



HAL
open science

Développement d'une technologie fluïdique pour la purification et le fractionnement en taille d'échantillons d'ADN à l'échelle du millilitre par migration électro-hydrodynamique

Paul Bruand

► **To cite this version:**

Paul Bruand. Développement d'une technologie fluïdique pour la purification et le fractionnement en taille d'échantillons d'ADN à l'échelle du millilitre par migration électro-hydrodynamique. Biologie moléculaire. INSA de Toulouse, 2023. Français. NNT : 2023ISAT0009 . tel-04164885

HAL Id: tel-04164885

<https://theses.hal.science/tel-04164885>

Submitted on 18 Jul 2023

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

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de
Toulouse

Présentée et soutenue par
PAUL BRUAND

Le 24 janvier 2023

**Développement d'une technologie fluïdique pour la purification et
le fractionnement en taille d'échantillons d'ADN à l'échelle du
millilitre par migration électro-hydrodynamique**

Ecole doctorale : **GEETS - Génie Electrique Electronique, Télécommunications et
Santé : du système au nanosystème**

Spécialité : **MicroNano Systèmes**

Unité de recherche :

LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Thèse dirigée par

Pierre JOSEPH et Aurélien BANCAUD

Jury

M. Yannick COFFINIER, Rapporteur
M. Jean-Christophe GALAS, Rapporteur
M. Thomas ALAVA, Examineur
M. Pierre JOSEPH, Directeur de thèse
M. Aurélien BANCAUD, Co-directeur de thèse
Mme Laurence SALOME, Présidente
M. Frédéric GINOT, Invité

Résumé

La préparation d'un échantillon d'ADN est une étape obligatoire de sa chaîne analytique. Réalisée concomitamment ou postérieurement à l'extraction d'ADN de l'organisme ciblé, la préparation inclut une étape de concentration voire de fractionnement en fonction de la taille des chaînes d'ADN. Les outils de préparation d'ADN sont le plus souvent fondés sur des colonnes de silice et quelques fois aussi l'électrophorèse sur gel. Ils sont laborieux en temps de main d'œuvre et leur rendement pas toujours au rendez-vous. Ces considérations sont particulièrement critiques pour la préparation de l'ADN circulant dans le sang, un biomarqueur prometteur, car il est très dilué, présentant des tailles variées de petits fragments de 100 pb (paires de bases) à plus de 2 kpb et dissous dans des fluides biologiques complexes avec des sels et des protéines. Nous avons investigué le potentiel de la technologie μ LAS pour la préparation d'ADN. Fondée sur la migration d'ADN dans un fluide viscoélastique et sous écoulement électro-hydrodynamique, elle permet d'analyser des solutions complexes avec des sensibilités au fg/ μ L. Cela dit, son débit actuel de quelque μ L/min n'est pas adapté à la préparation d'ADN. Aussi, nous avons parallélisé μ LAS avec une membrane isopore intégrée à un système macrométrique imprimé en 3D pour atteindre des performances adaptées à la purification à travers des centaines de milliers de canaux microfluidiques en simultané. Nous avons réalisé le traitement haut débit (300 μ L/min) de quelques mL d'ADN dans une gamme de taille comprise entre 200 paires de bases (pb) et 50 kpb, avec une concentration jusqu'à 10 fois et la purification des sels. Le procédé, d'une durée inférieure à dix minutes, présente également l'avantage de fonctionner à faibles amplitudes d'actionnement : une pression inférieure à 2 bar et une tension inférieure à 50 V rendant cette technologie facilement accessible. Pour terminer, nous discutons le potentiel de notre technologie pour la préparation d'échantillons pour leur caractérisation par séquençage.

Abstract

Prior to their analysis, crude DNA samples have to be processed through consecutive steps of purification, concentration, and size selection. These steps generally involve a number of time-consuming and low-yield tools, which are most often based on affinity columns and/or fractioning by gel electrophoresis. The fraction of DNA circulating in the blood is considered to be a promising biomarker, but its preparation is suffering from many of the aforementioned pitfalls because it is highly diluted, distributed in size (between 100 and 2000 base pairs (bp)), and solubilized in complex biofluids with salts and proteins. The μ LAS technology, which consists in conveying DNA molecules in electrohydrodynamic viscoelastic flows, has shown a great potential for DNA analysis with a sensitivity of 1 fg/ μ L. It is however limited in throughput because its analytical flow rate is 1 μ L/min. In this PhD, we aimed at intensifying the potential of μ LAS for purification by parallelizing this technology. For this, we used a format based on an isoporous membrane integrated within a 3D printed macrometric system, which offers a platform to operate hundreds of thousands of channels simultaneously. We report a high throughput associated to a flow rate of 300 μ L/min, and demonstrate efficient processing of a few mL of solution in the range of 200 bp to 50 kbp, with a concentration of up to 10 times, a size accordable DNA size selection threshold, and the purification of salts in a process of less than ten minutes. It also has the advantage to be functional at low amplitudes of actuation: a pressure lower than 2 bar and a voltage lower than 50 V making it easily accessible. Finally, we discuss its application potential for the preparation of sequencing samples.

Remerciements

Dans un premier temps, je remercie les rapporteurs et membres du jury, pour les échanges constructifs qui ont suivi ma soutenance.

Cette thèse n'a pu être réalisée que grâce au formidable environnement de travail qui m'a été offert au LAAS. Outre l'équipement, je dois beaucoup au collectif, que ce soit le personnel des différentes plateformes, mon équipe de recherche ou d'autres équipes : ce sont des chercheur.ses, post-docs, doctorant.e.s, ingénieur.e.s, technicien.nes et stagiaires, qui m'ont tous.tes permis de faire avancer ce projet et me donner goût à la recherche.

Ce projet de thèse n'aurait jamais vu le jour sans mes directeurs de thèse, Aurélien Bancaud et Pierre Joseph. L'organisation périodique de points d'avancement, avec l'implication forte également de Frédéric Ginot, directeur technologique à Adélis, m'a permis d'avancer avec de bons conseils et beaucoup de bienveillance. Je vous remercie tous les trois pour votre grande disponibilité. Pierre, tu as su être particulièrement présent pour moi au démarrage de cette thèse afin que je trouve mes marques, mais tu as également continué à m'offrir tes conseils et remarques tout au long du travail et je t'en remercie. Aurélien, je te dois beaucoup, à la fois professionnellement et humainement. Alors que tu étais à Tokyo, à plus de 10 000 km et 7/8h de décalage horaire pendant près de trois ans, tu as su être disponible pour moi à tout moment. J'ai aimé ta démarche scientifique, et ta manière d'aborder les problèmes avec un grand optimisme. Ton séjour au Japon ne m'aura pas été inutile, car il m'a permis d'obtenir une bourse JSPS pour y passer deux mois. En plus de m'avoir offert, dès mon arrivée, la chance de surfer (en tout cas tenter de surfer) les vagues d'Eno-shima, avec un Fuji-san qui se laissait par moment découvrir derrière les nuages, cette expérience au Japon m'a permis de trouver une opportunité d'après-thèse, avec une bourse JSPS post-doc ! Tout cela n'aurait pas été possible sans toi. Au-delà de la science, j'ai beaucoup apprécié nos discussions variées sur l'actualité, nos échanges d'articles de presse et de politique, et j'espère que nous continuerons toujours à en débattre ! Je ne saurai jamais assez te remercier pour ton encadrement. おつかれさまです！

S'il y a également une grande personne à remercier pour son immense contribution au projet, c'est Inga Tijnelyte. Grâce à ton expérience de post-doc, et ton formidable esprit pratique, j'ai énormément appris à tes côtés. Je dois souligner que c'est en partie grâce à un grand nombre de tes expériences, à coup de milliers d'analyses Qubit, que ce manuscrit de thèse a pu être écrit. J'ai pris énormément de plaisir à travailler au quotidien en tandem avec toi, et refaire le monde en pause clope, avec ton français qui fait toute ta singularité ! Je te remercie du fond du cœur.

Je dois également un immense merci à toute l'équipe d'Adélis. Mon séjour de quelques mois en entreprise, juste après le confinement du covid, ainsi que mes allées et venues, matin et soir, pour passer mes analyses de CE m'ont non seulement permis de muscler mes cuisses de cycliste, mais aussi de profiter de votre bonne humeur ! En particulier, je remercie Audrey Boutonnet, pour tes conseils avisés et ton expertise que j'admire. Arnaud Morin, merci également pour ta disponibilité indéfectible, pour résoudre les problèmes que rencontrait notre vieille CE. Je n'oublie pas non plus le rire de Mathilde Roig, ni celui d'Estelle N'Tsiba ; l'humour pince-sans-rire de Jacques Fabre, la gentillesse de Marion Mano, Marion Kreczman et Mohamed El Khaldi. Je remercie aussi My Dung Hau, pour m'avoir soutenu avec Audrey lors de la conférence MSB à Liège en 2022 ! Je n'oublie pas non plus Nicolas Milon, qui a été mon mentor et intermédiaire entre l'entreprise et le laboratoire, d'abord en stage puis en début de thèse.

Pour poursuivre la contribution scientifique, je tiens à remercier l'unité GeT-PlaGe (INRAE), avec Adrien Castinel et Carole Lampietro, pour leur collaboration dans le projet, leur aide apportée quant à son orientation, et les échantillons qu'ils nous ont fournis. Au sein du LAAS, je dois aussi remercier la plateforme de caractérisation, avec Charline Blatché et Sandrine Assié-Souleille. Si la salle d'expérimentation C211 peut continuer à tourner, c'est grâce à vous deux. Je remercie également David Bourrier pour sa contribution dans la fabrication d'électrodes de Nickel en salle blanche, et Julie Foncy pour la gestion du MultiFab. J'ai également eu la chance au cours de cette thèse d'encadrer deux stagiaires, Séléna Pondard et Lucie Burc, que je remercie chaleureusement pour leurs sérieuses implications.

L'équipe MILE, assurément la meilleure du LAAS, a su m'intégrer de la meilleure des manières ! A mes débuts en stage, ce sont Bayan Chami et Jeffrey Teillet, en thèse à cette époque, qui m'ont initié à la technologie μ LAS. En plus de LabVIEW, Jef', tu as su développer mes techniques de pongiste en tuant le temps de ces soirées à jouer au sous-sol en début de thèse ! Merci aussi pour ces aventureuses parties de jeux de rôle. Au bureau A9a, je n'oublie pas Marion Valette, qui m'a légué son formidable bureau, ni Lyne Pillemont face à moi, qui a su me supporter même le vendredi alors que je criais à Lyne pour qu'elle revienne. Pour rester sur les anciens partis trop tôt, je dois citer Zack Ben Meriem et son ventre le plus confortable à câliner. Je remercie également Morgan Delarue pour sa forte implication dans les instances du LAAS afin de le rendre meilleur. Lucie Albert, cela fait depuis les bancs de l'INSA que l'on se suit : même école, même équipe et même démarrage de thèse, ce qui nous a permis de nous soutenir mutuellement. Baptiste Alric, tu as été un vrai pilier (je pèse mes mots) dans cette équipe ! Savoir que je vais continuer à t'entendre ronchonner, mais cette fois durant ton post-doc à Tokyo à mes côtés, me remplit d'une joie aussi immense que toi ! Sylvain Landiech, je sais que tu attends beaucoup de ces lignes et que tu les liras avec attention. J'admire beaucoup ton grand esprit scientifique et critique, et je n'ai aucun doute sur le fait que tu iras loin ! L'ambiance au travail et en soirée n'aurait pas été la même sans ta bonne humeur et ton militantisme. Merci pour tout. Tiphaine Mateo et Lucas Charpin, j'ai adoré nos randonnées pyrénéennes qui m'ont permis de prendre un grand bol d'air frais et sortir de la routine. Ces sorties me manqueront sans aucun doute. Merci aussi de m'avoir initié à l'escalade même si j'ai perdu de mes capacités pendant la rédaction ! Mohammad Baz, je sais que nous étions le plus souvent en désaccord sur les sujets de société, mais tu avais l'intelligence d'en débattre hardiment. La relève des doctorants est bien assurée et c'est même avec une pointe de regret que je quitte le LAAS avant d'avoir pu davantage vous connaître Jules Edwards, Hyojun Kim, Pierre Lapeze. Jules, j'espère que nos chemins se recroiseront dans les karaokés tokyoïtes ! Merci également à Céline Denais pour nos discussions nocturnes en C211 sur l'expatriation et la recherche à l'étranger. Merci également aux autres membres de l'équipe MILE ou partenaires que j'ai pu croiser : Anne-Marie Gue, Julien Faccini, Olivier Liot, Tércence Desclaux et Laure Le Blanc.

Toujours au LAAS, mais hors de l'équipe MILE, mes trois années de thèse m'ont permis de rencontrer de fidèles ami.e.s. Inès Muguet, je ne peux que commencer par toi ! Qui aurait cru qu'une journée de formation « conduire son projet doctoral » permettait de faire de si belles rencontres ? Merci d'avoir embelli mes manips en zone électrochimie, tes partages musicaux et nos nombreux fous rires. Je n'oublierai pas nos duos musicaux ni nos macarons ratés. Matthieu Sagot et Emilie Belot, vous êtes aussi bien sûr dans le lot : merci pour le Mad Cool à Madrid, nos escapades dans les Landes et toutes ces parties interminables de Paléo ou d'Iki. Merci également à Alexiane Larroche et Luca Bettamin, pour le roulement de soirées fromagères afin de passer l'hiver ! Ianis Drobecq, merci pour tous tes conseils en impression 3D, et ces beaux cadeaux imprimés pour ma thèse. J'admire beaucoup ta vivacité d'esprit qui fera de toi un excellent doctorant. Merci aussi pour ton dynamisme et ton sourire au quotidien ! Merci Benjamin Cerdan pour tes belles soirées karaokés également, Ophélie Thomas-

Chemin pour ta présence indéfectible en soirée ! Merci aussi à Bastien Venzac, Aziliz Lecomte pour leurs conseils de post-doc.

« Mens sana in corpore sano », et ceci sera ma seule citation de thèse ! Merci à toute l'équipe du rugby, en particulier Olivia Peytral-Rieu, Valentin Saunier, Jérôme Riondet et Gaël Loubet pour tous ces entraînements dans la bonne humeur. Je prie pour que le club perdure encore.

Les personnes qui m'ont entouré hors du laboratoire ont aussi été d'une importance capitale. Je me dois de remercier Marion Giraud pour avoir su être une incroyable coloc durant l'intégralité de ma thèse. Avec Julie Trinel, et souvent accompagnées de Laure Giraud, vous avez été présentes pour moi dans le pic de la rédaction, pour me soutenir, me nourrir, et me détendre avec un fond de piano ! Je garderai de beaux souvenirs nostalgiques de la maison du bonheur... Merci aussi à Paul Dalla Valle et Ella Bregazzi. Ce n'était pas facile du tout de démarrer une thèse avec le grand confinement covid de 2020, mais vous avez été là, pour améliorer mon hygiène de vie (yoga à 7 h, Shaun T, insanity et pilates à 17 h sans faute !) et m'éviter de perdre la boule ! Notre cohabitation restera mémorable. Enfin merci à Félix Gayot, pour m'avoir souvent invité à prendre l'air alpin, en vacances comme en rédaction. Même à distance, ton accompagnement tout au long de la thèse m'a été indispensable.

Bien sûr, je dois conclure cette partie en remerciant ma famille, venue nombreuse à ma thèse. Un merci particulier à ma sœur que j'admire tant, et à mes parents, toujours présents.

Table des matières

| | |
|--|------------------|
| <u>Introduction.....</u> | <u>1</u> |
| Contexte | 1 |
| Organisation du manuscrit..... | 2 |
| <u>1. Le préparatif d'échantillons d'ADN.....</u> | <u>3</u> |
| 1.1. Techniques de préparation d'un échantillon d'ADN | 4 |
| 1.1.1. Généralités sur l'ADN..... | 4 |
| 1.1.2. L'extraction et la purification d'ADN..... | 5 |
| 1.1.2.1 Gradient CsCl/EtBr..... | 5 |
| 1.1.2.2 Phase liquide | 6 |
| 1.1.2.3 Phase solide..... | 7 |
| 1.1.2.4 Bilan sur les méthodes d'extraction | 9 |
| 1.1.3. Sélection en taille d'ADN | 10 |
| 1.1.3.1 Généralités sur la physique de l'ADN en solution libre | 10 |
| 1.1.3.2 L'électrophorèse d'ADN en solution libre | 11 |
| 1.1.3.3 L'électrophorèse d'ADN sur gel..... | 11 |
| 1.1.3.4 Sélectivité en taille par phase solide | 13 |
| 1.1.3.5 Chromatographie d'exclusion et membranes d'ultrafiltration | 15 |
| 1.1.3.6 Récapitulatif des méthodes de séparation en taille | 16 |
| 1.2. Besoins en préparatif pour le séquençage | 17 |
| 1.2.1. Première génération, Sanger | 17 |
| 1.2.2. Deuxième génération, NGS..... | 18 |
| 1.2.3. Troisième génération, TGS..... | 19 |
| 1.2.4. Préparation d'échantillon pour le séquençage | 21 |
| 1.3. Le préparatif pour la biopsie liquide : le défi de l'ADN circulant..... | 23 |
| 1.3.1. Historique de l'ADN circulant..... | 23 |
| 1.3.2. L'étude de l'ADN circulant dans le diagnostic clinique de cancer | 24 |
| 1.3.3. Mécanisme de libération de l'ADN circulant | 24 |
| 1.3.4. L'ADN circulant tumoral..... | 25 |
| 1.3.5. Concentrations et proportions des ADN circulants | 25 |
| 1.3.6. Structure et taille de l'ADN circulant | 25 |
| 1.3.7. Bilan sur l'ADN circulant et les besoins en préparatif..... | 26 |
| 1.4. Conclusion du Chapitre 1 | 28 |
| <u>2. La technologie μLAS pour la concentration et la sélection en taille d'ADN.....</u> | <u>29</u> |
| 2.1. Introduction sur la technologie μLAS..... | 30 |
| 2.2. Migration transverse en microfluidique pour la séparation en taille..... | 30 |
| 2.2.1. Généralités, fluides Newtonien et viscoélastiques | 30 |
| 2.2.2. Régime des écoulements | 32 |
| 2.2.3. Migration transverse sous cisaillement hydrodynamique..... | 32 |
| 2.2.4. Migration transverse sous cisaillement hydrodynamique et champ électrique | 35 |
| 2.2.4.1 Cas du fluide Newtonien sous l'action d'un champ électrique | 35 |
| 2.2.4.2 Régime viscoélastique sous l'action d'un champ électrique | 36 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.3. | La technologie μLAS | 38 |
| 2.3.1. | μ LAS sur puce microfluidique | 38 |
| 2.3.2. | μ LAS sur capillaire : BIABooster | 40 |
| 2.4. | Vers un format adapté pour le préparatif | 43 |
| 2.4.1. | Performances du BIABooster en préparatif..... | 43 |
| 2.4.2. | Saturation du BIABooster et système multicapillaire | 44 |
| 2.4.3. | Parallélisation par membrane isopore..... | 45 |
| 3. | <u>Matériels et méthodes : μLAP pour le préparatif d'ADN</u> | 47 |
| 3.1. | Membranes isopores | 48 |
| 3.2. | Dispositif par impression 3D | 49 |
| 3.2.1. | Principe de fonctionnement de l'impression 3D par stéréolithographie | 49 |
| 3.2.2. | Conception par ordinateur | 50 |
| 3.2.3. | Imprimante, résine et choix dédiés à cette technologie..... | 50 |
| 3.3. | Electrodes | 51 |
| 3.3.1. | Matériau et procédé de fabrication d'électrodes..... | 51 |
| 3.3.2. | Corrosion des électrodes | 51 |
| 3.3.3. | Intégration des électrodes et géométrie finale | 52 |
| 3.4. | Solutions tampons | 53 |
| 3.5. | Présentation globale du design et montage | 53 |
| 3.5.1. | Design final | 53 |
| 3.5.2. | Montage d'expérience..... | 54 |
| 3.6. | Puce xurographique | 56 |
| 4. | <u>Caractérisation de la technologie μLAP</u> | 57 |
| 4.1. | Modélisation électrique et hydrodynamique | 58 |
| 4.1.1. | Modèle équivalent | 58 |
| 4.1.2. | Analyse du modèle électrique | 58 |
| 4.1.2.1 | Géométrie des électrodes | 58 |
| 4.1.2.2 | Résistances et champs électriques | 60 |
| 4.1.2.3 | Calcul numérique électrique | 61 |
| 4.1.3. | Analyse du modèle hydrodynamique | 62 |
| 4.1.3.1 | Résistance hydraulique et débit | 62 |
| 4.1.3.2 | Calcul numérique hydraulique | 62 |
| 4.1.3.3 | Régime d'écoulement..... | 63 |
| 4.1.4. | Evaluation expérimentale des conditions au sein du système | 63 |
| 4.2. | Electrochimie et formation de bulles | 65 |
| 4.2.1. | Electrolyse de l'eau | 65 |
| 4.2.2. | Formation de bulles | 65 |
| 4.2.3. | Variation de pH | 67 |
| 4.2.4. | Comportement électrochimique et surtension | 68 |
| 4.3. | Echauffement | 70 |
| 4.3.1. | Puissance dissipée et élévation de température | 70 |
| 4.3.2. | Effets de la température sur les propriétés du fluide | 71 |
| 4.3.3. | Mesures d'élévation de température | 72 |
| 4.3.4. | Canal de refroidissement | 72 |
| 4.3.5. | Simulation des effets thermiques du refroidissement | 74 |

| | | |
|-------------|--|-------------------|
| 4.4. | Eléments de design du dispositif μLAP..... | 75 |
| 4.4.1. | Structure fractale | 75 |
| 4.4.2. | Anciens designs..... | 77 |
| 4.4.3. | Evolution des designs..... | 77 |
| 4.4.4. | Evacuation des bulles..... | 77 |
| 4.4.5. | Système vertical bas-haut..... | 78 |
| 4.5. | Conclusion du chapitre 4..... | 79 |
| 5. | <u>Performances du système μLAP.....</u> | <u>81</u> |
| 5.1. | Optimisation de la concentration d'ADN | 82 |
| 5.1.1. | Concentration en flux continu | 82 |
| 5.1.2. | Concentration avec rinçage | 82 |
| 5.1.3. | Prélèvement et mesures de concentration | 83 |
| 5.1.4. | Profil de concentration d'ADN | 84 |
| 5.1.5. | Affinement du pic d'enrichissement..... | 85 |
| 5.1.6. | Observation de la concentration à la membrane | 88 |
| 5.2. | Phénomène de fuite d'ADN..... | 89 |
| 5.2.1. | Considération générale sur la fuite..... | 89 |
| 5.2.2. | Etude du plaquage d'ADN en fonction de la longueur de canal | 89 |
| 5.2.3. | Conclusion sur les fuites | 92 |
| 5.3. | Optimisation de la sélection en taille..... | 93 |
| 5.3.1. | Principe de sélection en taille | 93 |
| 5.3.2. | Méthode de caractérisation sur BIABooster..... | 93 |
| 5.3.3. | Contrôle du cut-off | 95 |
| 5.4. | Réduction des pertes d'ADN | 96 |
| 5.4.1. | Caractérisation de la perte | 96 |
| 5.4.2. | Influence du tampon..... | 97 |
| 5.4.3. | Influence de la géométrie d'électrode..... | 100 |
| 5.4.4. | Contournement de l'anode..... | 102 |
| 5.4.5. | Caractérisation en taille de la perte d'ADN | 102 |
| 5.4.6. | Conclusion sur les pertes d'ADN | 104 |
| 5.5. | Concentration d'ADN de haut poids moléculaire | 105 |
| 5.5.1. | Généralités et objectifs sur la concentration d'ADN de haut poids moléculaire..... | 105 |
| 5.5.2. | Concentration d'ADN lambda (48 kb)..... | 105 |
| 5.5.3. | Concentration d'ADN T4 (172 kb)..... | 106 |
| 5.5.4. | Analyse qualité des échantillons d'ADN lambda et T4 | 107 |
| 5.5.5. | Conclusion sur la concentration d'ADN de haut poids moléculaire | 108 |
| 5.6. | Les défis de la concentration d'ADN de bas poids moléculaire..... | 109 |
| 5.6.1. | Comparaison des performances à différentes tailles | 109 |
| 5.6.2. | Influence du temps d'expérience sur la concentration | 109 |
| 5.7. | Conclusion du chapitre 5..... | 111 |
| 6. | <u>Applications du système μLAP.....</u> | <u>113</u> |
| 6.1. | Vers une application sur échantillons complexes | 114 |
| 6.1.1. | Performances sur solutions salées..... | 114 |
| 6.1.1.1 | Concentration et fractionnement en taille sur solution salée..... | 114 |
| 6.1.1.2 | Purification des sels | 115 |
| 6.1.2. | Etude sur plasma sanguin | 116 |

| | | |
|--|---|-------------------|
| 6.1.2.1 | Constituants du plasma sanguin et remarques préliminaires | 116 |
| 6.1.2.2 | Caractérisation MEB du bouchage | 116 |
| 6.1.2.3 | Conclusion sur expériences avec protéines..... | 118 |
| 6.2. | Préparation pour le séquençage de 2^{ème} génération (NGS) | 119 |
| 6.2.1. | Cadre de l'étude et objectif | 119 |
| 6.2.2. | Protocole..... | 119 |
| 6.2.3. | Résultats de la sélection en taille..... | 121 |
| 6.2.4. | Discussion et comparaison à une purification par billes..... | 121 |
| 6.2.5. | Vérification de la sélection en taille avec ladder | 122 |
| <u>Conclusion et perspectives</u> | | <u>124</u> |
| Principaux résultats | | 124 |
| Perspectives | | 125 |
| <u>Références.....</u> | | <u>129</u> |
| <u>Table des figures.....</u> | | <u>146</u> |
| <u>Liste des tableaux</u> | | <u>149</u> |
| <u>Annexes.....</u> | | <u>150</u> |
| Annexe A | Face avant du programme LabVIEW de contrôle d'expérience | 151 |
| Annexe B | Estimation de la variation du pH par l'électrolyse de l'eau | 154 |
| Annexe C | Dispositif vertical de 1 ^{ère} génération..... | 156 |
| Annexe D | Plans des éléments de μ LAP (dernière version)..... | 157 |
| Annexe E | Séquences d'analyse BIABooster et calcul précis de rendement..... | 159 |

Introduction

Contexte

Depuis la découverte de la structure en double hélice de l'ADN par James Watson et Francis Crick en 1953¹, l'étude de l'ADN n'a cessé de se développer : étude structurale, synthèse d'ADN (1958), puis la génétique à travers un projet international de grande envergure, the Human Genome Project, débuté dans les années 90, et d'une durée de 15 ans pour parvenir à déterminer à 90% la séquence du génome humain en 2000². L'amélioration considérable des techniques de séquençage, notamment la lecture des régions répétées, a conduit à l'aboutissement du séquençage complet de notre génome en 2022³. Elle s'est également accompagnée d'une réduction drastique des coûts, passant de 70 millions de dollars en 2007 à moins de 2000 dollars de nos jours pour un séquençage de génome humain⁴ permettant ainsi le développement de nombreux domaines de la biologie : médecine, biologie moléculaire, biologie évolutive, médecine légale, etc.

Le séquençage est de nos jours partagé entre des techniques dites de NGS (Next Generation Sequencing) très efficaces et robustes grâce à une parallélisation massive du séquençage de petits fragments d'ADN, et des techniques dites de 3^{ème} génération qui se fondent sur la lecture de longs fragments d'ADN. Que ce soit pour l'une ou l'autre de ces techniques, l'échantillon d'ADN doit préalablement subir des étapes de préparation. Ces étapes incluent généralement l'extraction et la purification de l'ADN à partir d'un échantillon biologique. La purification d'un échantillon est à l'heure actuelle essentiellement effectuée à l'aide de kits de purifications à base de billes magnétiques. Cette méthode rapide possède cependant certains inconvénients, comme un faible rendement ainsi qu'une faible précision dans la purification en taille de l'échantillon, qui est une étape importante pour l'amélioration de l'efficacité de séquençage. Cette thèse vise à développer une technologie capable de subvenir à ces besoins avec une méthode rapide de concentration et purification d'ADN selon sa taille, applicable à différentes tailles de fragments d'ADN.

