capillary transport. *Analytical Chemistry*, 84 :3311–3317, 2012.
- [144] Yajing Song, Peter Gyarmati, Ana Catarina Araujo, Joakim Lundeberg, Harry Brumer, and Patrik L. Stahl. Visual detection of DNA on paper chips. *Analytical Chemistry*, 2014.
- [145] Umit Hakan Yildiz, Palaniappan Alagappan, and Bo Liedberg. Naked eye detection of lung cancer associated mirna by paper based biosensing platform. *Analytical Chemistry*, 85 :820–824, 2013.
- [146] Emanuel Carrilho, Scott T. Phillips, Sarah J. Vella, Andres W. Martinez, and George M. Whitesides. Paper microzone plates. *Analytical Chemistry*, 81 :5990–5998, 2009.
- [147] Shih-Jie Lo, Shih-Chun Yang, Da-Jeng Yao, Jiann-Hwa Chen, Wu-Chun Tuc, and Chao-Min Cheng. Molecular-level dengue fever diagnostic devices made out of paper. *Lab on a Chip*, 13 :2686–2693, 2013.
- [148] Shih-Jie Lo, Shih-Chun Yang, Da-Jeng Yao, Jiann-Hwa Chen, and Chao-Min Cheng. Molecular-level dengue fever diagnostics developing a combination of rt-lamp and paper-based devices. *IEEE Nanotechnology Magazine*, 12 :26–30, 2012.
- [149] Karen Scida, Bingling Li, Andrew D. Ellington, and Richard M. Crooks. Dna detection using origami paper analytical devices. *Analytical Chemistry*, 85 :9713–9720, 2013.
- [150] Sharmili Roy, Ibrahim Abd Rahman, and Minhaz Uddin Ahmed. Paper-based rapid detection of pork and chicken using lamp–magnetic bead aggregates. *Analytical Methods*, 8 :2391–2400, 2016.
- [151] Xiaofeng Wei, Tian Tian, Shasha Jia, Zhi Zhu, Yanli Ma, Jianjun Sun, Zhenyu Lin, and Chaoyong James Yang. Target-responsive dna hydrogel mediated “stop-flow” microfluidic paper-based analytic device for rapid, portable and visual detection of multiple targets. *Analytical Chemistry*, 87 :4275–4282, 2015.
- [152] M. Monsur Ali, Sergio D. Aguirre, Yaqin Xu, Carlos D. M. Filipe, Robert Pelton, and Yingfu Li. Detection of dna using bioactive paper strips. *Chemical Communication*, 43 :6640–6642, 2009.
- [153] Keith Pardee, Alexander A. Green, Tom Ferrante, D. Ewen Cameron, Ajay DaleyKeyser, Peng Yin, and James J. Collins. Paper-based synthetic gene networks. *Cell*, 2014.
- [154] John T. Connelly, Jason P. Rolland, and George M. Whitesides. “paper machine” for molecular diagnostics. *Analytical Chemistry*, 87 :7595–7601, 2015.
- [155] J. C. Linnes, N. M. Rodriguez, L. Liu, and C. M. Klapperich. Polyethersulfone improves isothermal nucleic acid amplification compared to current paper-based diagnostics. *Biomed Microdevices*, 2 :18–30, 2016.



- [156] Brittany A. Rohrman and Rebecca R. Richards-Kortum. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of hiv dna. *Lab on a Chip*, 12(7) :3082–3096, 2012.
- [157] Michael S. Cordray and Rebecca R. Richards-Kortum. A paper and plastic device for the combined isothermal amplification and lateral flow detection of plasmodium dna. *Malaria Journal*, 14(1) :472–480, 2015.
- [158] Natalia M. Rodriguez, Winnie S. Wong, Lena Liu, Rajan Dewar, and Catherine M. Klapperich. A fully integrated paperfluidic molecular diagnostic chip for the extraction, amplification, and detection of nucleic acids from clinical samples. *Lab on a Chip*, 16(4) :753–763, 2016.
- [159] Jane Ru Choi, Jie Hu, Yan Gong, Shangsheng Feng, Wan Abu Bakar Wan Abas, Belinda Pingguan-Murphy, and Feng Xu. An integrated lateral flow assay for effective dna amplification and detection at the point of care. *Analyst*, 141 :2930–2939, 2016.
- [160] Thomas Cubaud and Thomas G. Mason. Capillary threads and viscous droplets in square microchannels. *Physics of Fluids*, 20(5) :3302–3311, 2008.
- [161] Piotr Garstecki, Michael J. Fuerstman, Howard A. Stone, and George M. Whitesides. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic t-junction scaling and mechanism of break-up. *Lab on a Chip*, 6 :437–446, 2006.
- [162] David S. Boyle, Dara A. Lehman, Lorraine Lillis, Dylan Peterson, Mitra Singhal, Niall Armes, Mathew Parker, Olaf Piepenburg, and Julie Overbaugh. Rapid detection of hiv-1 proviral dna for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification. *American Society for Microbiology*, 4, 2013.
- [163] S.K. Gire, A. Goba, K.G. Andersen, R.S. Sealfon, D.J. Park, L. Kanneh, S. Jalloh, M. Momoh, M. Fullah, G. Dudas, S. Wohl, L.M. Moses, N.L. Yozwiak, S. Winnicki, C.B. Maltranga, C.M. Malboeuf, J. Qu, A.D. Gladden, S.F. Schaffner, X. Yang, P.P. Jiang, M. Nekoui, A. Colubri, M.R. Coomber, M. Foonie, A. Moigboi, M. Gbakie, F.K. Kamara, V. Tucker, E. Konuwa, S. Saffa, J. Sellu, A.A. Jalloh, A. Kovoma, J. Koninga, I. Mustapha, K. Kargbo, M. Foday, M. Yillah, F. Kanneh, W. Robert, J.L. Massally, S.B. Chapman, J. Bochicchio, C. Murfphy, C. Nusbaum, S. Young, B.W. Birren, Grand D.S., J.S. Scheiffelin, E.S. Lander, C. Happi, S.M. Gevao, A. Gnirke, A. Rambaut, R.F. Garry, Khan S.H., and P.C. Sabeti. Genomic surveillance elucidates ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*, 345(6202) :1369–1372, 2014.
- [164] Ahmed Abd El Wahed, Pranav Patel, Oumar Faye, Sasikanya Thaloengsok, Doris Heidenreich, Ponpan Matangkasombut, Khajohnpong Manopwisedjaroen, Anavaj Sakuntabhai, Amadou A. Sall, Frank T. Hufert, and Manfred Weidmann. Recombinase polymerase amplification assay for rapid diagnostics of dengue infection. *PLOS One*, 10(6) :1371–1388, 2015.
- [165] Ashok A. Kumar, Jonathan W. Hennek, Barbara S. Smith, Shailendra Kumar, Patrick Beattie, Sidhartha Jain, Jason P. Rolland, Thomas P. Stossel, Catherine Chunda-Liyoka, and George M. Whitesides. From the bench to the field in low-cost diagnostics : Two case studies. *Angewandte Chemie*, 54 :5836–5653, 2015.

- 
- [166] The TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases : general principles. *Nature Reviews*, pages 17–29, 2010.
- [167] P.M. Bossuyt, J.B. Reitsma, D.E. Bruns, C.A. Gatsonis, P.P. Glasziou, L. Irwig, J.G. Lijmer, D. Moher, D. Rennie, H.C.W. de Vet, H.Y. Kressel, N. Rifai, R.M. Golub, D.G. Altman, L. Hooft, D.A. Korevaar, and J.F. Cohen. Stard 2015 : An updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *Clinical Chemistry*, 2015.