Parallèlement à l'application au séquençage, le développement de cette technologie s'est également orienté vers la préparation d'ADN en biopsie liquide⁵, avec la concentration et la purification d'ADN très dilué et circulant dans le plasma sanguin. La recherche oncologique autour de l'ADN circulant, en rapide expansion depuis le milieu des années 90⁶, montre que sa concentration est plus importante chez des patients atteints de certains cancers (sein⁷, prostate⁸, poumon⁹, entre autres) ouvrant ainsi la porte au diagnostic précoce, c'est-à-dire la détection, et au pronostic, donc à la prédiction de l'évolution de la maladie, et au suivi. Préalablement à son étude, l'échantillon sanguin doit être préparé par la concentration d'ADN issu d'un grand volume. Pour le moment effectué majoritairement avec des kits de colonne de silice, avec de faibles rendements, nous verrons comment notre technologie pourrait être appliquée également dans cette optique.

La technique de concentration et sélection en taille d'ADN, développée au cours de cette thèse, s'appuie sur la technologie μ LAS (micro-Laboratoire pour l'Analyse et la Séparation), dont les premiers travaux menés par Aurélien Bancaud et Hubert Ranchon¹⁰ ont conduit à un premier brevet en 2014 (WO/2014/020271)¹¹ puis un deuxième en 2016 (WO/2016/016470)¹² avec la thèse de Rémi Malbec¹³. Ces deux travaux de thèse ont consisté à développer la technologie dans un format de puce microfluidique, où l'ADN peut être concentré et séparé en taille par l'application simultanée d'un écoulement et d'une contre-électrophorèse. Par la suite, cette technologie a été transférée vers l'entreprise Adélis (anciennement Picométrics) pour une application industrielle dans un format capillaire. Adélis applique notamment son expertise à la caractérisation d'ADN circulant dans le sang¹⁴.

La thèse CIFRE de Nicolas Milon en 2019¹⁵, menée entre le LAAS et Adélis, a contribué au développement de μ LAS sur ce format, appelé BIABooster, dédié notamment au préparatif d'ADN de grande taille. Cependant, le format capillaire comporte un certain nombre de limites, en particulier de saturation.

A travers ces travaux de thèse menés au LAAS-CNRS et en collaboration forte avec Adélis, nous avons développé un nouveau format de technologie, macroscopique par la parallélisation du procédé à l'aide de membranes poreuses, et dont l'objectif est la préparation d'ADN à partir d'échantillons de volumes de quelques millilitres. En référence à la technologie μ LAS, nous appellerons cette technologie μ LAP (Parallélisée pour le Préparatif).

Organisation du manuscrit

Le premier chapitre sera consacré aux techniques de préparation d'ADN. Nous décrirons deux champs applicatifs qui sont le séquençage d'ADN et l'étude d'ADN circulant, et nous identifierons leurs besoins respectifs en termes de préparatif.

Dans un deuxième chapitre nous décrirons la technologie μ LAS. Nous verrons son principe physique, à savoir la migration transverse d'ADN en solution viscoélastique et sous actionnement électrohydrodynamique, puis nous détaillerons les différents formats, d'abord sur puce microfluidique puis sur capillaire, ainsi que leurs limitations.

Le troisième chapitre présentera les matériels et méthodes du nouveau format μ LAP développé au cours de cette thèse. Nous en identifierons les éléments essentiels, la membrane isopore, les électrodes, les solutions tampons, et le banc expérimental.

Dans un quatrième chapitre, nous caractériserons ce nouveau format avec des modèles électriques et hydrodynamiques, puis nous détaillerons les phénomènes importants qui rentrent en jeu au sein du système comme l'électrolyse de l'eau ou l'échauffement, leurs conséquences sur les performances du système, et comment le prototypage 3D nous a permis d'en limiter les effets.

Le cinquième chapitre de ce manuscrit décrira les performances de notre système sur des solutions simples d'ADN. Nous verrons comment nous parvenons à concentrer l'ADN sur une gamme large de poids moléculaires, et comment il est possible de contrôler la concentration en fonction de la taille d'ADN. Nous détaillerons par un modèle analytique la manière dont l'ADN peut échapper à son arrêt au sein de membranes et nous aborderons les difficultés rencontrées à forts champs électriques.

Enfin, dans un sixième chapitre, nous explorerons l'application de μ LAP, dans un premier temps en décrivant le travail préliminaire consacré aux solutions complexes contenant des sels et des protéines pour la visée de préparation d'ADN circulant, et dans un deuxième temps nous appliquerons notre technologie pour la préparation d'un échantillon de séquençage NGS en collaboration avec la plateforme de séquençage de Toulouse GeT-PlaGe. Nous comparerons alors les performances de notre système avec la méthode de purification par billes magnétiques.

Chapitre 1

Le préparatif d'échantillons d'ADN

Application au séquençage et à la biopsie liquide

Avant de réaliser l'analyse d'un échantillon d'ADN, il est nécessaire de faire un certain nombre d'étapes de préparation. L'objectif de la technologie que nous développons est de répondre à ces besoins en préparatif. Après avoir présenté différentes méthodes usuelles d'extraction, purification et sélection en taille afin de situer notre technologie dans le paysage des techniques existantes, nous présenterons deux domaines d'étude qui constituent un potentiel applicatif de notre technologie : les techniques de séquençage d'ADN, puis l'étude de l'ADN circulant.

1.1. Techniques de préparation d'un échantillon d'ADN

1.1.1. Généralités sur l'ADN

L'ADN est l'acronyme d'acide désoxyribonucléique : c'est une molécule généralement sous la forme de deux brins enroulés en double hélice. C'est un polymère dont chaque monomère est appelé nucléotide. Un nucléotide est composé d'un désoxyribose lié à un groupe phosphate et à une base azotée. Il existe 4 types de bases nucléiques entrant dans la composition de l'ADN : Adénine (A), Thymine (T), Cytosine (C) et Guanine (G). Dit autrement, la molécule est composée d'un squelette sucre-phosphate, et les deux brins d'ADN sont liés par leurs bases complémentaires (A avec T et C avec G) formant des paires de bases (abrégé en bp pour base pair) via des liaisons hydrogènes (voir Figure 1). L'espace entre deux bp vaut $l_{bp} = 0,34 \text{ nm}$ et constitue l'unité de base d'expression de la taille d'un brin d'ADN. L'ordre de succession des nucléotides d'un brin d'ADN constitue ce qu'on appelle la séquence génétique. Une molécule d'ADN peut également se présenter sous forme simple brin (ssDNA contre dsDNA pour double brin).

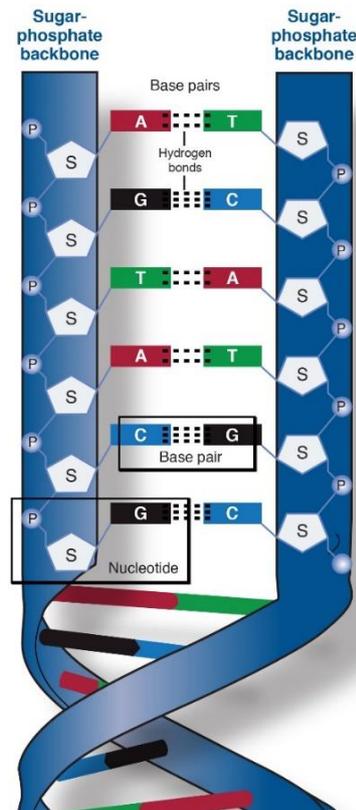


Figure 1 - Représentation de la structure d'une molécule d'ADN avec nucléotides et paires de bases
(Source : <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Phosphate-Backbone>, 10/08/2022)

L'ADN est présent dans les cellules de tous les organismes vivants. Chez les eucaryotes, il est contenu à l'intérieur du noyau des cellules sous forme de chromosomes (chaque cellule humaine possède 23 paires de chromosomes). La séquence du génome humain comporte 3,2 Gb (Giga bases), et certains organismes jusqu'à plusieurs centaines de Gb. Un chromosome humain comporte ainsi 50 à 250 Mb (Méga bases) environ. L'ADN est enroulé autour de protéines appelées histones pour former de la chromatine, elle-même condensée pour former un chromosome.

1.1.2. L'extraction et la purification d'ADN

Il existe un nombre important de méthodes d'extraction et de purification d'ADN^{16,17}. Après quelques généralités, nous présenterons les techniques historiques avant de détailler la méthode la plus utilisée de nos jours qui est la purification par phase solide.

Si l'ADN d'intérêt est contenu dans une cellule, l'extraction débute par une étape de lyse cellulaire qui consiste à casser la membrane de la cellule et ainsi récupérer son contenu dénommé lysat. Il existe différentes méthodes de lyses, qui peuvent être principalement chimiques (variation de pH, détergents) ou physiques (cycles de congélation/décongélation, sonication) et présentent des avantages et inconvénients en fonction du type de cellule, de la concentration d'ADN, de l'application et du rendement souhaités¹⁸. Le but est de récupérer l'ADN d'intérêt sans le dénaturer (transformation d'un double brin en simple brin) ou le dégrader (cassures) et bien sûr d'en perdre le moins possible durant l'intégralité du processus.

L'extraction comporte après la lyse une étape de purification permettant d'isoler l'ADN du reste du lysat notamment les protéines et débris cellulaires. Dans le cas d'une biopsie liquide, l'ADN peut être extrait directement du milieu (sang, salive, urine, liquide cérébro-spinal, etc.) sans étape de lyse. Très souvent les protéines sont éliminées (protéinase K, SDS, phénol/chloroforme, ...), l'ADN est précipité avec par exemple de l'éthanol, avant d'être dissous dans un tampon comme le TE (Tris EDTA). Le tampon permet de stabiliser le pH, car l'ADN est sensible au pH notamment acide, qui le dépurine (retire ces bases). L'EDTA sert à chélater les cations divalents qui sont essentiels à l'activité des nucléases. La protéinase K, découverte en 1974, est une protéase, c'est-à-dire une enzyme qui digère les protéines en coupant ses liaisons peptidiques¹⁹. Elle est très couramment utilisée dans les processus d'extraction. Le SDS (sodium dodecyl sulfate) est un détergent souvent utilisé pour lyser la membrane cellulaire, dénaturer et déplier les protéines afin de faciliter la digestion par la protéinase K.

1.1.2.1 Gradient CsCl/EtBr

La technique de purification par gradient de CsCl/EtBr (Chlorure de césium / Bromure d'éthidium) a été développée en 1957²⁰. Le lysat est mélangé au chlorure de césium puis ultra-centrifugé jusqu'à équilibre : les différents composants du lysat sont alors séparés par gradient de densité (Figure 2). Il permet par ailleurs une purification des différents types de molécules d'ADN compris dans l'échantillon (ADN chromosomique et plasmidique par exemple) par leurs migrations différenciées²¹. Le principe de séparation s'appelle la centrifugation isopycnique (chaque ligne horizontale du tube Figure 2 possède la même densité), les éléments de l'échantillon vont chacun sédimenter au niveau de leur zone d'équilibre de densité. Si un gradient de CsCl est utilisé en particulier, c'est parce qu'il possède une fenêtre de densité dans le tube qui inclut les densités appropriées pour la séparation de l'ADN, et également pour la stabilité du gradient dans le temps. Le Bromure d'éthidium est utilisé comme intercalant fluorescent d'ADN.

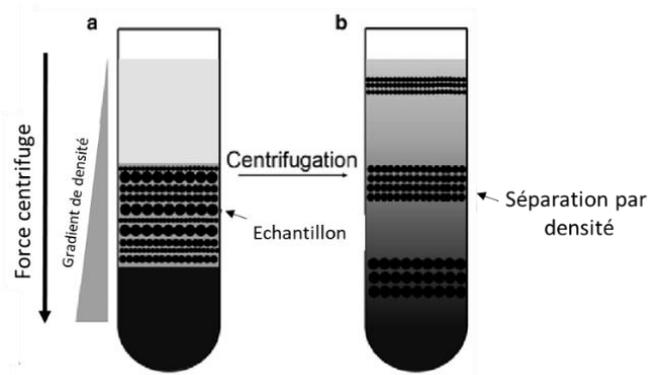


Figure 2 - Schéma de principe de séparation par gradient CsCl. (a) Une solution composée de CsCl et un échantillon avec des particules de différentes densités est centrifugé. (b) Après centrifugation, à l'équilibre, un gradient de densité est formé. Les particules sont alors séparées en fonction de leurs densités. (adapté de Jasinski et al. 2015²²)

Les inconvénients de cette technique sont le temps de centrifugation d'une dizaine d'heures, la faible sélectivité (principalement utilisé pour l'extraction d'ADN plasmidique), la quantité importante d'ADN nécessaire pour visualiser correctement la bande ($15 \mu\text{g}$)²³, et la dangerosité du EtBr qui est cancérigène. On peut trouver cependant des techniques plus modernes qui utilisent d'autres types de marqueurs fluorescents, moins dangereux et plus sensibles pour diminuer la quantité d'ADN nécessaire, comme le SYBR Safe (100 ng minimum)²⁴.

On peut par la suite prélever la bande avec une seringue et aiguille et précipiter l'ADN par exemple avec du PEG (polyéthylène glycol) ou de l'éthanol^{25,26}. On peut ensuite le solubiliser dans du TE.

1.1.2.2 Phase liquide

La technique du phénol-chloroforme était aussi particulièrement populaire avant l'invention de la purification par colonne de silice. Le mélange phénol-chloroforme dénature les protéines dans une phase organique séparée d'une phase aqueuse qui contient l'ADN (Figure 3). Après des étapes répétées de centrifugation et lavage, l'ADN peut être récupéré de la phase aqueuse et précipité dans l'éthanol ou isopropanol puis dissous dans un tampon. L'inconvénient de cette technique est la toxicité du mélange phénol-chloroforme et son manque de reproductibilité.

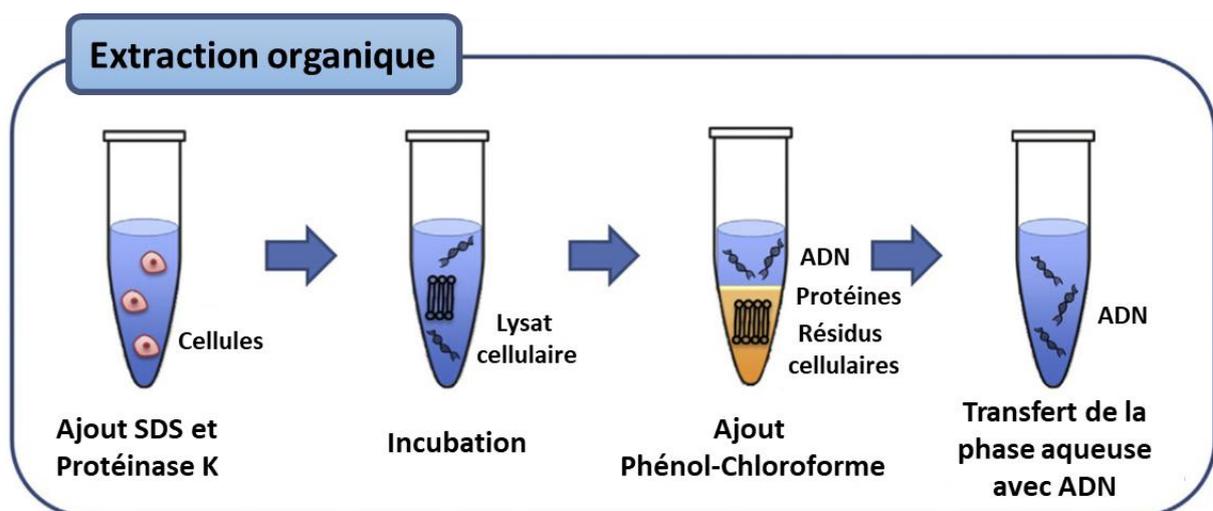


Figure 3 - Processus d'extraction d'ADN par technique Phénol-chloroforme. Après lyse cellulaire par SDS et protéinase K, le mélange PCIA (phénol-chloroforme, alcool isoamylique) est ajouté, vortexé et centrifugé pour générer deux phases, organique et aqueuse. L'ADN est récupéré ensuite de la phase aqueuse. (adapté de McKiernan et al. 2017²⁷)

1.1.2.3 Phase solide

A partir des années 80 se sont particulièrement développées des méthodes d'extraction par phase solide (SPE), peu coûteuses et bien moins dangereuses pour l'utilisateur, plus tard vendues en kits de purification commerciaux. La phase solide diffère en fonction des méthodes et des kits. Les plus connues sont à colonne de silice ou billes magnétiques (généralement à base de silice) mais le principe physico-chimique reste le même (voir plus bas le principe d'adsorption d'ADN sur la silice). La SPE à base de matrice de silice permet de capter l'ADN de manière réversible sur une surface de silice tout en nettoyant l'échantillon des autres composants avec de l'éthanol et une centrifugation. L'ADN peut ensuite être élué dans un tampon classique comme le TE¹⁶. La méthode par billes magnétiques développée en 1998, encore plus rapide, gagne en popularité²⁸. Des nanoparticules magnétiques (généralement magnétite ou maghémite) sont recouvertes de silice ou de polymère fonctionnalisé pour une affinité avec l'ADN²⁹. Après incubation, les billes avec ADN fixé sont retenues dans le tube par un aimant : le tube peut alors être rincé du reste du lysat. L'ADN est ensuite élué dans un tampon classique (Figure 4).

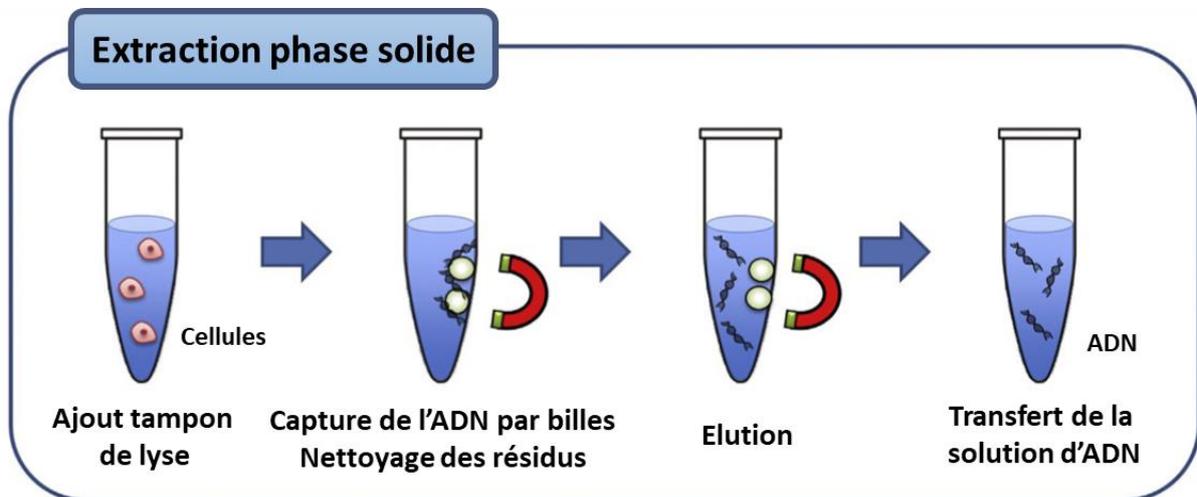


Figure 4 - Processus d'extraction par phase solide-liquide sur billes magnétiques. Après lyse cellulaire, l'ADN est lié à des billes magnétiques fonctionnalisées maintenues au bord du tube par un aimant. Le reste du lysat est rincé, puis l'ADN est élué dans un tampon. (Adapté de McKiernan et al. 2017²⁷)

Les kits sont commercialisés par des grandes entreprises spécialisées en biologie moléculaire comme Qiagen (kit QIAamp) ou ThermoFisher (GenJet). Ces kits présentent des solutions variées pour la purification d'ADN sur un large champ d'usage, avec différentes quantités d'ADN à extraire, et adaptés à l'extraction à partir de cellules, de tissus ou de sang, d'ADN microbien, de plasmide, d'ARN, etc. L'extraction par billes magnétiques peut également permettre une sélection spécifique de séquences d'ADN comme le montrent St. John et al. (2008)³⁰. Les billes magnétiques sont fonctionnalisées avec de la streptavidine. Les fragments d'ADN qui comportent une séquence spécifique d'intérêt sont hybridés à une sonde d'ADN simple-brin biotinylée (à laquelle est greffée de la biotine) qui a une grande affinité avec la streptavidine. De cette manière les fragments d'intérêt peuvent être isolés.

Alors que le procédé de purification par bille magnétique semble très simple d'utilisation, les rendements obtenus sont assez dépendants de l'utilisateur : les purifications que j'ai pu réaliser avec billes AMPPure XP (Beckman Coulter) avant séquençage nanopore avaient généralement des rendements autour de 50% de la quantité d'ADN initiale pour chaque purification effectuée.

Physico-chimie de l'adsorption de l'ADN sur silice

Nous apportons ici des éléments de compréhension du phénomène d'adsorption de l'ADN sur la silice des billes. Alors que l'ADN et la silice sont chargées négativement et donc ont tendance à se repousser, la présence importante d'ions dans la solution favorise l'apparition de « ponts salins » (salt bridges en anglais), c'est-à-dire des interactions électrostatiques non spécifiques ou des liaisons hydrogènes. Les ions en action dans ce processus sont souvent des sels chaotropiques ou chaotropes comme le thiocyanate de guanidium (GuSCN). Ils portent ce nom car ils augmentent l'entropie (ce qui se traduit par une réaction endothermique lors de sa dissolution) mais ils sont surtout connus pour leurs effets destructeurs des structures des molécules. Ils ont ici un effet déshydratant à la fois sur l'ADN et sur la silice, ce qui favorise l'adsorption par liaisons hydrogènes³¹. Les agents chaotropiques comportent également de nombreux avantages car ils peuvent lyser les cellules en amont³² et inactiver les nucléases³³. La phase de nettoyage des résidus de la cellule, lorsque l'ADN est adsorbé à la silice, comporte aussi souvent de l'éthanol, lui-même chaotrope. Cependant, comme les résidus d'agents chaotropiques peuvent inhiber les activités des ADN polymérase dans les amplifications par PCR, éventuellement réalisées après purification, d'autres méthodes peuvent être utilisées, par exemple, via des variations de pH³⁴.

L'article de Smerkova et al (2013)³⁵ décrit l'augmentation des performances d'extraction avec une technique par particules magnétiques par rapport à une extraction au chloroforme, ainsi que les paramètres d'optimisation de la captation et élution de l'ADN par des billes magnétiques recouvertes de silice. La présence d'ions métalliques favorise de manière importante l'adsorption par la neutralisation des répulsions électrostatiques : l'augmentation de la force ionique génère une diminution des forces électrostatiques répulsives intramoléculaires entraînant une conformation plus compacte qui favorise la diffusion de l'ADN selon Nguyen et al. (2007)³⁶ ici dans le comportement d'ADN circulaire (plasmide). La présence de cations écrante également la charge négative de l'ADN et de la silice et favorise ainsi l'adsorption³⁶. Nguyen et al. indiquent également que l'adsorption est plus importante encore en présence d'ions divalents qu'avec des ions monovalents. Par ailleurs, l'utilisation de solutions à pH faibles diminue la densité de charge à la surface de la silice, favorisant l'adsorption^{31,34}. En outre, l'adsorption de l'ADN à la silice est sensible à la température (une température en dessous de 20°C diminue la cinétique d'adsorption)³⁵, ce qui explique que certains protocoles impliquent des chauffages.

L'élution de l'ADN, à l'inverse de la captation, doit permettre la répulsion entre la silice et l'ADN. Cela est permis par la présence bien plus faible de sels dans ce tampon et également par la présence d'EDTA qui provoque la chélation des ions métalliques qui ne jouent plus alors le rôle d'écrantage, ce qui favorise ainsi la désorption³⁵. A l'opposé de l'adsorption, on préférera une élution dans une solution à pH élevé pour la désorption. Dans le cas de l'utilisation d'agents chaotropiques, la désorption de l'ADN est plus difficile et nécessite souvent un chauffage³⁴.

Nous verrons dans la partie suivante sur la sélection en taille (1.1.3.4) comment il est possible de fractionner en taille un échantillon à l'aide d'une purification sur billes magnétiques.

1.1.2.4 Bilan sur les méthodes d'extraction

Le Tableau 1 présente brièvement les caractéristiques principales de différentes méthodes d'extraction. Il est difficile de rentrer dans des considérations détaillées entre les méthodes car les performances peuvent fortement dépendre des échantillons initiaux et des kits utilisés parmi ces techniques³⁷. La technique CsCl/EtBr est peu utilisée de nos jours en raison de sa toxicité et du temps très long. L'extraction en phase liquide par technique phénol/chloroforme est également toxique et est de plus en plus remplacée par les techniques en phase solide. Les billes magnétiques constituent l'outil le plus simple, le plus rapide et produisant l'ADN avec la meilleure pureté, malgré son coût plus élevé³⁸.

| Technique \ Spécification | CsCl/EtBr | Phénol- chloroforme (phase liquide) | Colonne de silice (phase solide) | Billes magnétiques (phase solide) |
|------------------------------|-----------|---|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Temps | > 1 jour | > 3h | < 30 min | < 30 min |
| Toxicité | EtBr | Phénol, Chloroforme | Non | Non |
| Coût par échantillon | €* | € | € | €€ |

Tableau 1- Tableau récapitulatif de différentes méthodes d'extraction avec temps nécessaire, toxicité et coût. *La technique CsCl nécessite une ultracentrifugeuse coûteuse (Adapté de Carpi et al. 2011 ²⁹)

Même si nous nous plaçons dans l'optique de créer un instrument capable de réaliser une purification d'échantillon, nous n'avons pas développé sa capacité à lyser les cellules (ceci peut être réalisé éventuellement en amont de notre instrument) et nous n'avons pas testé sa capacité à purifier un lysat cellulaire. Nous verrons bien plus tard dans le chapitre 6 sur l'applicatif de l'instrument que la purification d'un échantillon comportant des protéines reste un défi important.

1.1.3. Sélection en taille d'ADN

Nous allons ici présenter les techniques de sélection en taille, notamment sur gels d'électrophorèse et par billes magnétiques, tout en apportant des éléments de précision sur la physique associée pour comprendre les mécanismes de sélection.

1.1.3.1 Généralités sur la physique de l'ADN en solution libre

La physique de l'ADN en solution est celle d'un polymère : il existe différents modèles en fonction de l'échelle (Figure 5). De manière macroscopique, la conformation d'un brin d'ADN est aléatoire, formant une sphère avec un certain rayon de giration R_g (Figure 5 a) : pour un ADN de phage lambda (λ) d'environ 48 kb, le brin d'une longueur de 22 μm est condensé dans un rayon de giration de 0,73 μm ³⁹. Aux petites dimensions, on peut le représenter sous la forme de billes reliées par des ressorts, c'est le cas notamment du modèle de Rouse. La rigidité du brin d'ADN peut se modéliser comme une chaîne de polymère composée de N_k segments appelés segments de Kuhn, d'une longueur $l_k \approx 300$ bp (Figure 5 b). Chaque segment de Kuhn est orienté librement et de manière aléatoire par rapport au précédent segment, c'est-à-dire que leur conformation est indépendante. Cette longueur définit la rigidité du brin, on parlera aussi de longueur de persistance $l_p = l_k/2$. La sphère de giration définie plus tôt peut s'exprimer comme $R_g = l_k N_k^{\nu}$ avec ν exposant de Flory d'une valeur de 1/2 pour une chaîne idéale, 3/5 pour une grande chaîne en incluant un volume d'exclusion qui correspond à la répulsion stérique entre les monomères^{40,41}. A noter que la longueur de persistance varie en fonction des interactions ioniques dans la solution, donc en fonction du tampon. Par ailleurs, l'ADN simple brin (ou l'ARN) présente une rigidité bien moindre, avec une longueur de Kuhn environ 7 fois moins élevée que l'ADN double brin⁴².

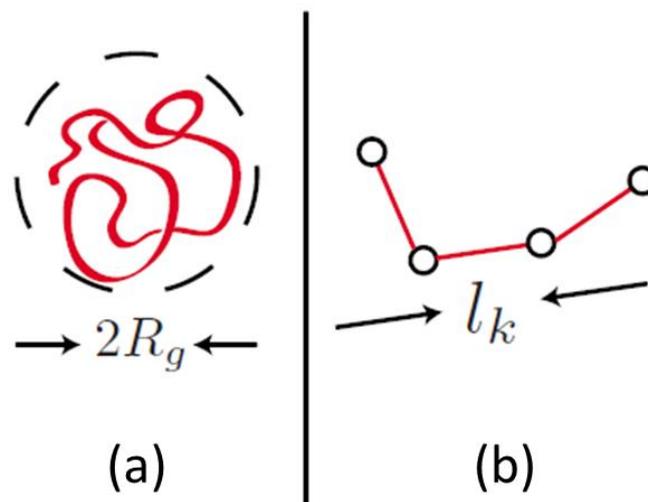


Figure 5 - Représentation de l'ADN en solution libre. En fonction de l'échelle d'intérêt, on peut considérer l'ADN comme (a) grande échelle : une bobine d'ADN enroulée dans un rayon de giration R_g , (b) petite échelle : la succession de N_k segments rigides de longueur de Kuhn $l_k \approx 300$ bp. (Adapté de Dorfman et al. 2010⁴⁰)

1.1.3.2 L'électrophorèse d'ADN en solution libre

Le comportement physique de l'ADN sous électrophorèse est particulièrement décrit dans la revue de Viovy (2000)⁴³. L'ADN est chargé négativement en solution. Sous l'action d'un champ électrique on peut écrire la force électrique exercée sur la molécule d'ADN comme :

$$F_{elec} = q_k N_k E \quad (1)$$

Avec q_k la charge d'un segment de Kuhn et E l'amplitude du champ électrique.

Cette force électrique s'oppose à la force de friction :

$$F_{fric} = -v \xi_c \quad (2)$$

Avec v vitesse et ξ_c coefficient de friction de la chaîne.

La compensation entre les deux forces nous donne :

$$v = \mu_0 E \text{ avec } \mu_0 = \frac{q_k N_k}{\xi_c} \quad (3)$$

μ_0 étant la mobilité électrophorétique en solution libre.

L'interaction hydrodynamique et l'interaction électrostatique entre les éléments de la chaîne ont un comportement différent : alors que l'interaction hydrodynamique se comporte en $1/r^3$, l'interaction électrostatique décroît de manière exponentielle sur une longueur appelée longueur de Debye. Cette longueur définit la longueur d'écrantage du champ électrique autour de l'ADN par la présence d'ions positifs, et représente tout au plus quelques nm. Etant bien plus faible que la longueur de Kuhn, le mouvement électrophorétique d'un segment de Kuhn n'influence donc pas le mouvement d'un autre segment. On peut alors écrire la friction comme proportionnelle au nombre de segments de Kuhn :

$$\xi_c = N_k \xi_k \quad (4)$$

avec ξ_k le coefficient de friction de chaque fragment.

L'injection de (4) dans (3) revient à dire que :

$$\mu_0 = \frac{q_k}{\xi_k} \quad (5)$$

En d'autres termes, la mobilité de la chaîne ne dépend plus de sa longueur. Une électrophorèse en solution libre ne permet pas de séparer facilement des brins de différentes tailles.

1.1.3.3 L'électrophorèse d'ADN sur gel

Comme vu précédemment, la mobilité électrique de l'ADN est indépendante du poids moléculaire en solution libre, c'est la raison pour laquelle la technique la plus commune de séparation d'ADN repose sur l'utilisation d'un gel (agarose ou polyacrylamide) qui permet de faire varier cette mobilité. La présence d'un gel permet de confiner le mouvement de l'ADN par un phénomène de reptation dès lors que le $R_g > a$, avec a taille des pores du gel, soit une centaine de nm. La force électrophorétique qui agit sur la chaîne d'ADN devient fonction d'une force de friction proportionnelle au poids moléculaire⁴⁰. La dépendance en taille de la mobilité de l'ADN dans le gel permet ainsi de séparer les molécules selon leur taille⁴⁴ (voir Figure 6).

Une électrophorèse classique sur gel d'agarose se fait sur un gel avec une concentration massique en agarose entre 0,5 et 2 % dans un tampon comme le TAE (Tris Acetate EDTA) ou le TBE (Tris Borate EDTA). La concentration en agarose s'adapte en fonction de la gamme de taille à séparer : une

concentration élevée en agarose diminue la taille des pores et permet la séparation de l'ADN autour de 100 bp ; à l'inverse une concentration faible sera plus optimisée pour la séparation au-delà du kb. Après migration de l'ADN dans le gel sous l'action d'un champ électrique pendant environ 1h, l'ADN est révélé par EtBr, un agent intercalant d'ADN, fluorescent sous rayonnement UV. Le gel ainsi révélé présente les différentes bandes correspondant aux molécules d'ADN de différentes tailles présentes dans la solution (Figure 6 à droite). Pour ensuite récupérer les molécules de la taille souhaitée, on peut exciser le gel, fondre la fraction découpée et ensuite réaliser une purification pour retirer l'agarose de la solution.

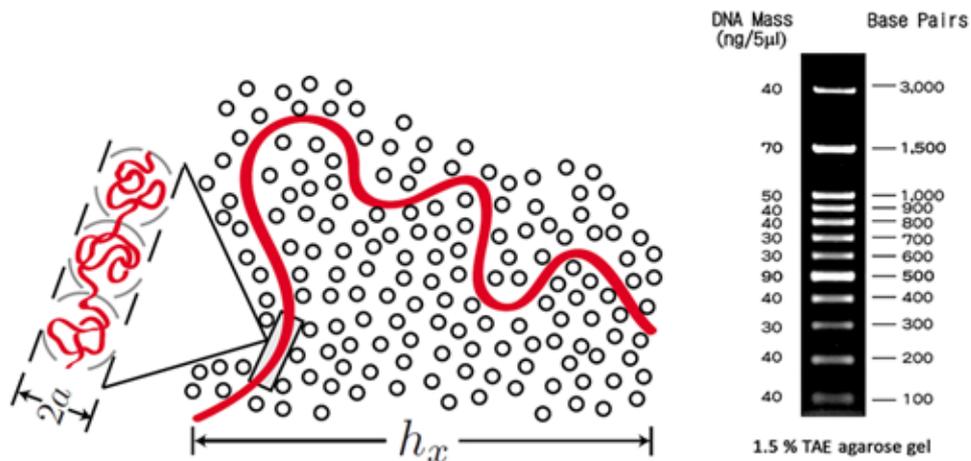


Figure 6 – (à gauche) Illustration du phénomène de reptation de l'ADN lors d'une électrophorèse sur gel. (à droite) Image d'un résultat de migration d'un 100 bp ladder sur gel d'agarose (Source : à gauche Dorfman et al. 2010⁴⁰ ; à droite NIPPON Genetics)

Quoi-que très robuste, cette méthode reste manuelle, pénible et risquée par l'utilisation d'EtBr cancérigène et d'UV. De plus, les UV peuvent provoquer des cassures de l'ADN à purifier. Par ailleurs la séparation des grandes tailles au-dessus de 40 kb reste très laborieuse, et on préférera dans ce cas l'utilisation d'électrophorèse en champ pulsé qui reste un procédé long de plusieurs heures jusqu'à quelques jours. Dans un champ pulsé, la direction du champ électrique est alternée au cours du temps ($\sim 120^\circ$). A chaque changement, la molécule d'ADN se réoriente pour migrer dans le sens du champ : comme la mobilité ne sera maximale que lorsque la molécule sera parfaitement alignée, la réorientation des grandes molécules est plus lente, elles migrent donc plus lentement⁴⁵. Le temps entre chaque changement d'alignement du champ dure jusqu'à 2 min pour des molécules d'une taille < 1 Mb mais peut aller jusqu'à 1h pour 10 Mb.

Pour automatiser le procédé de séparation en gel et l'extraction, il existe plusieurs technologies comme la technologie Pippin (SAGE Science) très utilisée pour la préparation en amont du séquençage de deuxième génération (Pippin Prep – 100 à 1500 bp) ou pour les molécules d'ADN de haut poids moléculaire (Blue Pippin – jusqu'à 50 kb), voir section 1.2 sur le séquençage. Son principe de fonctionnement est assez simple : une cassette permet la préparation simultanée de plusieurs échantillons (Figure 7). Un échantillon migre dans un canal de gel en épingle (une entrée du côté du pôle négatif et 2 sorties du côté du pôle positif). Alors que la migration se fait vers un canal principal, à tout moment la migration peut être contournée vers le canal secondaire qui est une chambre de collection où l'ADN est retenu sur une membrane d'ultrafiltration. On peut ainsi collecter environ 40 μL de librairie (solution d'ADN prête pour le séquençage). Le procédé dure généralement plus d'une heure sur Pippin Prep, et plusieurs heures sur BluePippin, avec un rendement entre 50 et 80% annoncé par le constructeur. La distribution en taille (coefficient de variation) est inférieure à 8% pour Pippin Prep, 20 % pour BluePippin. La quantité minimale d'ADN à injecter est de 15 ng.

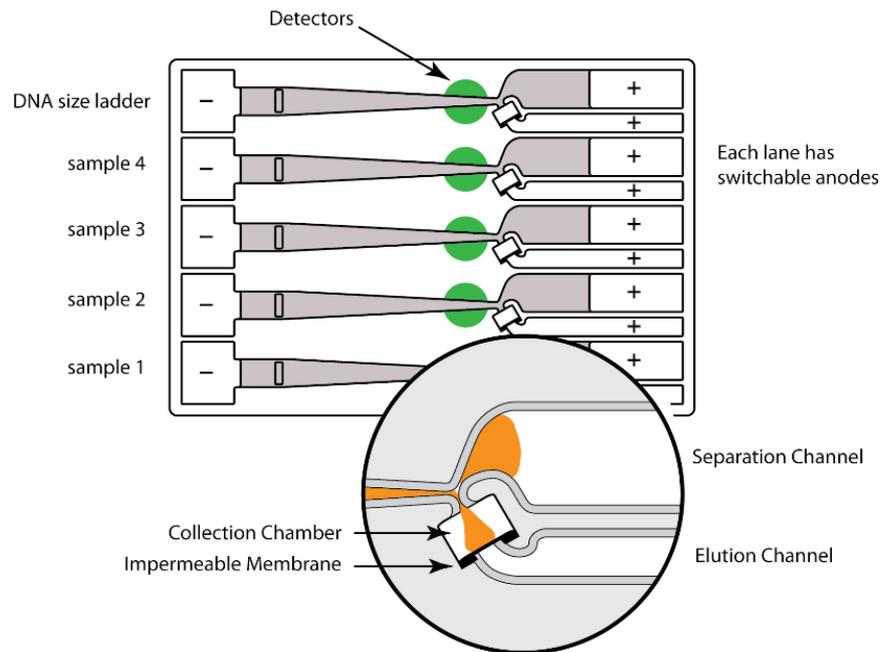


Figure 7 - Principe de fonctionnement de la technologie Pippin. Chaque voie de la cassette comporte une séparation en deux canaux permettant la collecte d'une bande donnée du gel lors de son passage à la jonction. (Source : SAGE Science)

La technique de Pippin reste une référence pour la préparation en taille de librairie pour le séquençage, que ce soit en NGS ou 3^{ème} génération malgré les rendements moyens et le temps de traitement relativement long (plusieurs heures).

1.1.3.4 Sélectivité en taille par phase solide

L'extraction en phase solide avec des billes magnétiques permet également de faire de la séparation en taille. Même si la sélection en taille reste peu sélective par billes magnétiques, elle est de plus en plus courante pour la préparation de séquençage. L'article de Bronner et al. (2009)⁴⁶ indique par exemple un protocole de sélection en taille avec des billes AMPPure XP (Beckman Coulter) pour la préparation d'ADN avant un séquençage de deuxième génération Illumina (voir 1.2). La proportion de billes utilisée pour la purification permet d'éliminer une partie importante des molécules de taille inférieure à un seuil (cut-off) de 150-200 bp qui peuvent diminuer les performances⁴⁷. Pour éviter l'injection de fragments de trop grande taille qui diminuent également les performances de la puce, les auteurs incluent une séparation des tailles supérieures à 500 bp avec une deuxième purification et un ratio de billes différents. Beckman Coulter recommande l'utilisation de leur kit SPRIselect, qui présente des performances de sélection en taille variable de 150 à 800 bp. En fonction du protocole peut être récupéré l'ADN en-dessous, au-dessus du seuil ou bien une double sélection pour une gamme serrée. La Figure 8 présente le seuil accordable sur kit SPRIselect d'un échantillon comportant des tailles de 10 à 2 kb. On peut voir sur cet électrophérogramme obtenu sur BioAnalyzer (gel d'électrophorèse automatisé sur puce pour le contrôle qualité de la taille d'un échantillon), qu'une concentration plus faible de billes permet d'éliminer les petites tailles. L'échantillon initial (shear en rouge sur la Figure 8) d'1 µg d'ADN dans 100 µL, est par exemple grossièrement purifié des tailles inférieures à 200 bp pour un ratio de volume de solution de bille sur volume d'échantillon de 0,8 (en vert Figure 8). Le manuel ne précise pas si la quantité d'ADN dans l'échantillon influence la sélection en taille, et si une quantité d'ADN trop importante dégrade le procédé (ici montré opérationnel à une quantité d'1 µg pour une concentration de 10 ng/µL).

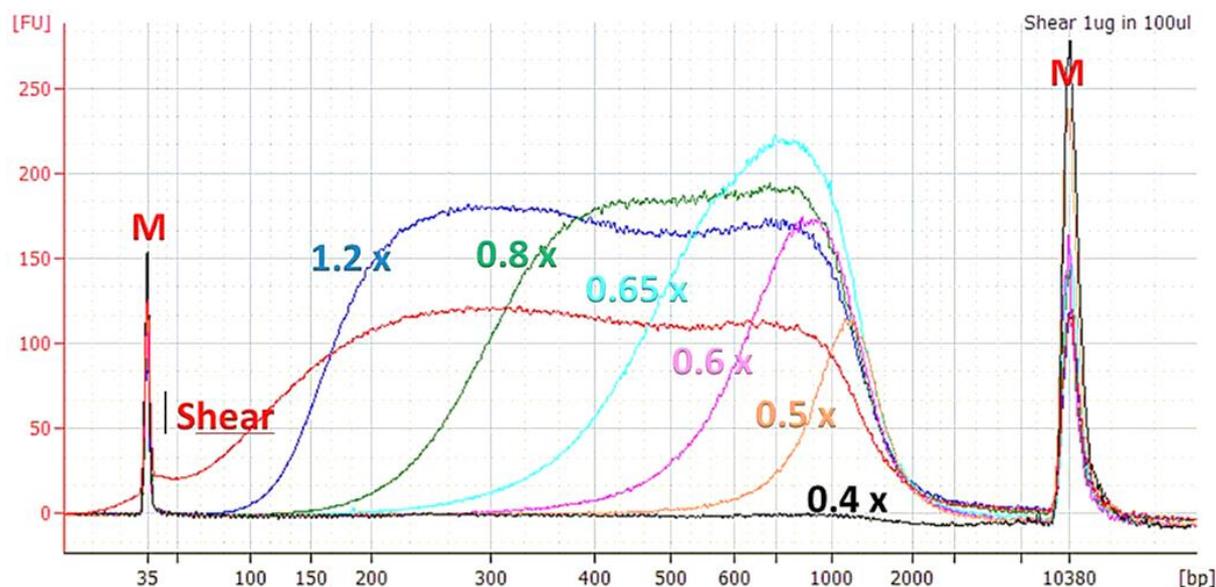


Figure 8 - Electrophérogramme (Agilent BioAnalyzer High sensitivity DNA chip) représentant le signal de détection d'ADN (en unité de fluorescence, FU) en fonction de la taille (en bp), pour des échantillons d'ADN purifiés avec différents ratios volume de billes SPRIselect / volume d'échantillon. M représente les marqueurs de taille haut et bas de la puce. En rouge (shear), l'échantillon initial non sélectionné par billes. On observe un seuil de taille variable de 150 à 800 bp en fonction du ratio (de 0,4x à 1,2x) en dessous duquel l'ADN est éliminé. (Source : SPRIselect User Guide PN B24965AA – Octobre 2012).

Stortchevoi et al.⁴⁸ ont montré comment modifier la sélection en taille pour une application de billes magnétiques sur du séquençage deuxième génération mate-pair qui est un type de séquençage orienté particulièrement sur les grands fragments d'ADN (3-6 kb). L'article précise également que cette préparation peut être étendue aux échantillons de séquençage de 3^{ème} génération type Nanopore. Le changement de cut-off est réalisé ici par la modification du tampon de suspension des billes magnétiques, initialement composé de NaCl et de PEG, en modifiant la concentration en NaCl notamment (augmentation de la charge ionique comme expliqué précédemment). Le PEG aurait quant à lui une fonction d'encombrement du tampon qui favorise l'interaction des particules en suspension. Cette équipe parvient à générer un cut-off à 7 kb maximum. Les rendements obtenus avec ce type de technique sont néanmoins assez faibles, autour de 30%.

Liu et al. (2016)⁴⁹ ont également réalisé le fractionnement de solutions d'ADN (ici deux molécules de 101 bp et 745 bp) via des particules de silice fonctionnalisées avec de la lysine. Ils expliquent que la force ionique induit une différenciation dans l'efficacité de l'adsorption en fonction du poids moléculaire. A un pH inférieur à 6,5, la lysine est protonée, exposant une surface chargée positivement. En jouant sur la concentration de NaCl dans la solution, ils parviennent à trouver une concentration spécifique de NaCl pour laquelle plus de 90% de l'ADN de 745 bp est adsorbé contre moins de 10% de l'ADN de 101 bp. Plus la molécule est longue, plus elle est chargée, donc plus elle est susceptible d'avoir des interactions électrostatiques avec la surface lys-SiO₂. L'effet du NaCl dans cette étude est inverse à l'effet indiqué précédemment sur surface de silice simple en raison de la présence de lysine. Ils indiquent n'être pas parvenus à adsorber de manière différentielle 101 bp et 745 bp avec seulement une surface d'SiO₂. L'ajout de NaCl a donc alors un effet d'écrantage pour l'interaction électrostatique comme illustré sur la Figure 9 : à faible concentration l'adsorption est effective sur les deux tailles d'ADN ; à forte concentration, l'écrantage empêche l'adsorption des deux tailles ; à une concentration spécifique ici de 0,4M, l'ADN de plus grande taille est adsorbé alors que l'écrantage est plus important pour l'ADN de plus petite taille.

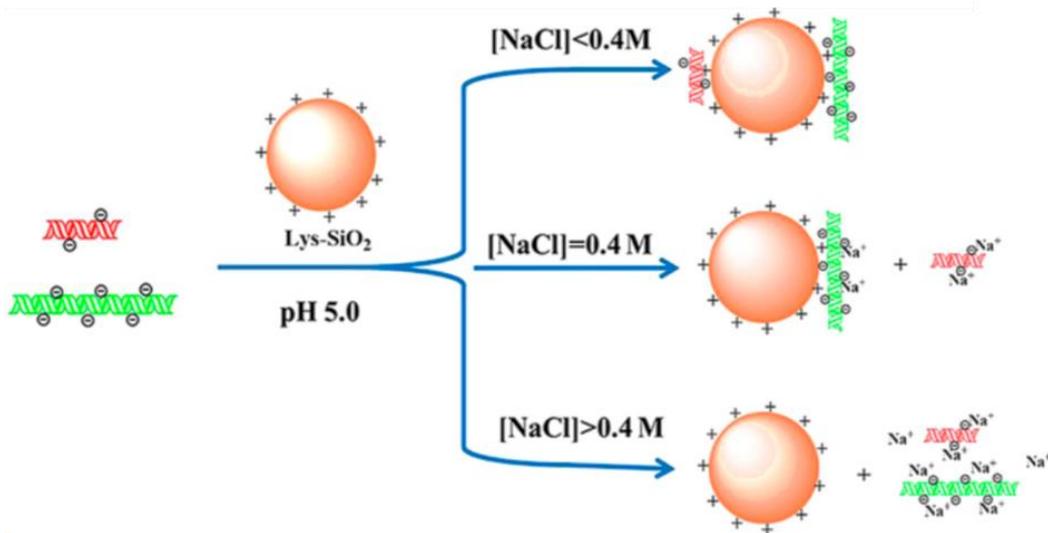


Figure 9 - Illustration de la sélection en taille par variation de la force ionique lors de l'adsorption d'ADN sur surface de Lysine-SiO₂. (Source Liu et al. 2016⁴⁹).

L'article explique cependant la faible sélectivité en taille : une séparation entre des tailles de 101 et 189 bp n'est pas réalisable, et la sélectivité n'est possible qu'avec un facteur supérieur à 2 entre les deux tailles d'ADN.

En résumé, la sélection en taille via un procédé d'extraction bille magnétique/silice est possible et de plus en plus présente dans les protocoles de préparation, même si elle présente de faibles sélectivités et de faibles rendements.

1.1.3.5 Chromatographie d'exclusion et membranes d'ultrafiltration

Une autre méthode de purification et séparation en taille est la chromatographie d'exclusion stérique. Contrairement à la méthode de purification sur colonne qui repose sur une affinité chimique, la chromatographie d'exclusion sépare les molécules en fonction de leur taille (volume hydrodynamique) grâce à leur passage à travers une matrice poreuse⁵⁰. Les molécules qui présentent un volume plus grand que les pores de la matrice sont exclus du volume interne des pores et migrent rapidement hors de la colonne : l'élution se fait ainsi par ordre décroissant de taille. En collectant différentes fractions, on peut donc séparer l'ADN d'intérêt des sels, des dNTPs, des primers, et des protéines contenues dans l'échantillon initial. On peut citer en exemple la colonne d'ultracentrifugation Chroma Spin (Takara Bio). Chroma Spin propose différentes colonnes pour différents fractionnements en taille : 10, 30, 100, 200, 400 et 1000 bp. On trouve aussi des membranes d'ultrafiltration (ex : Amicon) fonctionnant avec une exclusion des molécules en fonction des tailles, ce qui permet de purifier et concentrer l'échantillon avec un rendement de 90%.

1.1.3.6 Récapitulatif des méthodes de séparation en taille

Le Tableau 2 présente un récapitulatif comparatif des différentes méthodes de séparation en taille d'ADN expliquées dans ce manuscrit. A ces méthodes classiques s'ajoutent d'autres méthodes, peu utilisées car non distribuées industriellement, qui intègrent des procédés microfluidiques^{51,52}. Wunsch et al. (2019)⁵³ par exemple se servent de la diffusion d'ADN à travers une matrice périodique de nanopilliers (nanoscale deterministic lateral displacement – nanoDLD) pour séparer les différentes tailles de l'échantillon en 100 bp et 10 kb avec une résolution en taille de 200 bp. Un des inconvénients de cette technique est son faible débit d'1 mL/h.

| Méthode | Billes magnétiques | Gel automatisé | Gel | Chromatographie d'exclusion | Membrane ultrafiltration |
|-------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Exemples | AMPure XP (Beckman) | Pippin | (dont champs pulsé) | Chroma spin (Takara) | Microsep (PALL) |
| Rendement | 50-80% | 50-80% | Très variable | 50-90% | 90% |
| Temps | 30 min | 50-90 min | 1h - 1j | 10 min | 10 min |
| Gamme de taille | 100 - 1000 bp | 100 - 50k bp | 100 – 5M bp | < 1000 bp | < 1500 bp |
| Volume d'élution | 40 µL | 40 µL | / | 15 µL | 15 µL |
| Précision de séparation | + | +++ | +++ | + | + |
| Prix | €€ | €€€ | € | € | € |
| Défauts | peu sélectif | Cher, Quantité minimale de 15 ng | très long et fastidieux | nécessite une centrifugeuse | nécessite une centrifugeuse |

Tableau 2 - Récapitulatif et comparaison de quelques techniques de sélection en taille

En conclusion, dans le but de concurrencer ces techniques, notre technologie doit être capable d'obtenir de bons rendements (> 50%), sur une gamme de taille large (nous verrons les tailles nécessaires pour des exemples d'application dans le séquençage et l'étude de l'ADN circulant dans la suite de ce chapitre), avec une sélectivité idéalement de meilleure qualité que celle des billes magnétiques (présentée en 1.1.3.4), en un temps d'utilisation proche de la dizaine de minutes.

Nous allons dans la prochaine section discuter des besoins en matière de préparation d'ADN pour le séquençage.

1.2. Besoins en préparatif pour le séquençage

Dans la section qui suit, nous parlerons des différentes techniques de séquençage, en particulier des dernières générations afin d'aborder leurs besoins en préparatif et d'identifier comment nous pouvons y subvenir avec notre technologie.

Depuis la première génération de séquençage par Sanger en 1977⁵⁴ les techniques de séquençage n'ont cessé d'évoluer avec le premier instrument commercial de deuxième génération en 2005 (Roche 454) qui a réduit considérablement le coût du séquençage (voir Figure 10) et désormais la troisième génération de séquençage (1^{ère} commercialisation de la technologie nanopore en 2014, comme on peut le voir également par une chute du prix du séquençage autour de cette année). La deuxième génération est généralement appelée NGS (Next-Generation Sequencing) et la troisième génération TGS (Third Generation Sequencing).

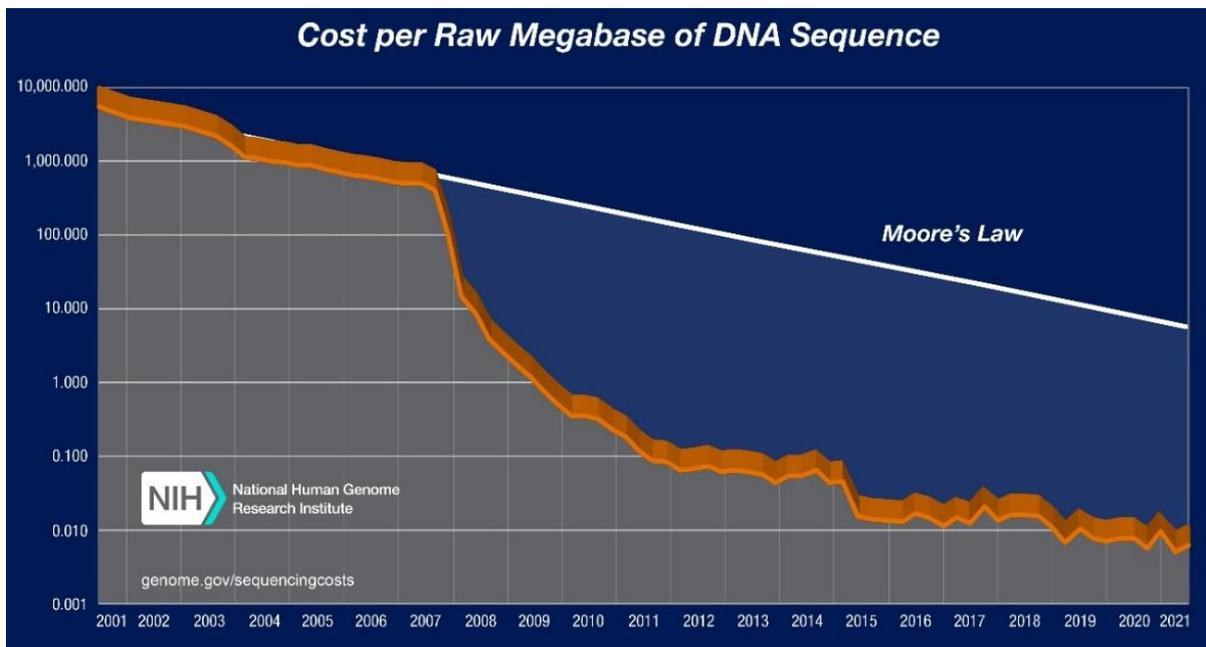


Figure 10 - Coût du séquençage (\$) par mégabase depuis 2001 (Source : National Human Genome Research Institute)

1.2.1. Première génération, Sanger

Le principe du séquençage de Sanger est illustré Figure 11. L'ADN à séquencer est amplifié par PCR, de sorte à obtenir une quantité importante d'ADN, puis dénaturé et fragmenté. Cette matrice d'ADN subit ensuite une seconde amplification dite « chain-termination » grâce à une polymérase, une amorce et des dNTPs (désoxyribonucléotides triphosphates, les unités élémentaires de l'ADN, avec bases T, A, C et G). Une fraction des dNTPs du mélange est constituée de ddNTPs (didésoxyribonucléotide) qui sont des nucléotides qui stoppent la réaction s'ils sont incorporés à la chaîne. De plus, ces ddNTPs sont marqués en fluorescence, avec des longueurs d'ondes d'émission différentes en fonction de la base azotée. Après cette seconde amplification, on obtient une large gamme de tailles de fragments d'ADN : chaque fragment possède une terminaison fluorescente qui indique la base terminale du brin. Après séparation électrophorétique de ces fragments, on peut ainsi lire l'intégralité de la séquence.

Le séquençage de première génération possède l'avantage de présenter peu d'erreurs, il est donc toujours utilisé pour par exemple confirmer des séquences de variants ou séquencer des zones difficilement séquençables en NGS⁵⁵, mais cette méthode reste plus longue.

First generation sequencing (Sanger)

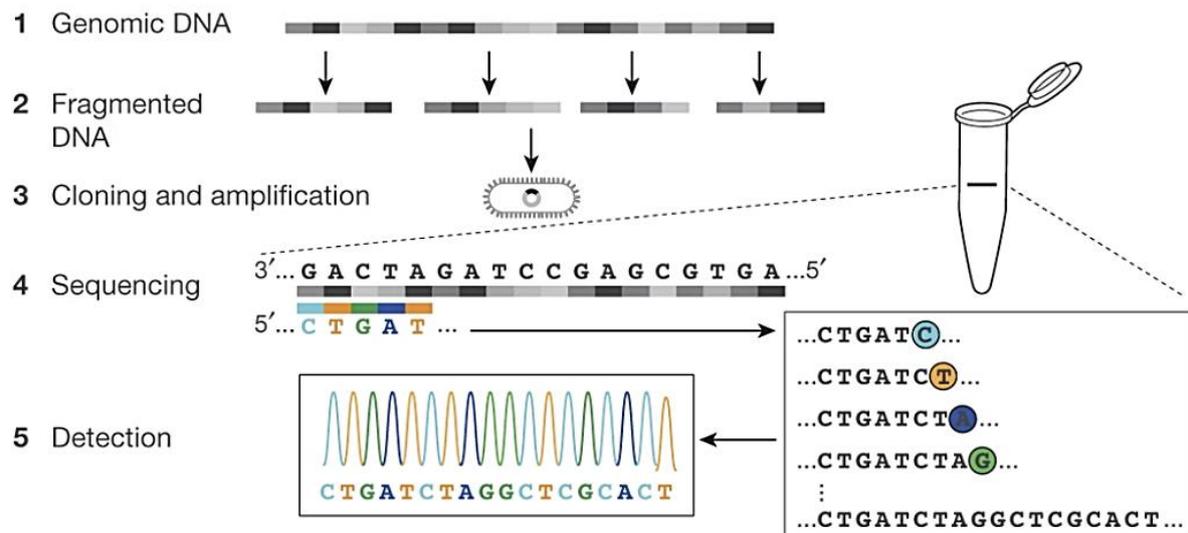


Figure 11 - Principe de fonctionnement du séquençage de 1ère génération (Sanger) (Source : Shendure et al. 2017⁵⁶)

1.2.2. Deuxième génération, NGS

L'avancée majeure de la deuxième génération de séquençage (aussi appelée Next Generation Sequencing – NGS) est la parallélisation du séquençage, ce qui la fait souvent appelée « massively parallel sequencing ». Même si la seconde génération englobe différentes approches (le premier instrument NGS, Roche 454, repose sur le principe de pyroséquençage⁵⁷ que nous ne présenterons pas ici), actuellement, l'entreprise phare de séquençage de deuxième génération est Illumina avec différents séquenceurs (par exemple MiniSeq ou MiSeq) qui fonctionnent sur le principe de « reversible dye terminator » que nous allons expliquer.

Avant séquençage, l'échantillon est préparé : on appelle librairie (ou banque) l'ensemble des fragments prêts au séquençage. La première étape, la préparation de la librairie, consiste à fragmenter l'ADN (par exemple par sonication), le dénaturer, puis à liguer aux extrémités des fragments d'ADN des oligonucléotides adaptateurs spécifiques qui seront complémentaires à des oligonucléotides présents sur la puce fluide. La préparation de librairie est une étape critique, car elle peut fortement influencer sur l'efficacité du séquençage : une sélection en taille est importante à cette étape afin d'injecter dans la puce les tailles de fragments adaptées au séquençage, généralement de 150 à 700 bp.

Les matrices d'ADN (templates) sont ensuite amplifiées sur la puce pour générer des clusters (Figure 12) : le template avec adaptateur s'hybride à l'adaptateur complémentaire présent sur la surface de la puce, une polymérase génère le brin complémentaire qui est ensuite dénaturé. L'amplification en cluster se fait par pont : l'ADN se replie pour que l'autre extrémité non accrochée s'hybride au second type d'adaptateur en surface de puce, de sorte que le brin d'ADN forme un pont. Ce pont est ensuite dénaturé résultant en 2 copies de la molécule d'ADN attachés côte à côte sur la puce. Le procédé, parallélisé sur toute la surface de la puce, est ensuite répété. Il en résulte qu'une fraction de séquence se retrouve amplifiée de manière localisée et forme un cluster de clones.

Le séquençage démarre ensuite par la polymérisation des brins fixés sur la puce avec des dNTPs fluorescents. A chaque cycle d'addition d'un nouveau nucléotide à la chaîne, les clusters sont illuminés par une source laser et le signal d'émission du dNTP est caractéristique de la base. Comme tous les brins du cluster sont des clones, le signal d'émission est amplifié : on peut finalement lire

simultanément la séquence de tous les clusters dans un procédé parallèle. L'analyse des données de lecture est ensuite importante pour reconstruire la séquence de l'intégralité du génome à partir des séquences de fragments.

Second generation sequencing (massively parallel)

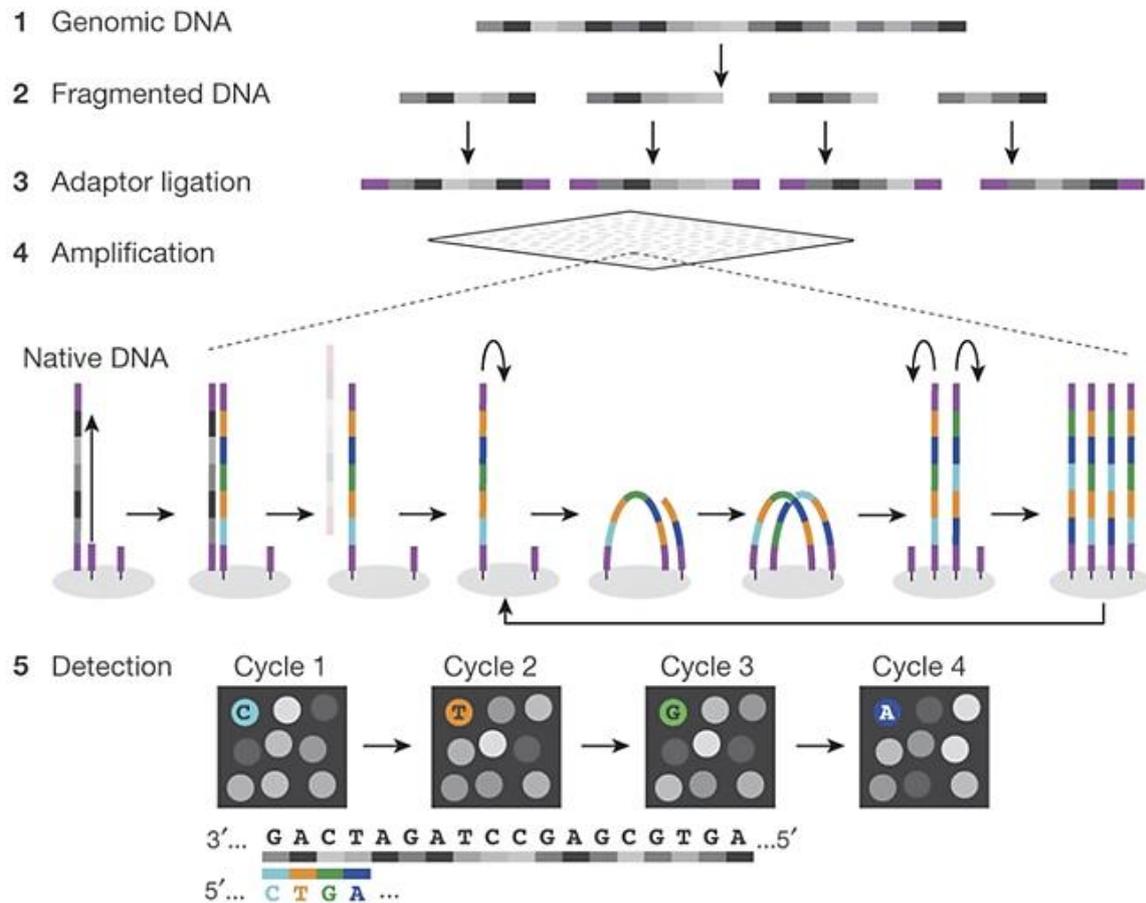


Figure 12 - Principe de fonctionnement du séquençage de 2ème génération (NGS Illumina) (Source : Shendure et al. 2017⁵⁶)

La méthode NGS a révolutionné l'efficacité du séquençage : plus d'un milliard de lectures (reads), soit un terabase (10^{12} bp) peut être généré par un seul instrument en deux jours⁵⁶. Le coût par read est environ 150 000 fois plus faible que pour un séquençage Sanger⁵⁸.

La méthode NGS comporte un certain nombre de défauts, d'une part parce qu'elle se fonde sur une amplification clonale, qui implique l'introduction et la copie d'erreurs, et des biais d'amplification (par exemple l'amplification préférentielle par pont des plus courts fragments)⁵⁹ ; et d'autre part car elle s'appuie essentiellement sur la lecture de reads courts, ce qui rend difficile leur assemblage lorsque les génomes contiennent des séquences⁶⁰. Elle reste encore une méthode de séquençage de référence, par sa robustesse et son faible taux d'erreur (< 1%) face à la concurrence de plus en plus croissante de la troisième génération de séquençage.

1.2.3. Troisième génération, TGS

La dernière génération de séquençage (TGS pour Third Generation Sequencing aussi appelée long-read sequencing) procède d'une approche technologique beaucoup plus radicale. Nous n'allons présenter ici qu'une seule technologie, dominante sur le marché actuel, qui est le nanopore développé par Oxford Nanopore Technologies (ONT). Il s'agit d'un séquençage de molécules uniques, double ou

simple brin, sans amplification préalable. Sur une puce nanopore se trouve une membrane de polymère avec des pores nanométriques en protéines à travers lesquels les molécules d'ADN couplées à une protéine motrice vont pénétrer (la protéine motrice est ajoutée durant la préparation de librairie avec la ligation d'un adaptateur en bout de matrice). La molécule est alors déroulée dans le pore lors de son passage. Le courant qui traverse chaque nanopore est enregistré : les variations de ce courant permettent de distinguer les bases et ainsi d'obtenir la séquence du brin. Un traitement au bisulfite permet de transformer les cytosines méthylées en uracile, ce qui permet de plus de localiser des sites de méthylation de l'ADN (marques épigénétiques). La Figure 13 illustre le fonctionnement.

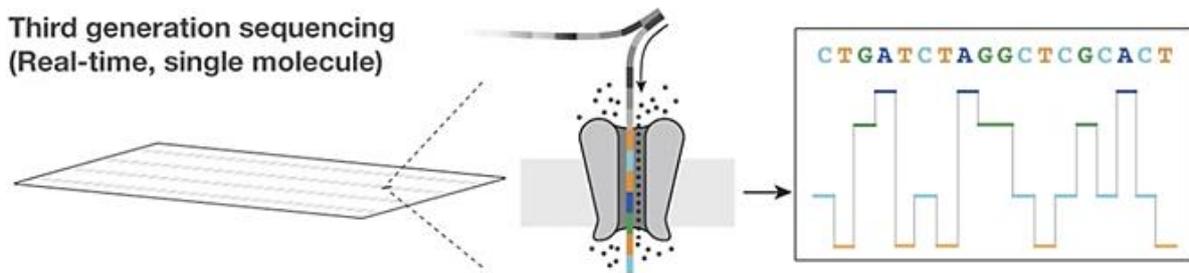


Figure 13 – Principe de fonctionnement du séquençage de 3^{ème} génération Nanopore (Source : Shendure et al. 2017 ⁵⁶)

La vitesse de lecture est rapide : 450 bases par pore et par seconde pour l'ADN. Le séquençage est particulièrement efficace pour de longs fragments ce qui permet la lecture de régions répétées des génomes, dont l'assemblage était difficile avant cette technologie⁶¹. La lecture sur nanopore est en temps réel car la reconstruction de la séquence est plus aisée par technique Nanopore que par NGS. Tant que les pores ne sont pas bouchés, le séquençage continue afin de gagner en profondeur de lecture. Il existe différents séquenceurs avec des quantités de pores variables : 126 (Flongle), 512 (MinION), 2 560 (GridION), 144 000 (PromethION), soit un rendement de lecture de quelques Gb à près d'une dizaine de Tb, afin de répondre à différents besoins. L'instrument de lecture du Flongle, qui fait la taille d'une clé USB, coûte autour de 1 500\$ et une puce coûte seulement 90\$ pour un séquençage unique, avec des résultats dès 30 min. L'entreprise développe même un instrument de séquençage, le SmidgION, qui pourrait se brancher directement à un smartphone. C'est une rupture considérable par rapport aux instruments de NGS, bien plus grands, énergivores et nécessitant des consommables. Au moment d'écrire ce manuscrit, le slogan affiché sur le site d'ONT est « Notre but est de permettre l'analyse de n'importe quelle chose, par n'importe qui, n'importe où » : la dynamique de développement du séquençage s'oriente vers une miniaturisation et une démocratisation de son accès, en particulier dans les domaines de la médecine et de la biologie⁵⁶.

La limitation principale de la technologie nanopore jusqu'alors était son taux d'erreur encore à 15% en 2018 (contre moins de 1% pour la NGS)⁶². Les erreurs peuvent provenir d'un mauvais rapport signal sur bruit qui peut être dû à la conformation physique du nanopore, la vitesse de passage de la molécule, ou encore des erreurs dans l'interprétation du signal⁶². Pour compenser ce taux d'erreur, l'augmentation de la profondeur de séquençage (nombre de lectures de la séquence par rapport à la taille de la séquence) peut être réalisée avec les instruments comportant un nombre de pores important. ONT a successivement amélioré son taux d'erreur par des modifications chimiques des nanopores, de nouvelles méthodes de lecture, l'amélioration des algorithmes, etc., comme le montre la Figure 14 a. En ce qui concerne les méthodes de lecture (Figure 14 b), des méthodes dites 2D pour la lecture des deux brins d'un dsDNA ligés par un hairpin (structure en épingle à cheveux), ou 1D² où les deux brins sont liés par un adaptateur, ont été développées et rendaient compte d'une meilleure précision jusqu'à 94%, mais ne sont plus supportées par ONT⁶³. L'entreprise annonce en 2022 un taux d'erreur inférieur à 1% grâce à ses derniers kits, sans que cette information n'ait été vérifiée dans la

littérature. Néanmoins, on peut espérer que cette technologie parvienne à terme à des taux d'erreur équivalents aux techniques NGS.

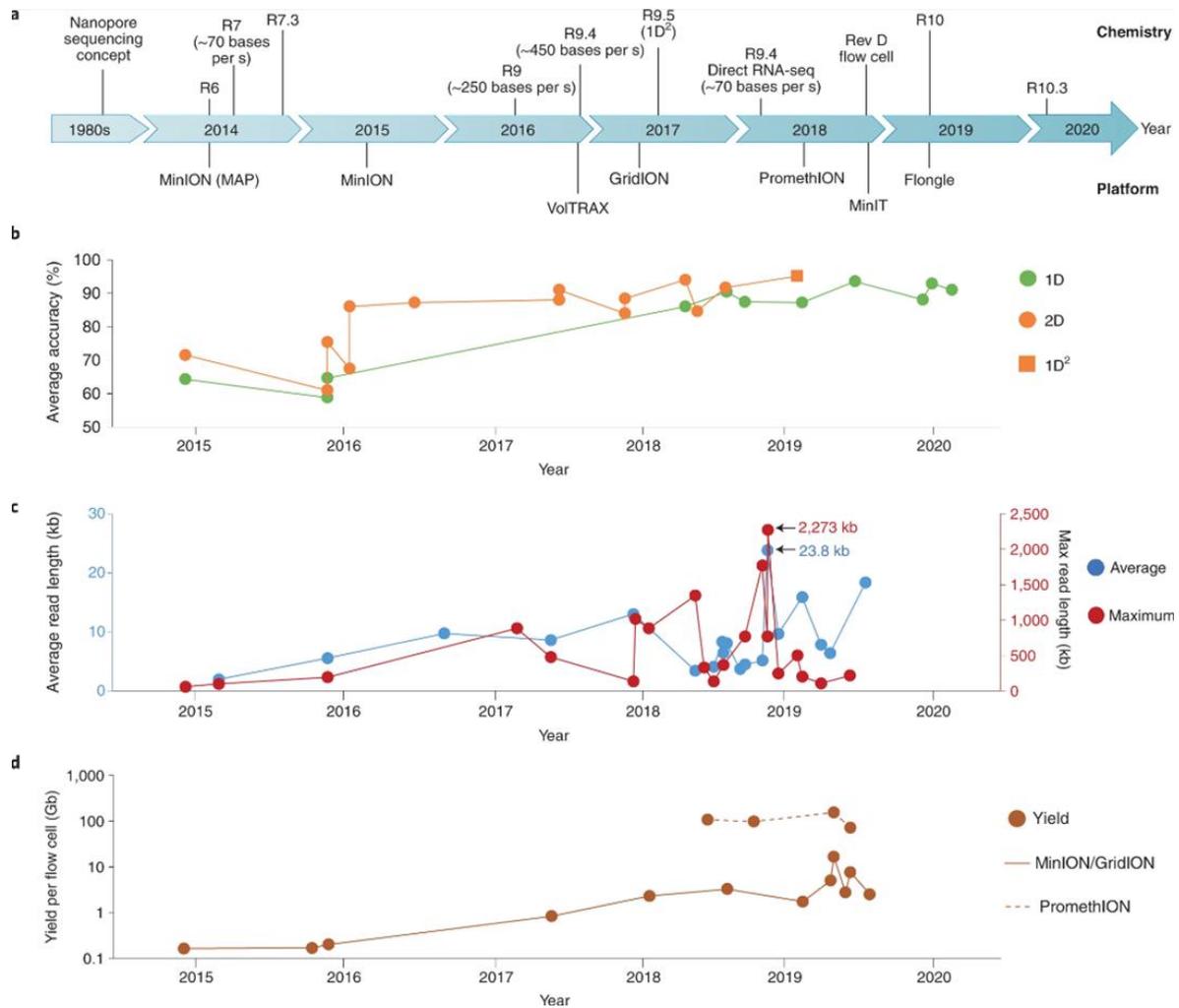


Figure 14 - Amélioration des séquençages ONT au cours du temps. (a) Frise temporelle des instruments et améliorations chimiques. (b) Précision en fonction des types de lecture. (c) taille des reads (moyennes et maximum). (d) rendements obtenus par puce nanopore pour différents instruments. (Source : Wang et al. 2021⁶³)

1.2.4. Préparation d'échantillon pour le séquençage

Il est important de sélectionner en taille son échantillon avant séquençage afin d'augmenter le nombre d'échantillons d'intérêt, séquencer et maximiser la qualité des données⁶⁴. Pour la TGS, l'idée consiste à sélectionner des fragments d'ADN de grande taille pour préserver au maximum les pores, en particulier lorsque l'on utilise des instruments à faible nombre de pores comme le Flongle. La préparation NGS quant à elle, consistera à encadrer la taille finale : supprimer les molécules de trop petite taille ou de trop grande taille pour rester dans une gamme [150-700 bp]. Cette sélection en taille se fait principalement de nos jours par billes magnétiques pour la NGS, qui a l'avantage de purifier, concentrer et de grossièrement sélectionner en taille, de manière simple et rapide. Pour des sélections plus précises de taille, les instruments Pippin sont préférés, en particulier pour la TGS où le BluePippin peut sélectionner de très longs fragments.

En termes de quantité d'ADN nécessaire au séquençage, Illumina recommande entre 50 et 500 ng. Pour la TGS, cela varie en fonction des kits de préparation de librairie. Cette préparation est une étape indispensable car elle inclut la ligation de l'adaptateur à la protéine motrice. ONT vend différents kits,

par exemple un kit classique (dit 1D Ligation Sequencing) qui inclut une purification par billes magnétiques après ligation, et un kit rapide qui n'inclut pas cette purification. Comme son nom l'indique, son avantage est la réduction du temps de préparation de la librairie qui passe d'environ 90 min à 10 min. L'inconvénient se trouve dans la qualité du séquençage, où le nombre de lectures est divisé par deux selon l'article de Phannareth (2020)⁶⁵, notamment par la présence de primers de ligation qui usent inutilement les pores de la puce. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, la purification par billes magnétiques peut engendrer des pertes importantes autour de 50%. Ainsi pour fournir suffisamment de matériel génétique à la puce après préparation de la librairie, ONT recommande au moins 1 µg dans le cas d'un kit classique contre seulement 400 ng pour un kit rapide. En fonction de l'étude génomique et de la facilité d'extraction de l'ADN, on choisira le kit adéquat.

Nous verrons dans les chapitres suivants comment nous pouvons répondre à la fois aux besoins en taille et en quantité d'ADN avec notre technologie.

1.3. Le préparatif pour la biopsie liquide : le défi de l'ADN circulant

Dans cette partie, nous nous intéresserons à la biopsie liquide, particulièrement à l'étude de l'ADN circulant. Nous détaillerons les besoins en préparation qui nous ont permis de guider nos choix technologiques.

1.3.1. Historique de l'ADN circulant

L'ADN circulant (cfDNA pour circulating-free DNA) est de l'ADN présent dans la circulation sanguine de manière fragmentée, observé pour la première fois en 1948 par Mandel et Metais⁶⁶. Dans les années 60, un lien a été identifié entre la présence élevée de cfDNA dans le sang de patients et certaines maladies auto-immunes⁶⁷. Plus tard, dans les années 80, une présence élevée de cfDNA a été montrée chez les patients atteints de certains cancers^{68,69}, laissant entrevoir l'utilité de son étude pour du diagnostic précoce ou le suivi de la maladie. En 2014, Thierry et al. publient une première validation clinique de l'étude d'ADN circulant pour la détection de mutations dans le cancer colorectal⁷⁰. Il constitue donc un biomarqueur de plus en plus utilisé en oncologie comme le montre l'augmentation significative de publications à ce sujet depuis les années 2000 (Figure 15), en particulier grâce à l'amélioration des techniques d'analyses génomiques. On appelle biopsie liquide l'étude de biomarqueurs dans le sang par opposition à une biopsie classique qui consiste à prélever une partie de la tumeur avant des analyses histologiques (observation microscopique des tissus). Thierry, cité plus haut, indique justement une efficacité qualitative et quantitative équivalente entre l'étude de cfDNA et une analyse histologique invasive⁷⁰. Le cfDNA est également couramment étudié pour d'autres analyses médicales comme les diagnostics prénataux⁷¹. La présence de l'ADN du fœtus dans le sang de la mère permet de déterminer le sexe de l'enfant à naître (présence de gènes du chromosome Y pour un garçon) ou déceler d'éventuelles pathologies (syndrome de Downs, Edwards, Patau, par exemple)⁷². Un autre exemple d'application d'étude de l'ADN circulant est la transplantation d'organe et le risque de rejet⁷³.

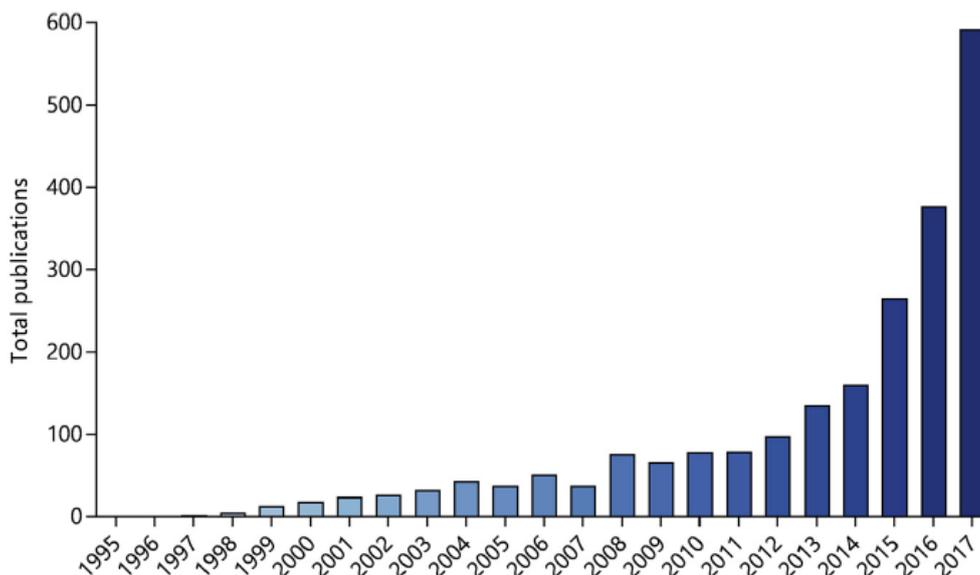


Figure 15 - Nombre de publications par an faisant référence à l'ADN circulant dans l'étude de cancers entre 1995 et 2017. (Source: Trigg et al. 2018 ⁶)

Nous allons ici tenter de présenter l'origine de cet ADN circulant, son intérêt médical et sa distribution en taille à partir de références bibliographiques. Il est important de souligner que ce domaine d'étude récent, quoi qu'extrêmement documenté, n'est pas compris en totalité.

1.3.2. L'étude de l'ADN circulant dans le diagnostic clinique de cancer

Parmi le cfDNA, on trouve de l'ADN en provenance de cellules saines, de cellules tumorales qu'on appelle ctDNA (circulating tumor DNA) mais aussi de cellules appartenant au microenvironnement de la tumeur⁷⁴. Comme d'autres biomarqueurs de cancer⁷⁵ (Cellules tumorales circulantes⁷⁶, micro ARN⁷⁷, exosomes⁷⁸, protéines⁷⁹, etc.), l'étude du cfDNA et ctDNA a des intérêts multiples à différentes phases de diagnostic clinique comme présenté Figure 16. A une phase asymptomatique la détection de ctDNA peut constituer un diagnostic précoce avant même que le cancer ne soit détectable cliniquement⁸⁰. Le suivi de concentration en ctDNA peut accompagner la thérapie afin d'identifier l'efficacité du traitement⁸¹. La surveillance de la présence de ctDNA durant la phase de rémission peut permettre de détecter plus précocement d'éventuelles rechutes^{82,83}. En cas d'échec des traitements par des mécanismes de résistance⁸⁴, l'identification précise des mutations du ctDNA donne la possibilité de déterminer le traitement adapté parmi de nombreuses options (chimiothérapie, thérapies ciblées, immunothérapie, etc.), c'est ce qu'on appelle la médecine personnalisée⁸⁵.

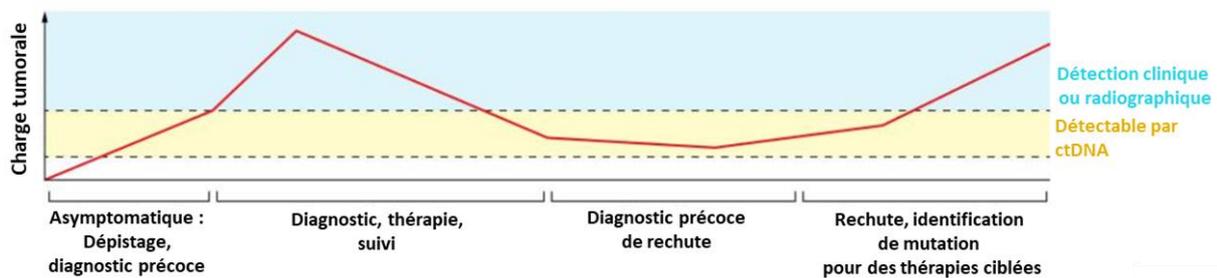


Figure 16 – Charge tumorale dans les différentes phases de développement d'un cancer (en rouge). La zone jaune correspond à la plage de détection d'ADN tumoral circulant (ctDNA) où la charge tumorale n'est pas détectable de manière classique. (Source : adapté de Dang et al. 2022⁸⁶)

1.3.3. Mécanisme de libération de l'ADN circulant

L'ADN circulant serait majoritairement issu de la mort des cellules (apoptose, nécrose) et la sécrétion active⁸⁷. L'apoptose, souvent appelée mort programmée de la cellule, provoque la dégradation de l'ADN et son clivage en unités de nucléosomes. La cellule est phagocytée et l'ADN est dégradé par des nucléases, mais lorsque le nombre de cellules mortes est important, les fragments d'ADN sont libérés dans la circulation sanguine. L'enroulement de l'ADN en nucléosome le protège des dégradations rapides des nucléases. Par nécrose, la libération de l'ADN se fait de manière beaucoup plus aléatoire, générant également des grands fragments (plus de 10 kb). Il a également été montré que les cellules étaient capables de sécréter de l'ADN, notamment via des microvésicules appelées exosomes. Cette sécrétion est d'autant plus forte chez les cellules cancéreuses, et elle semble affecter le microenvironnement de la tumeur en favorisant sa croissance^{88,89}. La sécrétion de ctDNA semble également impliquée dans le développement de métastases^{90,91}. Il a aussi été montré dans des études récentes que le cfDNA pouvait être engagé dans la réponse immunitaire⁹². Par exemple, Korabecna et al. (2020)⁹³ ont ainsi montré in-vitro que la présence de cfDNA dans le sang active une réponse immunitaire inflammatoire par la production d'interleukine 8.

Le cfDNA pourrait provenir également des cellules tumorales circulantes (CTC) mais n'en est pas la source première : Crowley et al. (2013)⁹⁴ calculent qu'une cellule humaine comporte 6 pg d'ADN et que le plasma sanguin comporte environ 17 ng d'ADN par mL à un stade avancé de cancer, qui proviendrait au moins de 2000 cellules/mL alors qu'on détecte moins de 10 CTCs pour 7,5 mL de sang.

On peut par ailleurs trouver du ctDNA dans d'autres fluides corporels comme l'urine⁹⁵ ou le liquide cébrospinal dans le cas de tumeurs cérébrales⁹⁶.

1.3.4. L'ADN circulant tumoral

Les ctDNA comportent les altérations génétiques et épigénétiques caractéristiques de certains cancers : mutation, hyperméthylation⁹⁷, hypométhylation⁹⁸. Les mutations sont l'altération de la séquence génétique, par exemple la substitution ou l'insertion de nucléotides. Dans le cas des cancers, il s'agit de mutations d'oncogènes qui favorisent la division cellulaire ou inhibent l'apoptose. Elle sont variées en fonction des types de cancer : on peut citer par exemple la mutation du gène KRAS, présente dans environ 30% des cancers⁹⁹, et qui favorise la prolifération des cellules¹⁰⁰. La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique, c'est-à-dire qu'il modifie l'expression d'un gène sans en changer la séquence, ici l'hyperméthylation inhibe son expression¹⁰¹. Elle consiste en l'addition d'un groupement méthyle sur la cytosine (qui devient 5-méthylcytosine) au niveau des sites CpG (segments CG dans la séquence). Par ailleurs, les profils de méthylation de l'ADN diffèrent entre les cellules en fonction de leur tissu d'origine¹⁰². On peut ainsi identifier le tissu à l'origine de la tumeur par l'analyse des méthylations : Liu et al. (2020)¹⁰³ indiquent par exemple une précision de 90% sur le tissu d'origine par l'analyse d'ADN circulant, et la détection de cancer à tous les stades pour plus de 50 types de cancers différents. Le diagnostic précoce avec spécificité pourrait améliorer considérablement le pronostic vital.

1.3.5. Concentrations et proportions des ADN circulants

La concentration en ADN circulant d'un patient sain serait entre 1 et 10 ng par mL de plasma⁸⁷ (le cfDNA des patients sains provient essentiellement de cellules hématopoiétiques, les cellules sanguines : globules blancs, plaquettes¹⁰⁴) alors qu'elle peut être supérieure à 1 µg/mL dans certains cancers⁹⁰. Le simple suivi de concentration en cfDNA peut être un indicateur suffisant pour déterminer le risque de présence de certains cancers¹⁰⁵. Les mesures de concentration sont assez variables en fonction des études, notamment en raison de la diversité des méthodes de prélèvement et de la cinétique de l'ADN circulant dans le sang¹⁰⁶ : l'ADN est progressivement dégradé dans le sang par des nucléases, et il est éliminé par les reins. Son temps de demi-vie varie en fonction des études et des cas, de quelques minutes à environ 2 heures¹⁰⁷.

La proportion des différents ADN circulants dans le sang diffère fortement en fonction du type de cancer : l'étude de Bettegowda et al. (2014)¹⁰⁸ montre la variabilité de détection de ctDNA pour différents cancers métastatiques, où les ctDNA sont systématiquement détectés dans les cancers colorectaux ou ovariens par exemple, alors qu'ils ne sont observés que dans moins de 50% des cas pour les cancers de la prostate ou de la thyroïde. De manière logique, la quantité de ctDNA augmente également avec l'agrandissement de la taille de la tumeur, de sorte qu'un cancer métastatique se traduira par une plus grande quantité d'ADN circulant dans le sang qu'un cancer localisé.

1.3.6. Structure et taille de l'ADN circulant

La Figure 17- gauche montre la répartition en taille d'ADN circulant en fonction de son origine. Il s'agit généralement d'ADN double brin. L'ADN circulant issu de l'apoptose est une échelle de multiples de 180-200 bp⁷⁴. Comme expliqué plus tôt, dans le noyau des cellules, l'ADN est enroulé autour de protéines appelées histones : ce complexe s'appelle un nucléosome et il est composé de 147 bp (Figure 17 – droite). Les nucléosomes sont reliés entre eux par des ADN linkers entre 20 et 90 bp. Alors que l'enroulement des histones préserve l'ADN, les linkers sont bien plus exposés aux nucléases (enzyme de coupure de l'ADN). On trouve également une périodicité de fragmentation de 10 bp correspondant à l'enroulement hélicoïdal de l'ADN et sa digestion par les nucléases. Cette fragmentation serait

davantage présente pour le ctDNA¹⁰⁹. Le cfDNA dans les urines est de taille plus petite, autours de 82 bp probablement en raison d'une plus grande activité des nucléases¹⁰⁴. Les ctDNA semblent être présents en taille légèrement inférieure (de 20 à 50 bp plus court¹⁰⁹) au cfDNA, même si des études indiquent du ctDNA majoritairement plus court que 100 bp¹¹⁰. Globalement, les ctDNA semblent présenter davantage de variabilité en taille que le cfDNA non cancéreux¹¹¹. L'ADN circulant fœtal est, lui aussi, de taille inférieure à l'ADN circulant de la mère¹¹². Les variabilités peuvent provenir des méthodes de prélèvement et préparation d'échantillon, il est donc important de noter que les études sont tributaires des méthodes d'analyses, comme l'indique l'article de Liu et al. (2021)¹¹³, et que le séquençage NGS implique une perte conséquente de fragments d'ADN en dessous de 150 bp créant ainsi des biais. Il en va de même pour l'ADN de plus grande taille (> 500 bp) qui n'est pas aussi efficacement séquençé en NGS^{114,115}. Par ailleurs, l'ADN extrachromosomal (eccDNA), sous forme circulaire, semble moins sensible aux exonucléases du plasma et produit ainsi des fragments de plus grandes tailles^{102,116}. Il constitue une nouvelle classe émergente de biomarqueurs.

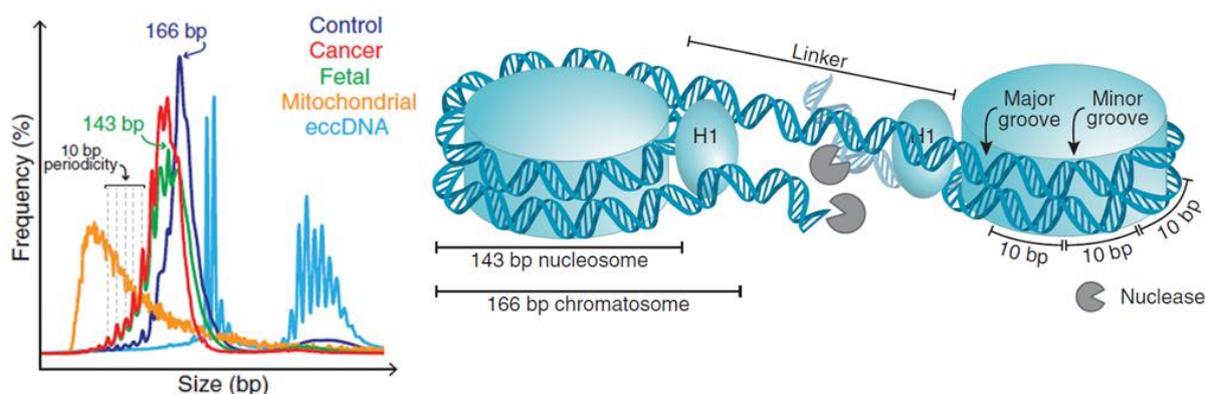


Figure 17 – (gauche) Répartition en taille de l'ADN circulant en fonction de son origine. (droite) Schéma représentatif des nucléosomes reliés par linker. La périodicité caractéristique de 10 bp serait lié à l'enroulement hélicoïdal de l'ADN. La région des linkers serait plus susceptible d'être digérée par les nucléases (Source : Lo et al. 2021¹⁰²).

On appelle « fragmentomique » l'analyse de taille (mais également des motifs terminaux, topologie, etc.) des fragments de cfDNA¹¹⁴. Poulet et al. (2021)¹⁴ proposent par exemple le développement d'une méthode de caractérisation de cfDNA par un facteur d'intégrité (rapport entre la quantité de différentes tailles de l'échantillon) qu'ils indiquent comme biomarqueur de cancer colorectal. La caractérisation en taille des fragments de cette étude est justement réalisée avec la technologie BIABooster (présentée plus tard dans ce manuscrit) de l'entreprise Adélis dont l'activité porte essentiellement sur la fragmentomique. Christiano et al. (2019)¹¹¹ exposent également la possibilité d'identifier le tissu d'origine uniquement à partir de la distribution en taille du cfDNA. La sélection spécifique en taille de l'échantillon d'ADN lors de sa préparation, peut améliorer significativement la détection de ctDNA comme le montrent Mouliere et al. (2018)¹¹⁷.

1.3.7. Bilan sur l'ADN circulant et les besoins en préparatif

Les méthodes d'analyse d'ADN circulant sont diverses : certaines impliquent l'utilisation de méthodes PCR (PCR quantitative –qPCR- pour la détection d'allèles mutants, PCR digitale –dPCR- pour une détection encore plus précise) qui sont sensibles et peu coûteuses mais qui sont limitées par leur vitesse d'analyse et leur spécificité à des variants connus¹¹⁸. De nombreuses méthodes impliquent du séquençage, particulièrement NGS, on peut citer Tagged-Amplicon deep sequencing pour la détection spécifique de mutations ciblées¹¹⁹. Lorsque la recherche se fait spécifiquement sur les méthylations de l'ADN, on peut réaliser des PCR méthylation-spécifiques ou bien des traitements au bisulfite en amont

du séquençage, ce qui provoque une transformation de la cytosine en uracile au niveau du site CpG¹²⁰. Illumina vend par exemple des puces spécifiques Infinium HumanMethylation.

Il semble important de collecter un volume suffisant de plasma pour récupérer l'ADN tumoral circulant, en particulier à un stade précoce de la maladie (moins de 10 copies de ctDNA dans 5 mL¹¹⁸). En faisant un calcul simple : estimons un cas où seulement 1% de l'ADN circulant est tumoral et la concentration globale de cfDNA est faible (1 ng/mL) : soit 10 pg/mL de ctDNA. Le génome humain représente 3,5 pg, il faudrait donc minimum 3 mL de sang sans perte pour espérer identifier la séquence du cancer.

La majorité de l'extraction de cfDNA à partir de sang se fait aujourd'hui par kit en colonne de silice, ou billes magnétiques (He et al. 2019, ici sur du sérum)¹²¹ et l'extraction par phénol/chloroforme est parfois préférée pour ses meilleurs rendements et qualités, même si elle souffre de sa toxicité^{122,123}. Selon le site de ThermoFisher, les billes sont préférables car elles ne sont pas sujettes au bouchage par les protéines qui peut avoir lieu sur colonnes. On peut trouver quelques articles qui comparent les différentes méthodes entre elles^{124,125} mais il est difficile de sortir des tendances claires.

Voici un tableau récapitulatif (Tableau 3) des deux méthodes les plus communes pour l'extraction de cfDNA :

| Méthode | Exemples | Volume de plasma | Rendement | Volume d'élution | Taille d'ADN | Temps |
|--------------------|--------------|------------------|-----------|------------------|--------------|------------------|
| Billes-magnétiques | MagMAX cfDNA | 500 µL - 10 mL | ~ 60% | 15-50 µL | 50 à 800 bp | 40 min (24 prep) |
| Colonne silice | QIAamp | 1-5 mL | ~ 40% | 20-150 µL | > 50 bp | 2 h (24 prep) |

Tableau 3 – Récapitulatif des méthodes les plus communes d'extraction de cfDNA.

On peut également comparer les kits entre eux : Warton et al. (2018)¹²⁶ comparent différents kits d'extraction de cfDNA sur colonne de silice. Il est assez difficile de mesurer de façon précise le rendement des kits, car il peut fortement dépendre du plasma (par exemple si le temps entre la collecte du plasma du patient et l'extraction d'ADN est trop élevé, les DNAses contenues dans le plasma auront davantage détérioré le cfDNA). Les auteurs rapportent un rendement maximal de 40% et quelques variabilités entre les kits, en particulier sur les biais d'extraction, avec certains kits qui favorisent l'extraction des plus grandes tailles par rapport aux plus petites, alors même que cette dernière contient la majorité du ctDNA. Rémi Malbec, un ancien doctorant au LAAS, a montré au cours de sa thèse des rendements faibles de l'ordre de 20% pour des kits d'extraction avec de l'ADN spiké dans le plasma (100 bp ladder et 1 kb ladder)¹³.

Les besoins en préparatif d'ADN circulant sont donc les suivants : traiter plusieurs mL, concentrer les tailles principalement dans une gamme de 100 bp à quelques centaines de bp, le tout dans un volume d'élution de quelques dizaines de µL.

1.4. Conclusion du Chapitre 1

Dans ce chapitre d'introduction, nous avons identifié deux applications, le séquençage et l'étude de l'ADN circulant, qui ont des besoins spécifiques de préparation de l'ADN en amont de l'analyse. Parmi ces besoins, on peut trouver l'extraction, la purification, la concentration et le fractionnement en taille. Nous avons vu qu'il existe un certain nombre de techniques capables de réaliser une ou plusieurs de ces étapes. A l'heure actuelle, la méthode phare de purification, très utilisée pour la préparation des séquençages, est la technique par billes magnétiques. Elle est efficace car rapide et facile à mettre en œuvre. Elle permet la purification, la concentration et le fractionnement grossier en taille, même si elle souffre de faibles rendements. Pour un fractionnement en taille plus précis, la technologie Pippin à base de migration sur gel est très efficace, mais longue et coûteuse. Pour isoler l'ADN circulant du plasma, les kits sont plus souvent à base de colonnes plutôt que de billes en raison des grands volumes à traiter. Le procédé de purification de grands volumes est plus long et fastidieux encore que pour les faibles volumes.

Nous allons tenter de positionner notre technologie sur trois volets applicatifs : le séquençage NGS, le séquençage nanopore et l'étude de l'ADN circulant. Comme leurs besoins en préparatif diffèrent, nous résumons leurs cahiers des charges respectifs dans le Tableau 4.

| Besoin \ Technique | Séquençage NGS (Illumina) | Séquençage TGS (nanopore) | ADN circulant dans le plasma sanguin |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|--|
| Plage de sélection en taille | 150 - 700 bp | > 10 kb | 100 - 200 bp |
| Volumes à traiter | 100 - 500 µL | 100 - 500 µL | 5 mL |
| Quantité d'ADN visée | 50 - 500 ng | 400 - 1000 ng | > 5 ng |
| Purification | Éventuelle | Éventuelle | Protéines (albumine ~ 40 g/L) Sels ~ 140 mM |

Tableau 4 – Cahier des charges de préparation pour 3 applications cibles.

Les séquençages NGS et TGS diffèrent par des besoins en taille radicalement différents, la gamme de taille des fragments est modérée pour la NGS (de 150 à 700 bp) contre du haut poids moléculaire (> 10 kb idéalement au-delà de 50 kb) pour la TGS. La TGS préférera également une quantité d'ADN élevée qui peut aller jusqu'à 1 µg. Nous verrons que les paramètres de fonctionnement de notre technologie devront s'adapter à cette différence de taille de fragments. Pour le traitement de plasma sanguin pour une visée d'étude d'ADN circulant, le défi consiste à purifier l'échantillon des sels et des protéines, traiter des grands volumes de solution de plusieurs mL, et être capable de concentrer des fragments de petites tailles entre 100 et 200 bp.

Dans les chapitres suivants, nous verrons comment répondre à ces besoins avec notre technologie.

Chapitre 2

La technologie μ LAS pour la concentration et la sélection en taille d'ADN

Migration transverse d'ADN en régime viscoélastique par actionnement électrohydrodynamique

A travers ce chapitre, nous allons introduire le principe physique sur lequel repose la technologie μ LAS avec la description de la migration transverse d'ADN dans un fluide viscoélastique sous actionnement hydrodynamique et électrique. Ensuite, nous aborderons les différents formats historiques à visée analytique de la technologie μ LAS que sont la puce microfluidique et le format capillaire développé à Adélis. Nous présenterons les résultats obtenus par Nicolas Milon sur format capillaire concernant le volet de préparation d'ADN et tâcherons d'en identifier les limites qui nous ont amené vers la création d'un nouveau format adapté à l'échelle préparative.

2.1. Introduction sur la technologie μ LAS

La technologie μ LAS (micro-Laboratoire pour l'Analyse et la Séparation) pour la concentration et la séparation en taille d'acides nucléiques fonctionne à l'aide de trois paramètres : l'actionnement électro-hydrodynamique, la viscoélasticité de la solution et enfin la géométrie. Le principe est illustré Figure 18. Dans un microcanal sous écoulement viscoélastique, et par l'actionnement d'un champ électrique en contre-électrophorèse, les molécules d'ADN subissent une force transverse vers la paroi du canal. Comme à chaque taille d'ADN correspond un point d'équilibre entre vitesse hydrodynamique et électrique, on peut séparer les molécules en fonction de leur taille grâce par exemple à une géométrie qui induit un gradient des vitesses. Nous verrons comment, avec diverses géométries et formats, il est possible de concentrer et séparer l'ADN selon sa taille.

Ainsi, en 2.2 nous étudierons l'origine de la force transverse puis nous verrons comment elle peut s'appliquer à la technologie μ LAS dans la partie 2.3.

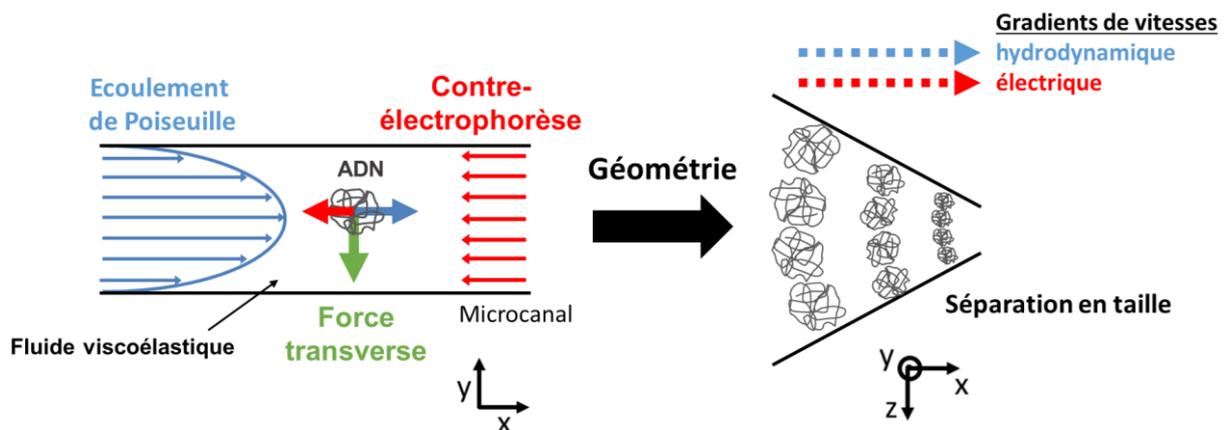


Figure 18 - Principe de la technologie μ LAS. L'axe x correspond à l'écoulement, y à l'axe de la force transverse.

2.2. Migration transverse en microfluidique pour la séparation en taille

Nous allons présenter le comportement physique de l'ADN sous cisaillement dans différents cas : dans un fluide Newtonien, un fluide viscoélastique, avec et sans champ électrique.

2.2.1. Généralités, fluides Newtonien et viscoélastiques

Les explications et équations indiquées dans ce paragraphe sont grandement issues du cours de rhéologie de Claude Verdier¹²⁷.

Un fluide Newtonien est un fluide dit purement visqueux, c'est-à-dire dont la réponse à la contrainte est linéaire et définie par sa viscosité dynamique η :

$$\sigma_t = \eta \dot{\gamma} \quad (6)$$

Avec σ_t contrainte tangentielle et $\dot{\gamma}$ le taux de cisaillement que l'on peut définir par :

$$\dot{\gamma} = \frac{\partial v_x}{\partial y} \quad (7)$$

Avec un écoulement selon x et une direction y tangentielle à l'écoulement. v_x représente la vitesse de l'écoulement. Le taux de cisaillement représente donc le gradient de la vitesse d'écoulement selon la

direction tangentielle c'est-à-dire la variation de la vitesse entre le centre et le bord du canal (voir Figure 19 pour la représentation d'un cisaillement simple).

L'eau est un fluide newtonien, tout comme une solution de glycérol.

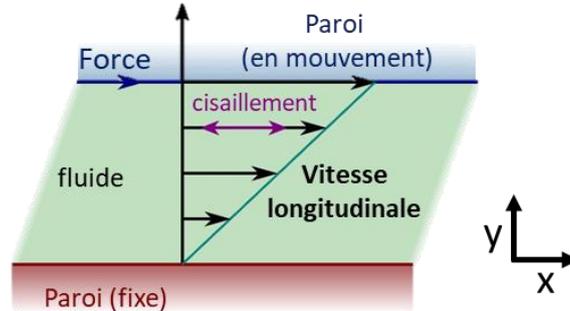


Figure 19 - Schéma de cisaillement simple. Une contrainte mécanique est appliquée parallèlement entre deux plaques autour du fluide. La vitesse du fluide est alors plus importante proche de la paroi en mouvement. Le profil de vitesse est ici linéaire : le taux de cisaillement est donc nul. (inspiré de <https://fluidan.com/different-types-of-rheometers/>, 2021).

Un fluide viscoélastique quant à lui se caractérise par la somme des propriétés purement visqueuse et purement élastique. Pour décrire le comportement des fluides non-newtoniens sous l'action d'une contrainte, le modèle le plus complet est celui à huit paramètres proposé par Oldroyd¹²⁸ (équation 9 dans Bird et Wiest, 1995)¹²⁹. Le modèle de Maxwell est une approximation de ce modèle par la suppression des termes de second ordre¹²⁹. Le système est alors équivalent à un amortisseur visqueux et un ressort linéaire mis en série, avec les équations de contrainte et déformation comme :

$$\sigma_A = \eta \dot{\gamma}_A \quad \text{et} \quad \sigma_R = E \gamma_R \quad (8)$$

Où les indices A et R désignent respectivement l'amortisseur et le ressort. E est le module élastique du ressort et η la viscosité de l'amortisseur. En exprimant la déformation totale comme $\gamma = \gamma_A + \gamma_R$, la réponse à la contrainte devient :

$$\tau \dot{\sigma}_t + \sigma_t = \eta \dot{\gamma} \quad (9)$$

Avec τ le temps de relaxation élastique ($\tau = \frac{\eta}{E}$).

Pour mieux comprendre, si le fluide est sollicité rapidement ($t \ll \tau$) le comportement est élastique ($\sigma_t \sim E\gamma$) alors que s'il est sollicité sur des temps longs ($t \gg \tau$) il aura une réponse visqueuse ($\sigma_t \sim \eta\dot{\gamma}$) telle que définie plus haut pour un fluide Newtonien. Quand le fluide n'est soumis à aucune déformation ($\dot{\gamma} = 0$) alors le fluide relaxe avec un temps τ : l'équation (9) devient $\tau \dot{\sigma}_t + \sigma_t = 0$ ce qui revient à l'expression de la contrainte comme $\sigma_t(t) = \sigma_0 e^{-t/\tau}$ avec σ_0 la contrainte initiale. La solution générale par intégration de l'équation (9) selon Maxwell donne¹³⁰ :

$$\sigma_t(t) = \frac{\eta}{\tau} \int_{-\infty}^t \exp\left(-\frac{t-t'}{\tau}\right) \dot{\gamma}(t') dt' \quad (10)$$

Alors que la viscosité est uniquement fonction de la température dans un fluide Newtonien, elle est fonction du taux de cisaillement dans un cas viscoélastique : cette non-linéarité est par exemple prise en considération dans le modèle de Giesekus¹³¹ (équation 11 dans Bird et Wiest, 1995)¹²⁹. Les solutions aqueuses de polymère comme le PVP (Polyvinylpyrrolidone) ou le PEG (Polyéthylène glycol) ont des propriétés viscoélastiques.

2.2.2. Régime des écoulements

Le nombre de Reynolds constitue le ratio entre les forces inertielles et visqueuses dans un écoulement, et permet ainsi d'en définir le régime :

$$Re = \frac{\rho V L_c}{\eta} \quad (11)$$

Avec ρ masse volumique, V vitesse caractéristique de l'écoulement, L_c longueur caractéristique de l'écoulement (diamètre du canal).

Nous nous placerons ici dans un cas où le nombre de Reynolds $\ll 1$, ce qui correspond à un régime laminaire où les forces visqueuses dominent les effets inertiels, par opposition à un régime turbulent.

Un écoulement laminaire se présente sous la forme d'un profil dit de Poiseuille. L'équation de Poiseuille, soit le profil de vitesse hydrodynamique dans le sens de l'écoulement z selon la position radiale r , dans le cas d'une canalisation à section circulaire s'exprime comme :

$$v_z(r) = v_{max} \left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right) \quad (12)$$

Avec v_{max} la vitesse maximale au centre du canal, R le rayon du canal.

Ce profil parabolique de vitesse induit donc un cisaillement, de plus en plus grand lorsque l'on s'approche de la paroi du canal. Dans notre repère cylindrique on a :

$$\dot{\gamma}(r) = \frac{\partial v_z(r)}{\partial r} = \frac{-2rv_{max}}{R^2} \quad (13)$$

2.2.3. Migration transverse sous cisaillement hydrodynamique

Un certain nombre d'articles décrivent le comportement de billes rigides et de polymères face à un cisaillement dans un fluide Newtonien ou viscoélastique, en modélisation, de manière analytique ou expérimentale.

Ho & Leal (1976)¹³² démontrent qu'il existe une force de lift perpendiculaire au flux dans un écoulement de Poiseuille pour un fluide non newtonien. Ils donnent l'expression analytique suivante (à partir de l'équation 3.7 dans l'article¹³²) :

$$F \sim v_{max}^2 \left(1 - \frac{r}{R} \right) \frac{a^3 N_1}{R^3 \dot{\gamma}^2} \quad (14)$$

Avec a taille de la bille et N_1 la différence de contrainte normale que nous allons exprimer.

Plaçons-nous dans un repère cartésien pour la suite des calculs. Dans un cisaillement simple selon l'axe x avec un gradient de vitesse en y , la matrice symétrique des contraintes est sous la forme :

$$\tilde{\sigma} = \begin{pmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & 0 \\ \sigma_{12} & \sigma_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{33} \end{pmatrix} \quad (15)$$

La matrice de déformation et le taux de cisaillement s'expriment donc comme :

$$\Gamma = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ \gamma & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad \text{et} \quad \dot{\Gamma} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ \dot{\gamma} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (16)$$

L'équation de Maxwell dans Bird et Wiest (1995)¹²⁹, s'exprime de manière matricielle comme :

$$\tilde{\sigma} + \tau \left\{ \frac{d\tilde{\sigma}}{dt} - (\dot{\Gamma}^\dagger \cdot \tilde{\sigma} + \tilde{\sigma} \cdot \dot{\Gamma}) \right\} = -\eta(\dot{\Gamma} + \dot{\Gamma}^\dagger) \quad (17)$$

En régime stationnaire $\frac{d\tilde{\sigma}}{dt} = 0$ et l'expression devient :

$$\begin{pmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & 0 \\ \sigma_{12} & \sigma_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{33} \end{pmatrix} - \tau \begin{pmatrix} 0 & \dot{\gamma} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & 0 \\ \sigma_{12} & \sigma_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{33} \end{pmatrix} - \tau \begin{pmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & 0 \\ \sigma_{12} & \sigma_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{33} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ \dot{\gamma} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \\ = -\eta \begin{pmatrix} 0 & \dot{\gamma} & 0 \\ \dot{\gamma} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Il s'ensuit :

$$\begin{pmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & 0 \\ \sigma_{12} & \sigma_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{33} \end{pmatrix} - \tau \dot{\gamma} \begin{pmatrix} 2\sigma_{12} & \sigma_{11} & 0 \\ \sigma_{11} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} = -\eta \begin{pmatrix} 0 & \dot{\gamma} & 0 \\ \dot{\gamma} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (18)$$

On en déduit la valeur des coefficients :

$$\sigma_{11} = 2\tau\eta\dot{\gamma}^2 ; \quad \sigma_{12} = -\eta\dot{\gamma} ; \quad \sigma_{22} = 0 ; \quad \sigma_{33} = 0 \quad (19)$$

N_1 et N_2 les différences de contraintes normales sont définies telles que :

$$N_1(\dot{\gamma}) = \sigma_{11} - \sigma_{22} = 2\tau\eta\dot{\gamma}^2 \quad \text{et} \quad N_2(\dot{\gamma}) = \sigma_{22} - \sigma_{33} = 0 \quad (20)$$

Dans un fluide Newtonien, les contraintes normales restent isotropes sous écoulement : $\sigma_{11} = \sigma_{22}$. On aura donc N_1 nul. Par conséquent, de manière analytique, la force transverse est nulle dans un régime Newtonien.

En développant (14) à partir de notre expression de N_1 en (20), nous obtenons :

$$F \sim 2\eta\tau v_{max}^2 \left(\frac{R}{r} - 1 \right) r \frac{a^3}{R^4} \quad (21)$$

Leshansky et al. (2007)¹³³ décrit la migration transverse de billes dans un écoulement de Poiseuille, Newtonien et viscoélastique, de manière analytique et expérimentale (Figure 20). Par simplification, leur expression de la force transverse est :

$$F \sim a^3 \frac{\partial N_1(\dot{\gamma})}{\partial r} \quad (22)$$

On obtient alors :

$$F \sim 2\eta\tau a^3 \frac{\partial \dot{\gamma}^2}{\partial r} = 16\eta\tau v_{max}^2 r \frac{a^3}{R^4} \quad (23)$$

Cette force transverse est donc fonction du gradient de cisaillement, et elle est fortement dépendante de la taille de la particule. Elle entraîne une concentration des billes vers le centre dans une solution viscoélastique, comme Leshansky le montre expérimentalement Figure 20 b¹³³. De manière attendue, cette force n'est pas présente dans un fluide Newtonien où la répartition des billes est homogène dans le canal (Figure 20 a).

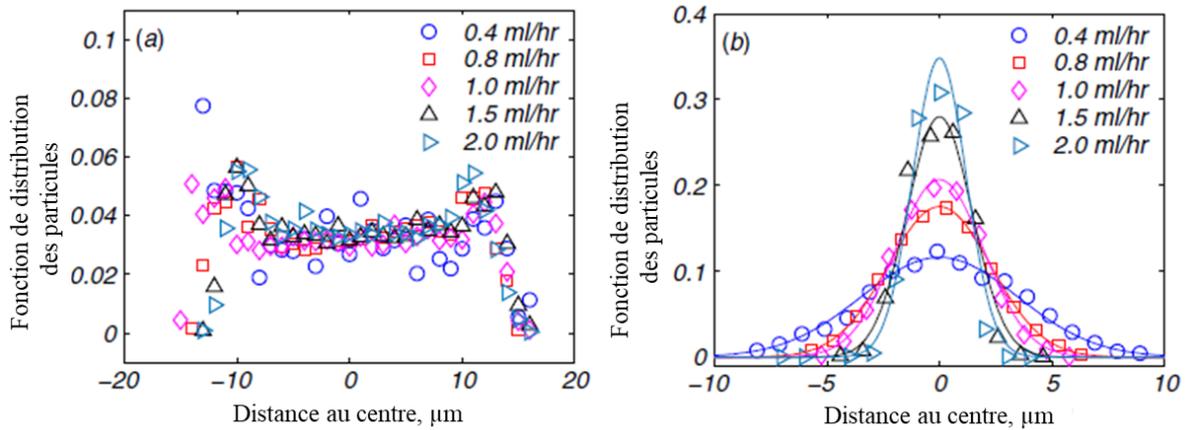


Figure 20 – Résultats expérimentaux de la distribution de billes de polystyrène de $8\mu\text{m}$ dans un canal sous actionnement hydrodynamique dans des solutions de (a) glycérol (fluide Newtonien) ou (b) PVP (viscoélastique) (Source: Leshansky et al. 2007¹³³)

Dans les travaux de Leshansky cependant, l'objet considéré est une bille et l'ADN peut adopter une conformation différente en fonction de sa taille et du canal, comme l'établissent Graham et al. (2011)¹³⁴. Les longues molécules d'ADN subissent une déformation significative sous l'action d'un cisaillement de telle sorte que le modèle de bille rigide ne s'applique plus^{135,136}. Teixeira et al. (2005)¹³⁷ exposent par exemple la conformation en ellipsoïde mais aussi des phénomènes d'étirement, culbute et enroulement d'ADN λ sous l'action du cisaillement. Usta et al. (2006)¹³⁸ simulent le comportement de polymères sous l'action d'un cisaillement Newtonien : une migration transverse peut avoir lieu tantôt vers le centre de la canalisation, tantôt vers la paroi, en fonction du confinement. Même si le comportement n'est pas complètement compris, la théorie thermodynamique implique une migration vers le cisaillement le plus faible, car c'est la position la plus stable qui maximise l'entropie du polymère. Par ailleurs, l'interaction hydrodynamique du polymère (modélisé par des billes reliées par des ressorts) avec la paroi tend à l'éloigner du bord par la tension exercée entre une bille entraînée (plus grande vitesse vers le centre du canal) et une bille traînante (plus faible vitesse vers la paroi)^{139,140}.

Pour conclure, dans un fluide Newtonien, il n'y a pas de migration transverse de billes rigides sous l'action unique d'un cisaillement. Cependant, on peut trouver une force transverse pour de longues chaînes de polymères (ADN de grande taille) en raison de leur élasticité intrinsèque. Dans le cas d'un fluide viscoélastique en revanche, des billes rigides comme des polymères subissent une migration transverse vers une zone de plus faible cisaillement (centre de la canalisation dans le cas d'un écoulement de Poiseuille).

2.2.4. Migration transverse sous cisaillement hydrodynamique et champ électrique

Le comportement de l'ADN sous l'action simultanée d'un écoulement de Poiseuille et d'un champ électrique, présenté Figure 21, est différent dans le cas où le champ électrique est appliqué en opposition au champ hydrodynamique (cas co-courant : les vecteurs vitesses hydrodynamique et électrique sont de sens identique) et le cas où le champ électrique est appliqué dans la même direction que le champ hydrodynamique (cas contre-courant : vecteurs vitesses en sens opposés). Comme représenté sur la section transversale dans la Figure 21, dans le cas co-courant l'ADN tend à se concentrer au centre du canal, alors que le cas contre-courant présente une concentration de l'ADN sur les bords du canal. Bien que ce comportement ait lieu dans un fluide Newtonien comme dans un fluide viscoélastique, l'origine physique du comportement de l'ADN est différente¹⁴¹.

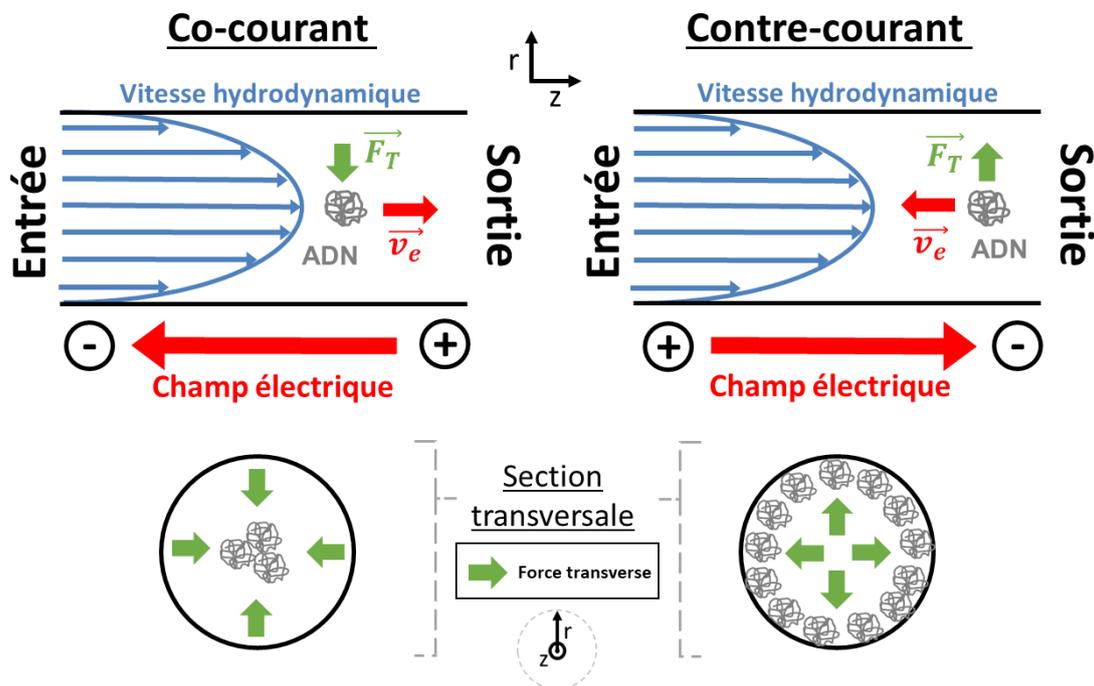


Figure 21 - Comportement de l'ADN dans un microcanal, dans un régime co-courant (vitesse hydrodynamique et électrophorétique selon le même sens) et un régime contre-courant (respectivement sens opposé). \vec{v}_e représente le vecteur vitesse électrophorétique. La force transverse \vec{F}_T qui s'exerce sur l'ADN est vers le centre dans le cas co-courant et vers la paroi dans le cas contre-courant.

2.2.4.1 Cas du fluide Newtonien sous l'action d'un champ électrique

A titre d'exemple, Zheng et al. (2002)¹⁴² ont montré de manière expérimentale la migration transverse d'ADN λ dans un capillaire d'électrophorèse dans le cas d'un fluide Newtonien : la concentration au centre du canal dans le cas co-courant, et l'éloignement vers le bord en contre-courant. On trouvera dans la littérature des modèles analytiques^{138,143}, des simulations et observations expérimentales^{144,145}, très souvent par Jason Butler, qui apportent des éléments d'analyse.

Arca et al.¹⁴³ donnent les explications qui suivent. Le profil de Poiseuille qui génère un gradient de taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ (nul au centre du canal et maximal près du bord) étire et oriente le polymère selon un angle θ par rapport à la direction de l'écoulement (à gauche sur la Figure 22). Le polymère peut être modélisé comme une chaîne de billes (cercles pleins), chaque bille représentant un court segment d'ADN et les billes se repoussant entre elles par répulsion stérique. La bille contient l'ADN chargé et

ses contre-ions. Un champ électrique appliqué à une bille polarisable génère un champ d'écoulement dipolaire (à droite sur la Figure 22). Dans le cas de la bille de gauche, la vitesse transverse maximale du champ d'écoulement se trouve à environ 45° (représenté par un cercle). Cela entraîne le soulèvement de la bille adjacente qui exerce elle-même un effet similaire sur la première bille (représenté par un carré). Ainsi, lorsque le champ électrique et l'écoulement sont concourants, le polyélectrolyte est déplacé vers le centre du canal. Dans le cas inverse, avec un champ et un écoulement en opposition, le polyélectrolyte est poussé vers les parois du canal.¹⁴³

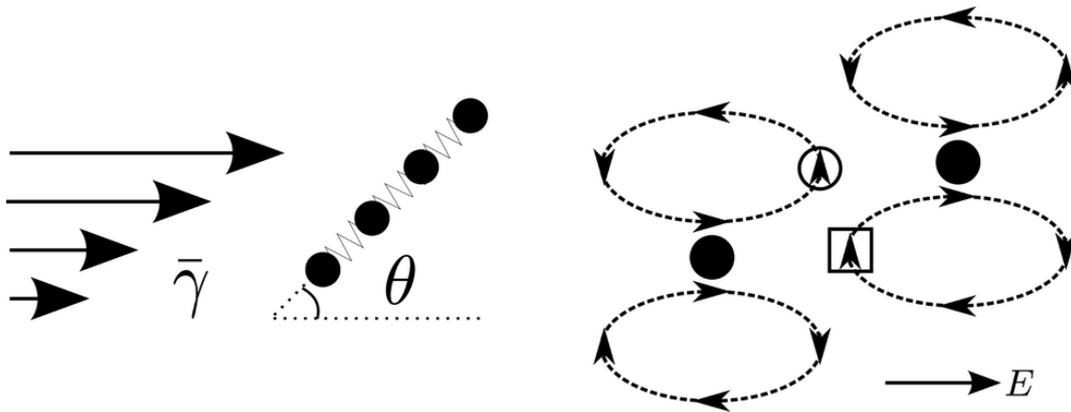


Figure 22 - Illustration de la migration d'un polyélectrolyte par la combinaison d'un cisaillement et d'un champ électrique. (Source Arca et al. 2015¹⁴³)

Ce régime est confirmé par des expériences dans l'article d'Arca et al. pour la concentration d'ADN λ dans une solution tampon classique de TAE. La théorie des blobs (billes) pour le comportement de l'ADN se vérifie pour des tailles importantes de molécules, puisque les billes sont généralement des ensembles d'1,5 kb. Nous savons expérimentalement, notamment par les travaux de thèse de Nicolas Milon¹⁵, qu'une force transverse est bien présente dans un fluide newtonien pour des grandes molécules d'ADN, alors qu'elle n'est pas observée pour des petits fragments en-dessous d'1 kb. L'ajout de PVP pour induire une viscoélasticité, même en très faible concentration (< 0,1% dans les expériences de Nicolas Milon), découple la migration transverse.

2.2.4.2 Régime viscoélastique sous l'action d'un champ électrique

Notre équipe, avec les travaux de Socol (2019)¹⁴⁶ expose le comportement non stationnaire de l'ADN λ dans un écoulement viscoélastique sous l'action d'un champ électrique : sa conformation bien que plus compacte que dans le cas d'actionnement d'écoulement seul, présente également d'importantes fluctuations et contractions intermittentes.

Bayan Chami dans sa thèse^{147,148} exprime le comportement de l'ADN sous l'action d'un écoulement viscoélastique, avec champ électrique (cas contre-courant). Son modèle concerne l'ADN de petite taille (< 1000 bp) qu'elle assimile à des billes de rayon a . Comme il n'existe pas d'expression analytique exacte dans la littérature, on utilise dans ce cas une approche qualitative, en se basant sur l'expression de la force transverse exprimée par Leshansky (équation 22) qu'elle exprime à une position radiale donnée ε comme :

$$F(\varepsilon) = -2\pi K\eta\tau a^3 \frac{\partial \dot{\gamma}^2(\varepsilon)}{\partial r} \quad (24)$$

où K est une constante. On se placera encore une fois dans un système cylindrique où l'écoulement est selon l'axe du canal z , et où la force transverse est dirigée selon l'axe radial r .

Si l'on considère maintenant que la bille est soumise à une électrophorèse en opposition qui induit une vitesse électrophorétique indépendante de sa position, et que l'on néglige toute interaction avec le bord du canal, la vitesse de la bille $v_b(\varepsilon)$ s'exprime comme :

$$v_b(\varepsilon) = v_z(\varepsilon) - v_e \quad (25)$$

$v_z(\varepsilon)$ est la vitesse de l'écoulement à la position ε et v_e la vitesse électrophorétique (indépendante d' ε) qui s'exprime comme :

$$v_e = \mu E \quad (26)$$

Avec μ la mobilité électrophorétique de la bille et E le champ électrique.

Etudions maintenant la variation du taux de cisaillement. En exprimant le taux de cisaillement avec variation infinitésimale Δr de la position ε , on peut exprimer les taux de cisaillement en haut et en bas de la bille de rayon a , respectivement $\dot{\gamma}_{haut}$ et $\dot{\gamma}_{bas}$:

$$\dot{\gamma}_{haut} \approx \frac{v_z(\varepsilon + a + \Delta r) - v_b(\varepsilon + a)}{\Delta r} \quad \text{et} \quad \dot{\gamma}_{bas} \approx \frac{v_b(\varepsilon - a) - v_z(\varepsilon - a - \Delta r)}{\Delta r} \quad (27)$$

Par développement limité à l'ordre 2 (Taylor), on obtient :

$$\frac{\dot{\gamma}_{haut}}{\dot{\gamma}_{bas}} \approx \frac{dv_z(\varepsilon \pm a)}{dr} \pm \frac{\Delta r}{2} \frac{d^2 v_z(\varepsilon \pm a)}{dr^2} \pm \frac{v_e}{\Delta r} \quad (28)$$

On peut alors exprimer la différence des carrés des taux de cisaillement comme :

$$\dot{\gamma}_{haut}^2 - \dot{\gamma}_{bas}^2 = (\dot{\gamma}_{haut} + \dot{\gamma}_{bas})(\dot{\gamma}_{haut} - \dot{\gamma}_{bas}) \quad (29)$$

$$\dot{\gamma}_{haut} + \dot{\gamma}_{bas} = \frac{d}{dr}(v_z(\varepsilon + a) + v_z(\varepsilon - a)) + \frac{\Delta r}{2} \frac{d^2}{dr^2}(v_z(\varepsilon + a) - v_z(\varepsilon - a)) \quad (30)$$

$$\dot{\gamma}_{haut} - \dot{\gamma}_{bas} = \frac{d}{dr}(v_z(\varepsilon + a) - v_z(\varepsilon - a)) + \frac{\Delta r}{2} \frac{d^2}{dr^2}(v_z(\varepsilon + a) + v_z(\varepsilon - a)) + \frac{2v_e}{\Delta r} \quad (31)$$

En négligeant les termes en $v_z(\varepsilon + a) - v_z(\varepsilon - a)$ et en approximant $v_z(\varepsilon + a) + v_z(\varepsilon - a) \sim 2v_z(\varepsilon)$:

$$\dot{\gamma}_{haut}^2 - \dot{\gamma}_{bas}^2 = \frac{2}{\Delta r} \frac{dv_z(\varepsilon)}{dr} \left[2v_e + \Delta r^2 \frac{d^2 v_z(\varepsilon)}{dr^2} \right] \quad (32)$$

En considérant que Δr est de l'ordre de grandeur de a , on approxime la valeur de la force transverse exprimée en (22) par :

$$F_T(\varepsilon) = -4\pi K\tau\eta a \frac{dv_z}{dr}(\varepsilon) \left[2v_e + a^2 \frac{d^2 v_z}{dr^2}(\varepsilon) \right] \quad (33)$$

En injectant la formule du profil de Poiseuille $v_z(r) = v_{max} \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right)$ pour la vitesse hydrodynamique, avec $a \ll R$, on obtient finalement :

$$F_T(r) = 16\pi K\tau\eta a v_{h0} v_e \frac{r}{R^2} \quad (34)$$

A partir de cette formule on comprend qu'une force transverse pousse les molécules d'ADN vers le bord du canal sous l'action de la contre-électrophorèse et que cette force est fonction des paramètres d'actuation (la pression et la tension font varier respectivement v_{h0} et v_e), de la taille du canal R , des propriétés du fluide (plus il est viscoélastique plus la force sera grande) mais aussi fonction de la taille de la molécule a . Nous allons voir dans le paragraphe suivant comment, à l'aide de certaines géométries et d'un contrôle hydrodynamique et électrique, il est possible de concentrer les molécules d'ADN et les séparer en taille.

2.3. La technologie μ LAS

Même si les procédés présentés dans cette section n'ont pas pour but de purifier de l'ADN, mais plutôt de l'analyser, nous allons revenir sur les formats historiques de la technologie μ LAS. Le format sur puce microfluidique illustre très bien la séparation spatiale de différentes tailles d'ADN d'un échantillon, et la technologie par capillaire BIABooster d'Adélis est la technique d'analyse d'échantillon utilisée durant cette thèse. Nous présenterons ensuite comment cette technologie peut être appliquée dans une visée de préparation d'échantillon et l'idée émergente à l'origine de ce projet de thèse.

2.3.1. μ LAS sur puce microfluidique

Le premier format de développement de la technologie μ LAS qui s'appuie sur le principe physique expliqué plus haut est un format sur puce microfluidique réalisé par des procédés de microfabrication sur silicium et verre. La puce est ainsi constituée d'un microcanal selon un profil de resserrement en constriction (Figure 23 A). Un contrôleur de pression branché à la puce permet l'injection de solution, et la tension est appliquée avec des électrodes. La géométrie spécifique de la puce permet l'apparition d'un gradient de champ électrique et de vitesse hydrodynamique dans le sens d'écoulement du canal, avec des valeurs maximales à l'apex. L'ADN est marqué en fluorescence (intercalant YOYO-1) afin d'être observé en microscopie. Dans la Figure 23 B, un 50 bp ladder (une échelle d'ADN allant de 50 bp à 1 kb) est injecté. Sous l'action d'une électrophorèse en opposition, on voit l'apparition de différentes bandes d'ADN qui correspondent aux différentes tailles de l'échantillon (Figure 23 B et C). Pour chacune de ces tailles, un couple vitesse hydrodynamique / champ électrique définit une condition de plaquage et d'arrêt de la molécule sur la paroi du canal. Par ce procédé les différentes tailles sont concentrées et séparées spatialement dans la puce.

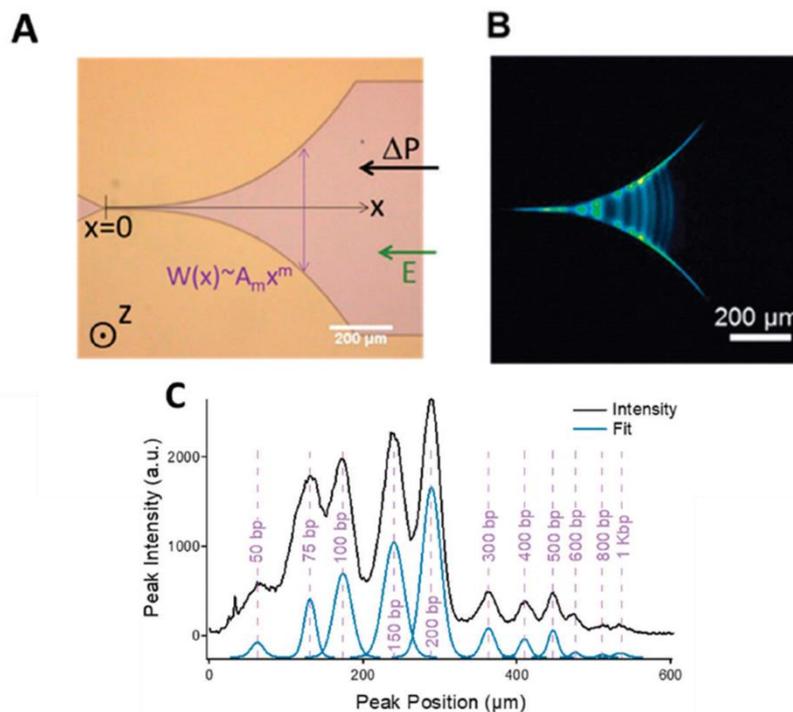


Figure 23 –Principe de la technologie μ LAS sur puce microfluidique. (A) Schéma du canal. La géométrie est en profil x^3 ce qui génère un fort gradient de champ électrique et de vitesse hydrodynamique le long de l'axe d'écoulement (maxima atteints en $x=0$ au niveau de la constriction). (B) Image en fluorescence de la séparation d'un 50 bp ladder d'ADN marqué au YOYO-1 dans une solution viscoélastique à 18% massique de PVP 40 kDa sous l'action d'une pression de 7 bar et d'une tension de 300 V (vitesse hydrodynamique maximale de 146 mm/s et vitesse électrophorétique de 4,6 mm/s). (C) Profil d'intensité de fluorescence le long de l'axe d'écoulement (en noir) et son fit (en bleu). Les pics correspondent aux différentes tailles du ladder. (Tiré de Chami et al. 2018 ¹⁴⁷)

La Figure 24 permet d'insister sur l'importance du couple vitesse hydrodynamique et champ électrique pour la définition d'une condition d'arrêt de l'ADN. Dans l'espace des paramètres d'actionnement on peut définir trois régimes : un régime de domination par l'hydrodynamique, un régime de domination par l'électrophorèse, et finalement un troisième régime où le couple est suffisant à l'arrêt de l'ADN.

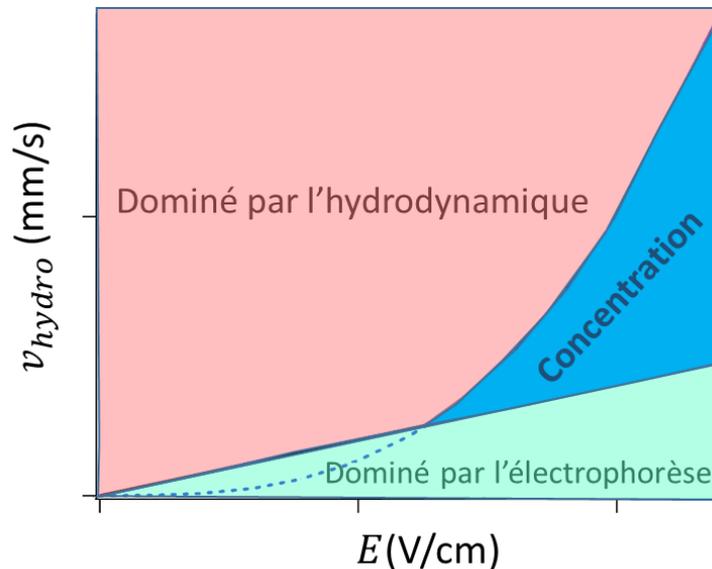


Figure 24 – Diagramme de phase des paramètres d'actionnement, vitesse hydrodynamique et champ électrique. En bleu, le couple de vitesse et champ permet l'arrêt de l'ADN et donc sa concentration. (Adapté de Tijunelyte et al. 2022¹⁴⁹)

Bayan Chami démontre ainsi un modèle prédictif des positions d'arrêt de molécules d'ADN dans une puce microfluidique, pour des tailles allant de 300 à 1000 bp, en contrôlant les profils hydrodynamiques et électrophorétiques dans la constriction¹⁴⁷. Le format avec puce microfluidique a été appliqué à différentes études, en particulier en raison de ses grandes capacités de détection. Rémi Malbec (2019)¹⁵⁰ a pu par exemple appliquer ce format à l'étude de la maladie de Huntington. Comme cette maladie se caractérise par l'expansion de régions répétées dans un gène (répétitions trinuéotidiques), μ LAS est appliqué pour déterminer la taille de ces fragments de régions répétées. L'utilisation de μ LAS, par sa très forte sensibilité, permet d'une part de s'affranchir de trop nombreuses répétitions de fragments par PCR afin de limiter les risques d'amplifications non spécifiques, et d'autre part de réaliser la détection de manière rapide (< 5 min). Inga Tijunelyte (2021)¹⁵¹ montre également comment la détection de séquences spécifiques peut être appréhendée avec μ LAS avec l'utilisation de molecular beacons¹⁵², (balises moléculaires) qui sont des sondes qui changent de conformation et deviennent fluorescentes en s'hybridant à une séquence spécifique, ici de micro-ARN. Elle parvient à obtenir une limite de détection à 2 pM en 30 s, et à montrer son application à la détection de microARN spécifique sur des échantillons patients (biopsie à l'aiguille fine chez des patients atteints de cancer du pancréas). Le dernier article coécrit (Tijunelyte et al. 2022)¹⁴⁹ présente une limite de détection de séquence spécifique encore améliorée par l'utilisation d'une puce microfluidique fabriquée par procédé de lithographie en niveau de gris. Mon apport personnel concernant cet article, est la réalisation de simulations COMSOL afin d'identifier l'augmentation des gradients hydrodynamiques et électriques sur le nouveau format de puce.

2.3.2. μ LAS sur capillaire : BIABooster

Toujours sur le même principe physique, la technologie a été commercialisée dans un format capillaire par l'entreprise Adélis sous le nom de BIABooster. Cette dernière a été utilisée dans le cadre de cette étude pour analyser la concentration et la distribution en taille des échantillons collectés à la suite de leur traitement sur dispositif μ LAP.

Le dispositif BIABooster est constitué de deux capillaires de diamètres différents (330 μ m pour la chambre d'injection contre 50 μ m pour le capillaire de séparation) reliés l'un à l'autre. De la même manière que précédemment, la solution viscoélastique avec ADN est injectée dans le dispositif formant un écoulement de Poiseuille, et un champ électrique qui génère une contre-électrophorèse est appliqué. La première étape consiste à concentrer toutes les tailles d'ADN de l'échantillon par l'application d'un champ électrique élevé (Figure 25). Dans la chambre d'injection, la force transverse qui s'applique sur l'ADN n'est pas suffisante pour le plaquer sur les parois du canal, la vitesse hydrodynamique domine et l'ADN est amené dans le capillaire de séparation (Figure 25 A). Dans le capillaire de séparation, la force transverse qui s'applique sur l'ADN est forte ce qui le pousse vers la paroi du canal (Figure 25 B). Là, le profil de Poiseuille implique une vitesse hydrodynamique quasi nulle, à la différence de la vitesse électrophorétique qui reste forte. L'électrophorèse domine donc sur les parois du capillaire de séparation : l'ADN est alors ramené à la jonction entre les deux capillaires (Figure 25 C). La jonction entre les deux capillaires constitue alors une zone de concentration où l'ADN est accumulé à mesure qu'il est injecté.

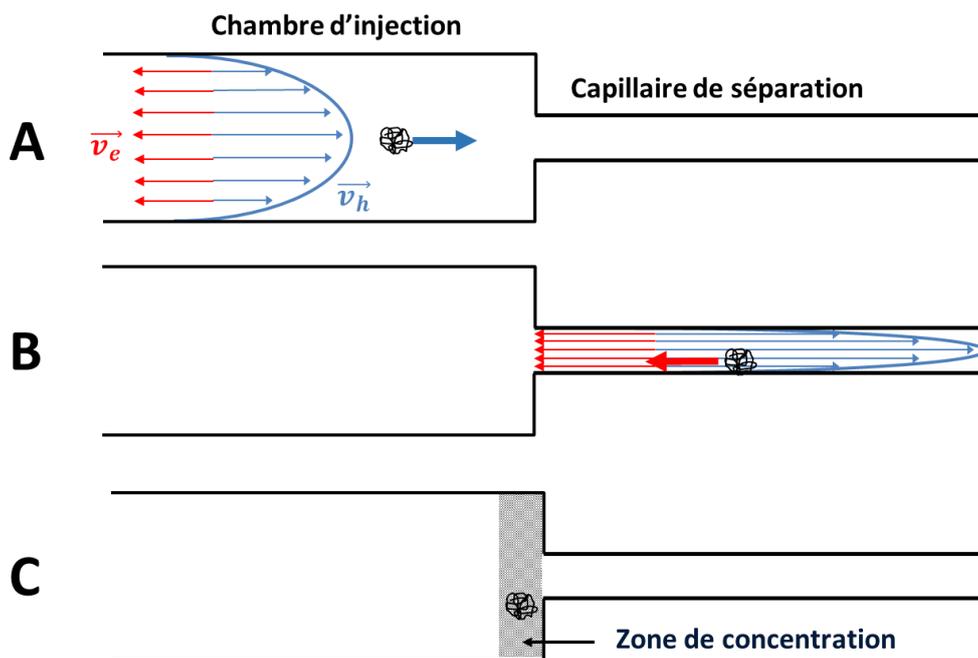


Figure 25 - Principe de concentration d'ADN dans un système capillaire BIABooster (A) Injection de l'ADN vers le capillaire de séparation (B) La force transverse arrête l'ADN à la paroi dans le capillaire de séparation, et l'ADN est ramené par l'électrophorèse à la jonction (C) L'ADN forme une zone de concentration à la jonction entre les deux capillaires.

Après la phase de concentration, les différentes tailles d'ADN sont séparées par la diminution progressive du champ électrique appliqué. Comme les conditions d'arrêt de l'ADN sont dépendantes de la taille, la diminution du champ libère progressivement les différentes tailles, des plus petites aux plus grandes (Figure 26). La taille et la concentration de l'échantillon étudié sont comparées à une référence (ladder) comportant des tailles et concentrations connues.

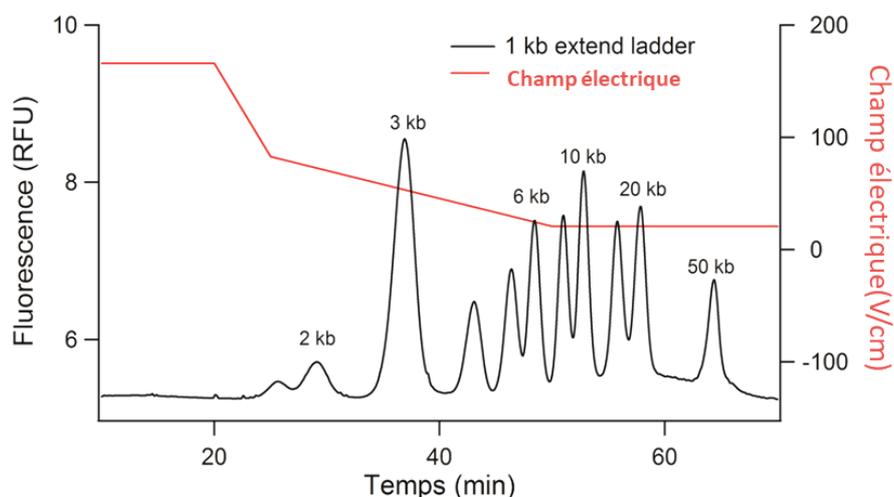


Figure 26 – Analyse BIABooster d'un 1kb extend ladder d'ADN. En rouge est représentée l'évolution du champ électrique au cours du temps. Le plateau correspond à la concentration de l'ADN et le gradient à la séparation, par la libération successive des tailles concentrées à la jonction des capillaires. La courbe noire représente l'intensité de fluorescence collectée par un détecteur en aval du capillaire de séparation. L'ADN marqué en fluorescence par YO-PRO 1 est observé par différents pics de détection au cours du temps qui correspondent aux différentes tailles comprises dans le ladder.

Pour sa commercialisation, ce système est pour le moment intégré à une machine d'électrophorèse capillaire d'Agilent (CE 1600 ou 7100) où le capillaire simple est remplacé par un dispositif BIABooster et où le détecteur UV natif est remplacé par un détecteur de fluorescence ZETALIF avec source fabriqué par Adélis (dans notre cas une source laser). L'utilisation de cette technologie permet l'obtention d'un profil de concentration et de taille d'un échantillon d'ADN avec une limite de détection à l'état de l'art de $10 \text{ fg}/\mu\text{L}^{153}$ (à noter que cette limite de détection est atteinte pour une taille d'ADN d'1 kb, et que la limite de détection est de $100 \text{ fg}/\mu\text{L}$ dans le cas du 100 bp). Le système BIABooster fonctionne actuellement avec deux kits commerciaux : le premier kit 1k permet l'analyse d'un échantillon de 100 à un peu plus de 1500 bp, alors que le deuxième kit 10k permet l'analyse d'ADN de plus grande taille, de 1 à 10 kb environ de manière reproductible, même si de récentes optimisations de méthodes semblent ouvrir la voie vers l'analyse de taille jusqu'à plus de 100 kb. Les spécifications des kits sont résumées dans le Tableau 5. Nous utiliserons essentiellement le kit 1k pour analyser nos échantillons.

| Analytical specifications | DNA 1K Kit | DNA 10K Kit |
|------------------------------|---|---|
| Sizing range | 0.1-1.5 kb | 1-10 kb |
| Limit of detection (S/N = 3) | 10 pg/ml at 1 kb 100 pg/ml at 100bp | 10 pg/ml at 10 kb 30 pg/ml at 1 kb |
| Sizing accuracy | +/- 3% | +/- 3% (from 1kb to 6kb) +/- 5% (from 6kb to 10kb) |
| Sizing reproducibility | 3% CV | 3% CV |
| Quantitative range | 5-1000 ng/ml for cfDNA | 0.5-400 ng/ml for DNA smear |
| Quantitative precision | 20% CV | 20% CV |
| Quantitative accuracy | 20% | 20% |
| Minimum sample volume | 10 μl (1 μl injected) | 10 μl (1 μl injected) |
| Maximum salt concentration | 15 mM | 15 mM |

Tableau 5 - Spécifications des kits commerciaux d'analyse d'ADN sur technologie BIABooster par Adélis. Tiré du site internet d'Adélis (<https://www.adelis-tech.com/wp-content/uploads/2016/08/DNA-KitsSpecs.png> le 18/08/2022)

Adélis est également capable d'analyser des échantillons de plasma de manière directe, sans kit de préparation, simplement avec un prétraitement. A l'heure actuelle, l'entreprise participe à une étude clinique avec les Hôpitaux de Marseille (SCHISM), pour l'intérêt du suivi d'ADN circulant dans le traitement de différents cancers : mélanomes, cancers des reins, de la vessie et du poumon, entre autres, sur une cohorte de 260 patients. Cela correspond à l'analyse de plus de 900 échantillons patients.

Le temps d'analyse d'un échantillon pour un kit 1k est d'environ 40 min, mais il faut ajouter à cela une étape de lavage préliminaire d'environ 60 min et l'analyse d'une référence. Il est également possible de réaliser l'analyse sur des échantillons plus salés jusqu'à 130 mM mais moyennant un temps d'analyse plus long.

2.4. Vers un format adapté pour le préparatif

2.4.1. Performances du BIABooster en préparatif

Nicolas Milon pendant sa thèse¹⁵, a développé la fonction de fractionnement en taille pour le préparatif d'échantillons d'ADN de haut poids moléculaire sur système capillaire. Nous allons voir le principe et les résultats obtenus.

La procédure de fractionnement, qu'il appelle « vanne électrique » est illustrée Figure 27. Après concentration de l'ADN par l'application d'une haute tension (Figure 27-1), au lieu de procéder à une diminution progressive de la tension comme c'est le cas pour l'analyse au BIABooster (Figure 26), on procède par échelons. Le fractionnement est ici un filtre passe-bas : en appliquant un certain couple vitesse hydrodynamique / champ électrique, on détermine une certaine taille seuil, que l'on appellera cut-off dans la suite de ce manuscrit, au-delà de laquelle toutes les tailles d'ADN sont arrêtées et concentrées à la jonction entre les deux capillaires. Dans l'exemple de la Figure 27 où l'échantillon comporte uniquement deux tailles d'ADN (6 et 10 kb), la tension est réduite après l'étape de concentration, de sorte que le champ électrique ne soit plus suffisant pour retenir l'ADN de 6 kb, tout en gardant la bande à 10 kb concentrée à la jonction. La fraction d'ADN de taille plus petite que le cut-off (ici 6 kb) fuit dans le capillaire puis est collectée en sortie (Figure 27-2). Pour finir, en relâchant totalement la tension, tout l'ADN de taille supérieure au cut-off (ici 10 kb) qui était retenu à la jonction fuit dans le capillaire et on collecte *in fine* une fraction de haut poids moléculaire (Figure 27-3).

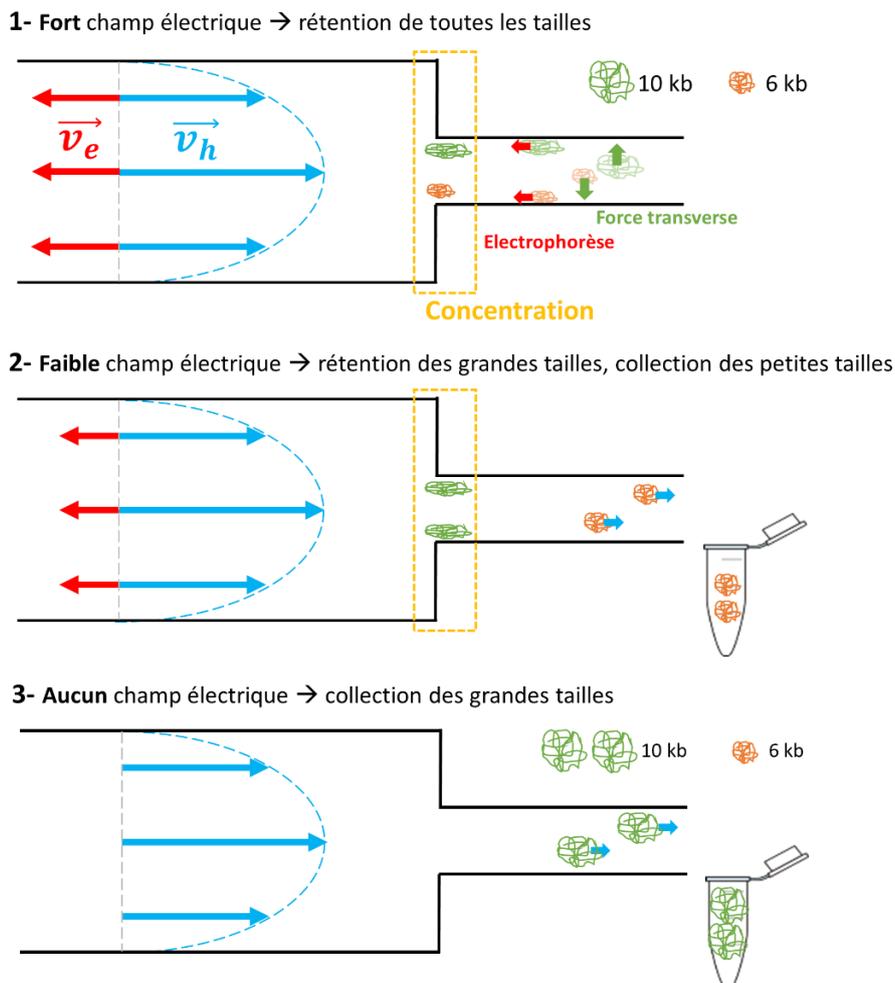


Figure 27 - Principe de fractionnement en taille sur système capillaire (inspiré de Milon et al. 2019¹⁵⁴)

La Figure 28 expose les résultats d'analyse du fractionnement d'un ladder¹⁵⁴. En appliquant un champ de 54 V/cm (vitesse hydrodynamique à 1 mm/s), il obtient un cut-off autour de 7 kb : on voit distinctement que le ladder a été fractionné en deux avec d'une part une fraction contenant les bandes de bas poids jusqu'à 6 kb (correspondant à la phase Figure 27-2) et d'autre part une fraction de haut poids pour toutes les tailles au-dessus de 8 kb (Figure 27-3). Il reporte un rendement autour de 80% pour toutes les bandes de l'échantillon.

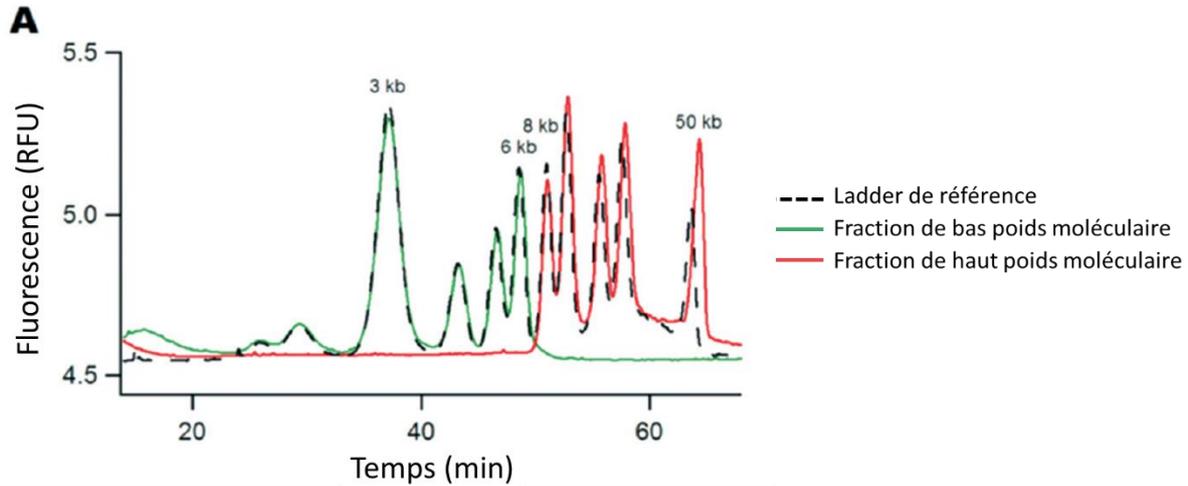


Figure 28 - Fractionnement en taille sur monocapillaire d'un 1 kb ladder extend. Chromatogramme obtenu sur analyse BIABooster. (tiré de Milon et al. 2019¹⁵⁴).

Nicolas Milon démontre ensuite que le cut-off est adaptable (dans une gamme de 3 à 40 kb) et prédictible à partir des paramètres d'actionnement. La variation du cut-off selon son développement analytique s'exprime comme¹⁵⁴ :

$$N_c = \frac{k_B T v_{max}}{\mu^3 E^3} \quad (35)$$

Avec k_B constante de Boltzmann, T température, μ la mobilité de l'ADN dans la solution, v_{max} vitesse hydrodynamique maximale au centre du canal, E champ électrique.

Après une série de 13 expériences avec des paramètres variés de pression et champ, il vérifie que la variation du cut-off suit bien une loi en $\frac{v_{max}}{E^3}$ comme prédit.

Nicolas Milon démontre l'applicabilité de cette fonction de préparation pour du séquençage de 3^{ème} génération^{154,155} malgré les problèmes de saturation qui empêchent le traitement de grandes quantités d'ADN comme nous allons le voir juste après.

2.4.2. Saturation du BIABooster et système multicapillaire

Nicolas Milon précise les limites du système BIABooster. Dans le but d'orienter la technologie vers la préparation d'ADN pour du séquençage d'ADN de 3^{ème} génération, il souhaite produire des grandes quantités d'ADN (pour rappel nous avons estimé le besoin à plusieurs centaines de ng dans notre premier chapitre – voir 1.2.4). Il expose la saturation d'un système monocapillaire qui présente des faiblesses dans la rétention d'ADN à la jonction dès 0,2 ng¹⁵⁴. A noter que la saturation d'un monocapillaire pour des tailles faibles (< 1 kb) est aux alentours de 3 ng. La Figure 29 illustre le phénomène de saturation observé en fluorescence à la jonction. En injectant une trop grande quantité d'ADN (ici 8 ng), l'ADN forme des agrégats visibles qui ne restent pas retenus de manière stable.

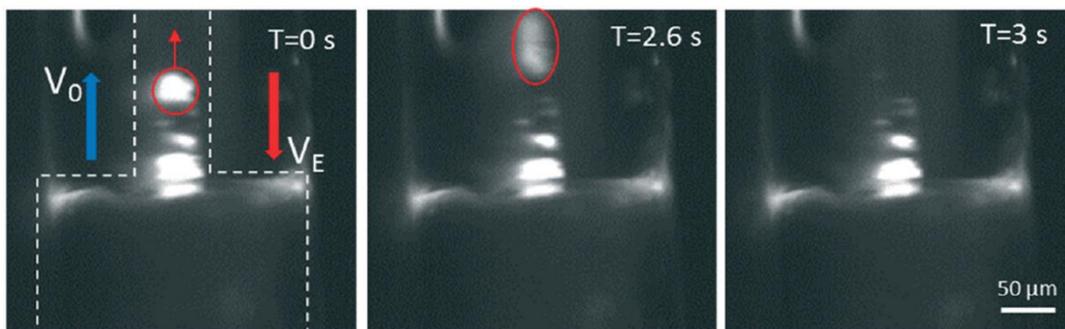


Figure 29 - Saturation du système BIABooster. Images en fluorescence d'ADN de haut poids moléculaire (8 ng de 50 kb) durant un procédé de sélection en taille (54 V/cm ; 1,5 mm/s). Les molécules sont concentrées à la jonction entre les capillaires (contours en pointillés blancs). L'agrégat lumineux entouré en rouge n'est pas retenu et fuit de la constriction. (tiré de Milon et al. 2019¹⁵⁴)

Pour parvenir à préparer une grande quantité d'ADN tout en évitant la saturation, il a développé un système multicapillaire, qui parallélise le procédé sur 61 lumières. Comme attendu, la saturation semble être observée à environ 15 ng. Malgré tout, la manipulation du système multicapillaire est très fastidieuse et comporte de plus faibles rendements que le système monocapillaire. Pour garantir une faible fuite d'ADN le procédé avait été réalisé 4 fois consécutives avec une concentration de 5 ng par expérience, dans le but d'isoler de gros fragments d'ADN génomique. La durée de chaque expérience était de 40 min et nécessitait un contrôle permanent par l'utilisateur. Le décalage important par rapport aux spécifications de centaines de ng rend le système insuffisant pour des applications approfondies dans le domaine du séquençage de 3^{ème} génération.

2.4.3. Parallélisation par membrane isopore

Après d'excellentes performances de la technologie μ LAS sur le volet analytique, avec notamment la technologie capillaire BIABooster, et des résultats très encourageants sur le volet préparatif pour le haut poids moléculaire, l'entreprise Adélis et le LAAS avaient pour optique de poursuivre le développement du préparatif sur un format différent et plus adapté. Les problématiques visées sont celles détaillées dans le Chapitre 1 (récapitulées dans le Tableau 4), même si elles présentent des caractéristiques assez distinctes que l'on rappelle : la purification d'ADN circulant dans le sang nécessite la concentration de petits fragments d'ADN (de 100 à 200 bp essentiellement) faiblement concentrés dans un grand volume (plusieurs mL) d'une solution complexe, qui comporte des protéines et des sels ; la préparation d'échantillons pour le séquençage ADN diffère s'il s'agit de NGS (purification d'ADN de taille modérée- 200 à 700 bp- pour une quantité d'ADN finale idéalement > 50 ng) ou de TGS (idéalement longs fragments > 50 kb avec une grande quantité d'ADN > 500 ng).

De ces problématiques, on évalue que la technologie doit être capable d'éviter les défauts de saturation présents dans le système capillaire et évoqués plus haut, tout en permettant de traiter des grands volumes rapidement. En effet, le système capillaire souffre d'un temps de traitement assez long pour des applications de préparation : Nicolas Milon indique un débit de 170 nL/min¹⁵⁴ pour un monocapillaire. Le format puce avec des débits d'environ 30 nL/min n'est pas non plus compétitif sur ce volet. Pour le traitement de plusieurs mL de plasma sanguin, un format avec débit bien supérieur est nécessaire. Un troisième défaut qui était surtout présent à l'époque de développement du projet concernait le traitement du plasma. L'application d'un champ électrique élevé pour la captation d'ADN de petite taille génère des courants élevés dans le capillaire qui produisent un échauffement significatif. Cet échauffement est d'autant plus grand que le champ électrique est élevé sur une distance centimétrique, que l'écoulement est trop faible pour refroidir le dispositif par injection de solution et que l'intégration du capillaire dans la cassette de CE ne permet pas un refroidissement externe efficace.

Le nouveau format doit donc inclure des canaux moins longs afin de limiter spatialement l'échauffement.

Le format que nous avons choisi est celui des membranes isopores, présenté dans la section suivante. μ LAS y est démultiplié de manière importante par des centaines de milliers de canaux fluidiques qui fonctionnent de manière simultanée avec un débit important permettant le traitement de plusieurs mL de solutions en quelques minutes.

Chapitre 3

Matériels et méthodes : μ LAP pour le préparatif d'ADN

Concentration et sélection en taille d'ADN en solution par membrane isopore

Ce chapitre a pour but de présenter les éléments constitutifs de la technologie μ LAP qui vise à la préparation d'échantillons ADN. Dans un premier temps nous présentons la membrane isopore qui est l'élément géométrique nécessaire à la concentration de l'ADN dans le système. Nous montrons ensuite comment cette membrane est intégrée dans un dispositif fluide imprimé en 3D par procédé de stéréolithographie, puis nous décrivons les électrodes qui permettent l'application de la tension, les solutions tampons utilisées dans nos expériences. Enfin, nous donnons un diagramme de montage d'expérience.

3.1. Membranes isopores

Les membranes isopores utilisées dans le cadre de notre recherche ont été achetées à l'entreprise it4ip¹⁵⁶. Le procédé de fabrication¹⁵⁷ de ces membranes consiste à bombarder une membrane plastique -dans notre cas Polycarbonate (PC) ou Polytétrahydrofur (PET)- avec des ions lourds générés par un accélérateur de particules (cyclotron). La membrane, d'une épaisseur pouvant varier de quelques μm à plusieurs centaines de μm est alors perforée de part en part. Elle subit ensuite une attaque chimique qui vise à élargir les traces d'endommagement afin d'obtenir des pores d'une taille donnée et sensiblement parallèles. La densité de pores est adaptée par la vitesse de balayage du film dans le dispositif d'irradiation et l'intensité du rayon. La taille des pores est quant à elle définie par la durée du traitement d'attaque chimique (voir Figure 30).

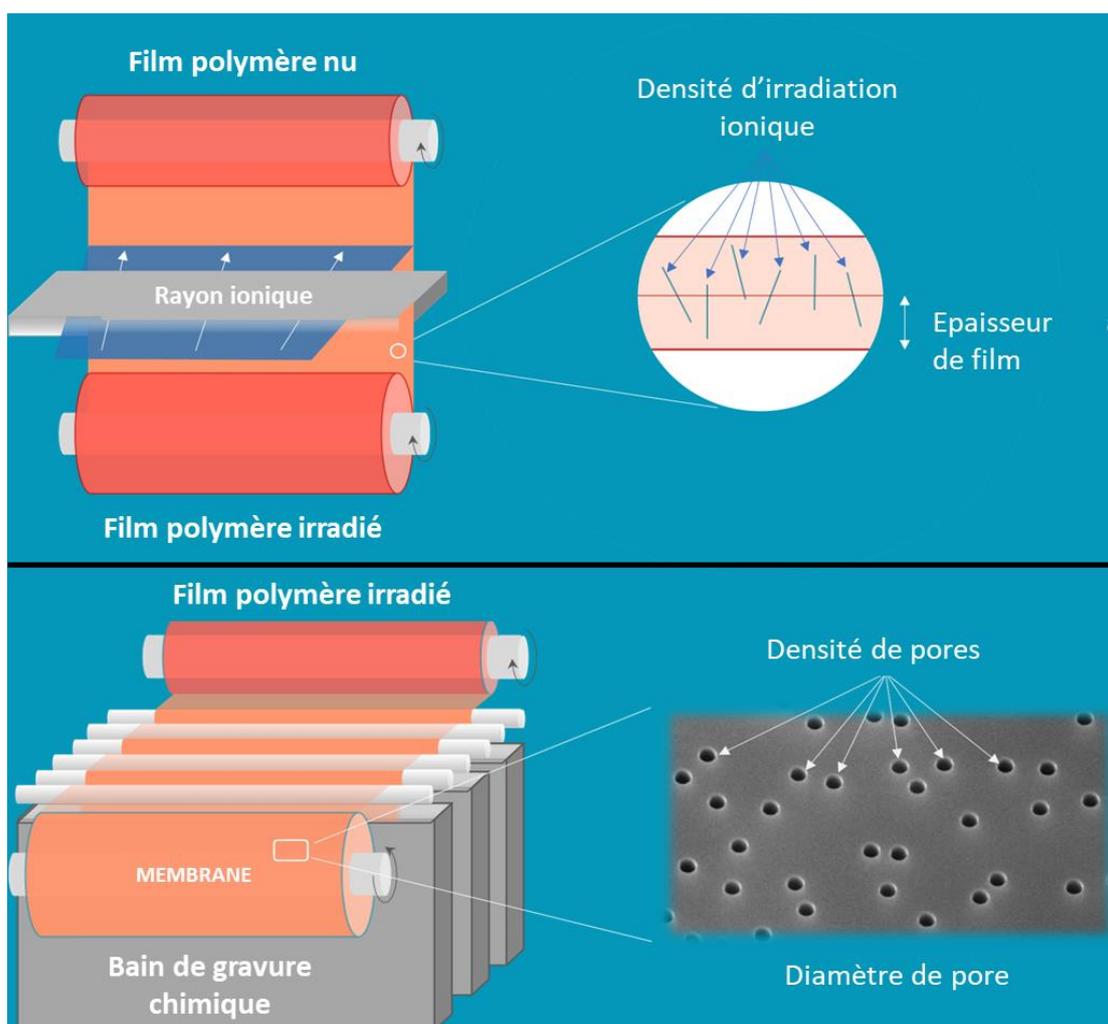


Figure 30- Procédé de fabrication de membrane isopore. (adapté de www.it4ip.be)

Son rapport d'aspect (tailles des trous par rapport à l'épaisseur) est particulièrement exceptionnel. L'obtention de structures similaires en technologies de salle blanche comme par exemple le dry film est bien plus laborieuse et coûteuse. Le coût est d'une centaine d'euros pour une feuille A4, ce qui représente une centaine d'expériences en considérant un usage unique. Le cœur de la technologie repose sur un élément à bas coût, ce qui ouvre plus facilement la voie vers une dimension industrielle de la technologie.

Durant cette thèse, nous avons comparé des membranes en PC et en PET, possédant des pores de 2 ou 5 μm , une épaisseur de 23 à 123 μm et une densité de pores de 10^5 à 4.10^5 cm^{-2} . Les membranes achetées présentent toutes un coating PVP afin de les rendre hydrophiles.

Lorsqu'une référence à une membrane sera faite dans ce document, par souci de simplicité, elle le sera par ses caractéristiques "diamètre de pores [μm] - épaisseur [μm] densité de pores [cm^{-2}]" (par exemple 2-123 10^5 pour une membrane de pores 2 μm , d'épaisseur 123 μm et de densité de pores de 10^5 cm^{-2}).

3.2. Dispositif par impression 3D

Afin d'assurer les fonctions fluidiques et électriques sur la membrane isopore, cette dernière doit être intégrée à un dispositif. L'impression 3D par stéréolithographie est la méthode que nous avons choisie afin de fabriquer ce dernier.

3.2.1. Principe de fonctionnement de l'impression 3D par stéréolithographie

L'impression 3D est une technique en croissance dans la recherche, mais également dans le milieu industriel, artistique et civil, car elle donne une grande liberté dans la conception et la fabrication de design afin de produire des pièces de prototypage rapidement. Par conséquent les applications sont nombreuses¹⁵⁸ : aéronautique¹⁵⁹, médical¹⁶⁰, mode¹⁶¹, etc.

Historiquement, l'impression 3D, autrement appelée fabrication additive, est née en 1984 par le brevet de C. Hull avec un procédé de stéréolithographie (SLA)¹⁶². Ce procédé repose sur l'utilisation d'une résine liquide de photopolymère, qui est solidifiée à l'aide d'un laser ultraviolet, couche après couche. La Figure 31 présente de manière schématique le fonctionnement d'une imprimante 3D de SLA dite inversée (upside-down) telle qu'utilisée le plus communément : contrairement au modèle inventé par Hull, la source laser est en dessous du réservoir, et la pièce est imprimée à l'envers, en dessous de la plateforme d'impression. La plateforme d'impression mobile selon l'axe z est plongée dans un bac transparent (PDMS) rempli de résine d'impression, de sorte qu'il ne reste qu'une fine couche de résine entre la plateforme (ou la dernière couche imprimée) et le fond du bac. Sous ce dernier, un laser UV est orienté à l'aide de miroirs galvanométriques afin d'insoler précisément la résine selon une série de points sur le plan (x,y). Une fois la couche polymérisée, donc solidifiée sur la plateforme (ou la dernière couche imprimée), la plateforme est remontée pour laisser la résine combler à nouveau le fond du bac. Le processus est répété pour chaque couche jusqu'à l'impression totale du modèle.

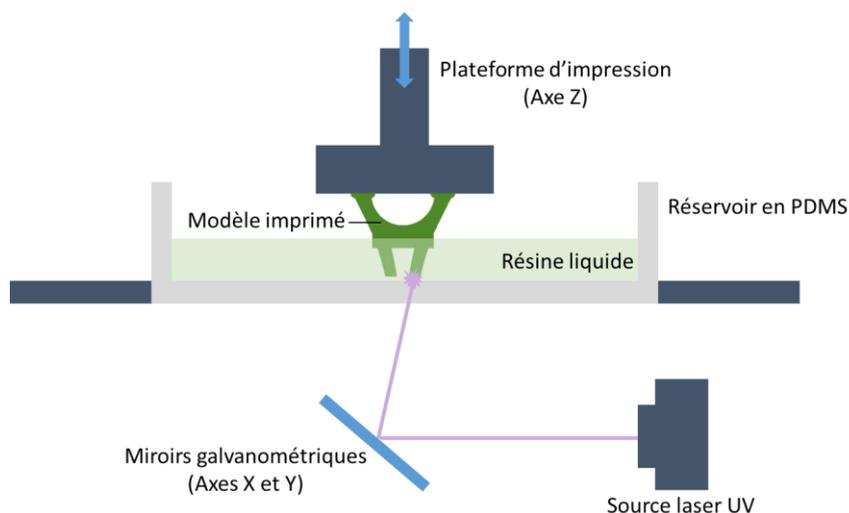


Figure 31 - Schéma de fonctionnement d'une imprimante 3D par stéréolithographie (SLA) dite inversée (upside-down).

Il existe de nombreuses autres technologies d'impression 3D¹⁶³, toutes présentent des avantages et des inconvénients selon leurs coûts, temps d'impression, résolutions, matériaux, etc. La SLA fait partie de la famille des impressions à photodurcissement (photocuring). On peut citer par exemple dans cette famille, l'impression par digital light processing (DLP)^{164,165} qui diffère légèrement du procédé SLA par l'utilisation d'un projecteur à écran numérique en source lumineuse à la place d'un laser. Ici tous les points de la couche sont polymérisés simultanément à l'aide d'une matrice de micro-miroirs (DMD), permettant ainsi de gagner en temps d'impression tout en gardant une bonne résolution à défaut d'être plus chère¹⁶⁶. Une autre classe d'imprimantes 3D, davantage utilisée par le grand public en raison de sa plus grande facilité d'utilisation et son plus faible coût est l'imprimante par dépôt de matière fondue (FDM)¹⁶⁷. Ici un fil de polymère thermoplastique est chauffé à l'extrémité d'une buse, puis la pièce est extrudée sur une plateforme, ou bien une précédente couche, avant de se resolidifier à température ambiante. Cette technique souffre néanmoins d'une plus mauvaise qualité de surface que le procédé SLA¹⁶³.

3.2.2. Conception par ordinateur

La conception du modèle à imprimer est réalisée sur un logiciel de CAO (conception assistée par ordinateur). FreeCAD, un logiciel libre de CAO, a été utilisé pour la conception des pièces de cette thèse. On trouve couramment d'autres logiciels comme SolidWorks ou Fusion 360 pour réaliser le même type de pièce. Tous ces logiciels sont dits « paramétriques » (parametric feature based modeler) : des esquisses et des objets subissent une succession de fonctions paramétrables (dimensionnement, extrusion, contraintes, etc.) répertoriées dans un arbre d'historique. Par exemple, la modélisation volumique s'appuie sur des primitives simples (sphère, cylindre, cube, cône, etc.) qui vont être modifiées par des opérations booléennes (fusion, soustraction) jusqu'à obtenir une pièce plus complexe (voir exemple Figure 32).

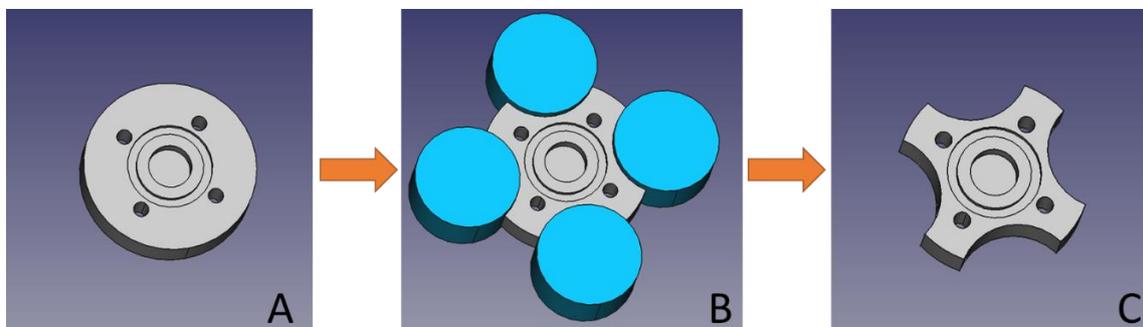


Figure 32- Représentation 3D d'une opération de soustraction sur FreeCAD. La pièce initiale [A] subit la soustraction d'autres pièces en bleu [B] afin de devenir la pièce [C].

3.2.3. Imprimante, résine et choix dédiés à cette technologie

L'imprimante utilisée dans le cadre de cette thèse est une DWS Digitalwax 029 J+. Il s'agit d'une imprimante SLA pouvant imprimer des objets jusqu'à une taille de 15 cm x 15 cm x 10 cm avec une résolution X-Y d'environ 30 μ m et une résolution en Z minimale de 10 μ m. Les impressions ont été réalisées avec une résine acrylique DS3000 de marque DWS. Cette résine, créée à l'origine pour des guides chirurgicaux dentaires, a l'avantage d'être transparente (à faible épaisseur uniquement), rigide et biocompatible (classe I dans la réglementation de dispositifs médicaux 93/42/EEC). Sa transparence est utile dans notre cas, à la fois pour vérifier la bonne impression de canaux internes et pour observer l'intérieur de la pièce en cours d'expérience.

L'impression de nos pièces par SLA est particulièrement adaptée car elle nous permet d'imprimer des pièces d'une taille conséquente (plusieurs cm) avec une résolution fine ($<100\ \mu\text{m}$ nécessaire pour notre géométrie). Une imprimante FDM aurait manqué de résolution, et à l'inverse une imprimante en lithographie 2-photons, plus précise mais plus lente n'aurait pas été adaptée à la grande dimension de nos objets.

3.3. Electrodes

Dans cette partie, nous discutons de l'intégration d'électrodes au dispositif et leur matériau. La géométrie des électrodes est en forme de grille pour des raisons d'uniformité du champ électrique comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

3.3.1. Matériau et procédé de fabrication d'électrodes

Nous avons testé différents matériaux d'électrodes : acier inox, nickel, or et platine, chacun présentant des avantages et inconvénients en termes de propriétés chimiques (corrosion), physiques (ductilité) et coût.

Les premières électrodes testées étaient en nickel (Ni) et d'épaisseur de $50\ \mu\text{m}$. Elles ont été fabriquées par un procédé de stéréolithographie et électrodéposition en salle blanche au LAAS. Sur un wafer de silicium, avec couches de titane et cuivre, est laminé un film sec selon un motif négatif à la grille. La surface résultante qui comporte le motif de grille expose la couche de cuivre, qui est conductrice. Le wafer est alors plongé dans un bain électrolytique où il va jouer le rôle de cathode. Une anode en nickel est plongée dans le bain. Le passage d'un courant électrique entre les électrodes engendre une oxydation du nickel et la libération d'ions Ni^{2+} ; à l'inverse une réduction des ions Ni^{2+} contenus dans l'électrolyte va déposer du nickel sur la surface de cuivre du wafer. Le film sec est ensuite retirée du wafer. Pour isoler la couche de Ni du reste du wafer (Si, Ti, Cu), ce dernier est plongé dans un bain d'hydroxyde de potassium puis un mélange piranha (acide sulfurique et peroxyde d'hydrogène).

Nous avons également testé des électrodes de nickel avec une couche d'or. Cette couche d'or est déposée par le même type de procédé d'électrodéposition. Cependant, les électrodes en Ni présentent toujours une couche d'oxydation qui rend le dépôt d'or peut stable.

Pour les électrodes de platine, nous avons sous-traité la fabrication à une entreprise de découpe laser (Auray Laser) car cette méthode de fabrication s'avérait la moins coûteuse pour l'obtention de grilles avec un design personnalisé. Leur épaisseur est de $400\ \mu\text{m}$.

3.3.2. Corrosion des électrodes

La corrosion des électrodes est le produit de leur oxydation. Dans notre cas la corrosion est dite galvanique : elle est issue de l'application d'un champ électrique entre les électrodes en présence d'un électrolyte¹⁶⁸. La corrosion se cantonne à l'anode (pôle positif) où a lieu l'oxydation (pertes d'électrons et libération d'un cation). L'acier inox et le nickel ont été de très bons candidats pour des premiers tests en raison de leur faible coût, mais ils se sont avérés trop sensibles à la corrosion. Le caractère « inoxydable » de l'acier est évidemment trompeur, l'acier inox qui comporte généralement du chrome et du nickel reste soumis à l'oxydation galvanique. La corrosion est également considérablement plus importante lorsque l'électrolyte comporte des ions chlorures. La Figure 33 illustre la corrosion de grilles de nickel lors du passage de plusieurs dizaines de mA pendant environ 30 min avec un électrolyte de PBS 0,1x (14 mM de NaCl).

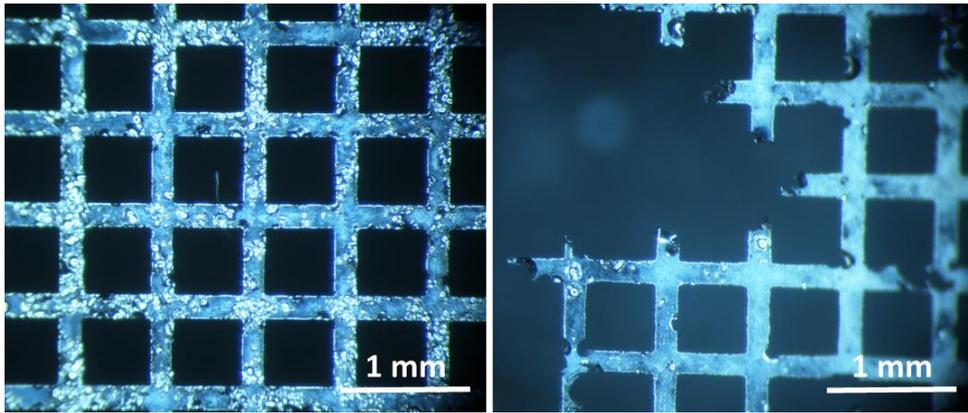


Figure 33 – Images à la loupe binoculaire de la corrosion des grilles (anodes) en nickel par le passage de forts courants. L'image à gauche présente les piqûres de corrosion. A droite la corrosion a rongé le métal jusqu'à sa dissolution partielle.

L'or et le platine en revanche présentent l'avantage de ne pas s'oxyder. L'or pur est inutilisable pour les électrodes car il est trop ductile. En revanche, un dépôt d'or sur nickel par électrodéposition nous a donné des résultats satisfaisants, mais la tenue difficile du dépôt d'or sur la surface de nickel oxydé révélait des zones de fragilité où le nickel exposé est toujours sensible à l'oxydation. Le métal le plus noble, souvent utilisé en électrochimie est le platine, mais il est également très cher. Ce dernier est moins ductile, ce qui le rend plus facilement façonnable à l'état pur. Nous avons finalement opté pour ce dernier matériau pour sa durabilité.

3.3.3. Intégration des électrodes et géométrie finale

Pour appliquer un champ électrique uniformément sur la surface de la membrane, nous avons choisi une géométrie d'électrode en grille, comme nous l'expliquerons plus en détail dans le chapitre suivant (4.1.2.1). La difficulté apportée par cette géométrie résulte dans le point de contact entre la grille et le générateur de tension. Pour appliquer la tension de manière fiable il est donc préférable de créer une grille reliée à l'extérieur du dispositif par un seul tenant.

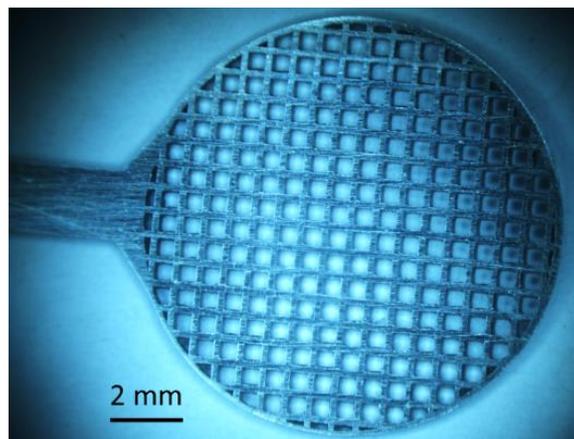


Figure 34 - Image en loupe binoculaire d'une électrode en Pt de maille 500 μ m.

On peut voir sur la Figure 34 la présence d'une languette permettant l'application de la tension externe. L'électrode en platine fait 400 μ m d'épaisseur. Cette dernière est logée dans une fente du dispositif 3D ; un dépôt de colle époxy à l'intérieur et l'extérieur du dispositif permet de fixer l'électrode et préserver l'étanchéité.

3.4. Solutions tampons

Les solutions utilisées dans le cadre de cette thèse sont principalement composées de PVP et de BPTe. Le PVP (Polyvinylpyrrolidone) est un polymère qui donne la viscoélasticité à notre solution. Il existe avec différentes tailles de chaînes de polymère, on a choisi du PVP 360 kDa pour s'aligner avec la composition du BIABooster. Le BPTe est un tampon couramment utilisé en électrophorèse, composé de Bis-Tris (base), de PIPES (acide) et d'EDTA (les concentrations des composants chimiques pour un tampon de concentration standard 1x sont 30 mM de Bis-Tris, 10 mM de PIPES et 1 mM d'EDTA). Le Bis-Tris (base) et le PIPES (acide) permettent de stabiliser le pH de la solution ($\sim 6,5$) et l'EDTA agit comme chélatant des cations bivalents, empêchant ainsi les DNases de dégrader l'ADN. Il existe d'autres polymères qui permettent la viscoélasticité comme le PEG (polyéthylène glycol) et d'autres tampons usuels d'électrophorèse comme le TAE (Tris, Acétate, EDTA) ou le TBE (Tris, Borate, EDTA). Nous avons choisi d'utiliser ce couple PVP-BPTe pour nous aligner avec le tampon d'analyse d'échantillon (kit 1k) utilisé sur BIABooster à Adélis. Le tampon BPTe a été choisi par Adélis pour sa stabilité dans le temps : une solution de TAE (ou TBE) avec du PVP présente une viscosité qui varie fortement quelques semaines après la préparation. Nous avons également utilisé un tampon HAE (HAE 1x correspond à des concentrations de 40 mM d'HEPES, 20 mM d'Acétate, 0,8 mM d'EDTA) équivalent à un tampon TAE où l'HEPES remplace le Tris, avec un pH rééquilibré à 6,5 avec de la soude. Le but de ce remplacement est la recherche des effets délétères du Tris sur l'ADN, nous reviendrons sur ce détail en 5.4.2.

Les solutions sont préparées par dissolution du PVP dans le BPTe. Afin d'assurer une reproductibilité de la préparation, il est important d'utiliser de la poudre qui ne s'est pas humidifiée : pour cela nous avons scellé la poudre de PVP dans des sachets à usage unique en aluminium. Plusieurs méthodes de préparation peuvent être trouvées dans la littérature, nous avons choisi de dissoudre le PVP à température ambiante sans chauffage. L'homogénéisation est réalisée par agitation magnétique ou agitateur rotatif (sans conséquence sur la viscosité) pendant au moins une nuit. Il est important de noter que la concentration en BPTe modifie la viscosité de la solution finale (nos mesures de viscosité sur capillaire simple donnent une viscosité de 42 cP -ou mPa.s- pour une solution de PVP 5% massique avec BPTe 1x, contre 37 cP avec BPTe 0,5x). Dans le but d'éliminer les impuretés et éviter l'obstruction des pores de la membrane, les solutions ainsi fabriquées sont filtrées. En raison de la difficulté à filtrer manuellement des solutions visqueuses avec des filtres 0,2 μ m, nous utilisons à la place des filtres 0,8 μ m. Nos mesures ont montré que la filtration, à 0,2 ou 0,8 μ m, n'affecte pas la viscosité de la solution.

Lorsqu'il est fait référence à des solutions dans ce manuscrit, PVP 5% correspond par simplification à du PVP 360 kDa à 5% massique.

3.5. Présentation globale du design et montage

3.5.1. Design final

Avant de rentrer en détail sur les caractéristiques du design dans le chapitre suivant, la Figure 35 présente le format final du dispositif au moment de l'écriture de ce manuscrit. Les électrodes sont intégrées aux pièces imprimées puis collées avec une colle époxy pour boucher la fente prévue pour l'insertion de l'électrode. Les deux pièces sont imbriquées à l'aide d'encoches d'alignement présentes sur leurs faces internes, une membrane isopore est découpée à un diamètre équivalent à celui du joint torique puis placée entre les deux pièces, des vis traversent les deux pièces aux quatre coins et sont serrées avec des écrous à oreilles.

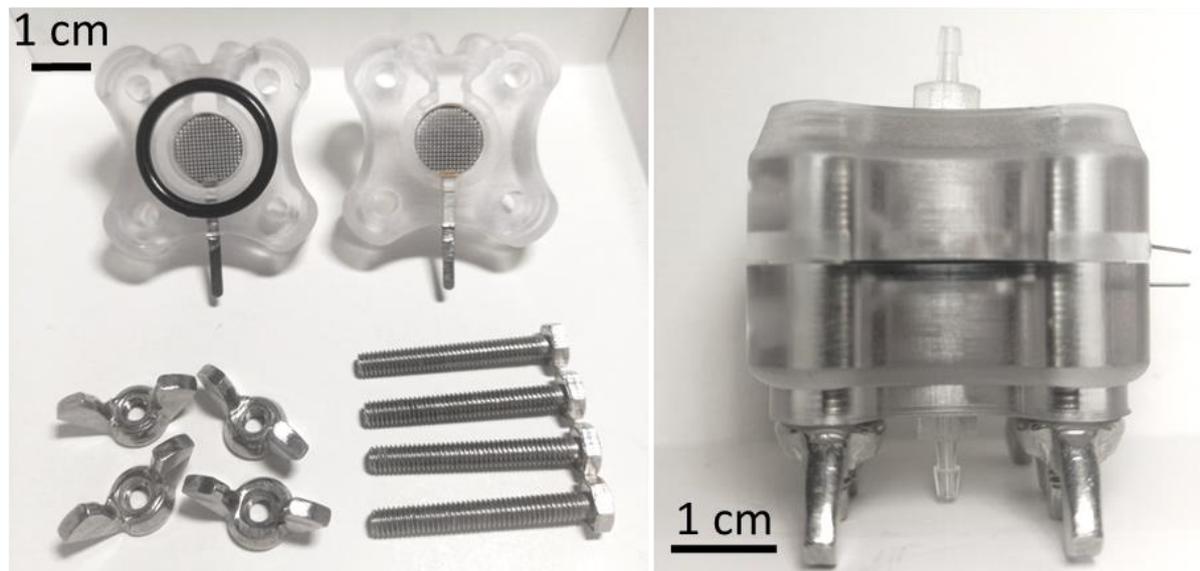


Figure 35 - Dispositif fluide μ LAP. (gauche) chaque pièce est séparée, inlet/anode à gauche avec joint torique et outlet/cathode à droite ainsi que les boulons à tête hexagonale et écrous à oreilles qui permettent de les maintenir entre elles. (droite) dispositif monté et prêt à l'usage.

3.5.2. Montage d'expérience

Le montage classique d'expérience de purification est exposé et détaillé sur la Figure 36. Le contrôleur de pression (Fluigent Flow EZ 1 bar ou 7 bar) alimenté en air sec, applique une pression donnée à deux tubes de 15 mL qui contiennent une solution de rinçage et l'échantillon d'ADN à traiter. Ces tubes sont reliés à une valve 3-ports/2-voies (Fluigent 2-switch) qui permet d'alterner l'entrée (rinçage ou solution d'ADN) pour une seule sortie reliée à l'entrée du dispositif fluide. Le dispositif est branché à un générateur de tension continue (borne + à l'anode/inlet et borne - à la cathode/outlet). Un multimètre branché en série (ampèremètre) et en dérivation (voltmètre) permet de vérifier le bon fonctionnement électrique au cours de l'expérience : un programme LabVIEW permet d'enregistrer les suivis de tension et courant.

En définitive, un contrôle par ordinateur permet d'appliquer une pression (contrôleur de pression) et une tension (générateur) au dispositif fluide avec un suivi en courant électrique. L'Annexe A détaille l'interface utilisateur du programme LabVIEW. L'alternance d'injection via le 2-switch peut être opérée manuellement ou par ordinateur, et elle peut être automatisée. La collecte des échantillons est manuelle avec des microtubes Eppendorf placés en sortie. La mesure de débit est déduite de mesures de masses des échantillons en fonction du temps.

Le montage est simple et présente l'avantage de comporter des éléments de laboratoire facilement accessibles. En effet, Le contrôleur de tension continue peut fonctionner sur une plage de tension basse (jusqu'à 50 V) sans hautes tensions. La méthode d'injection du fluide via un contrôleur de pression Fluigent a été optée par praticité, mais l'injection pourrait se faire via un pousse-seringue par exemple.

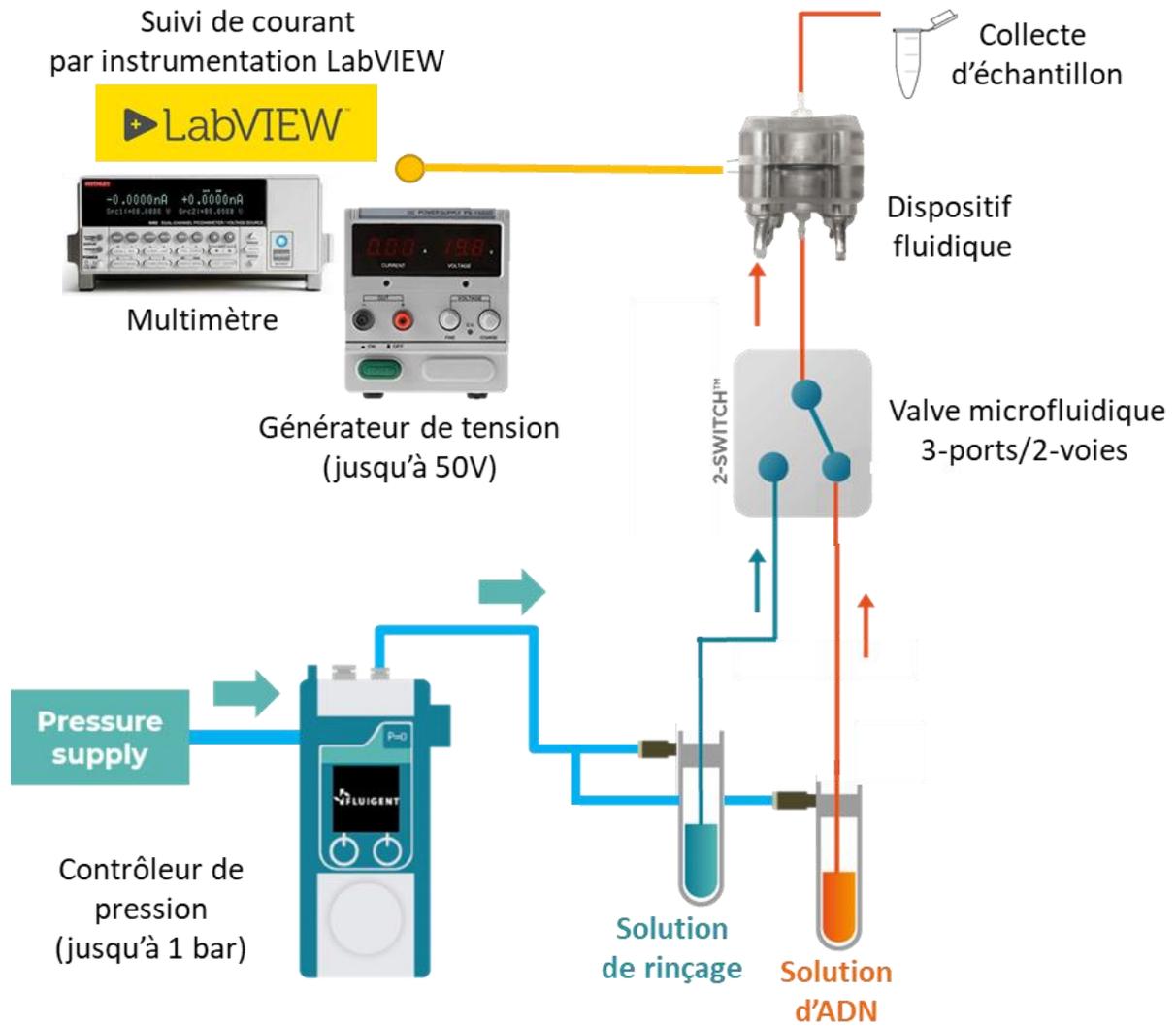


Figure 36 - Montage classique d'expérience.

3.6. Puce xurographique

Nous présenterons également dans ce manuscrit quelques résultats obtenus sur des puces fabriquées par procédé de xurographie. Ces puces fluidiques, avec membrane isopore intégrée, permettent d'observer au microscope le comportement de l'ADN à la membrane. La xurographie est un procédé de découpe automatisée avec lame (cutter). Nous avons utilisé le système Graphtec (FC8600). Le principe consiste à découper des couches fines de ruban adhésif double face (50 μ m d'épaisseur), de plastique PET (100 μ m), et de membrane isopore, puis coller ces couches entre elles et à des lames de verre (500 μ m) comme exposé sur la Figure 37 D. Une fois la puce créée, elle est placée dans un support dédié avec des réservoirs contrôlés en pression, et comportant des électrodes pour l'application de la tension (Figure 37 C).

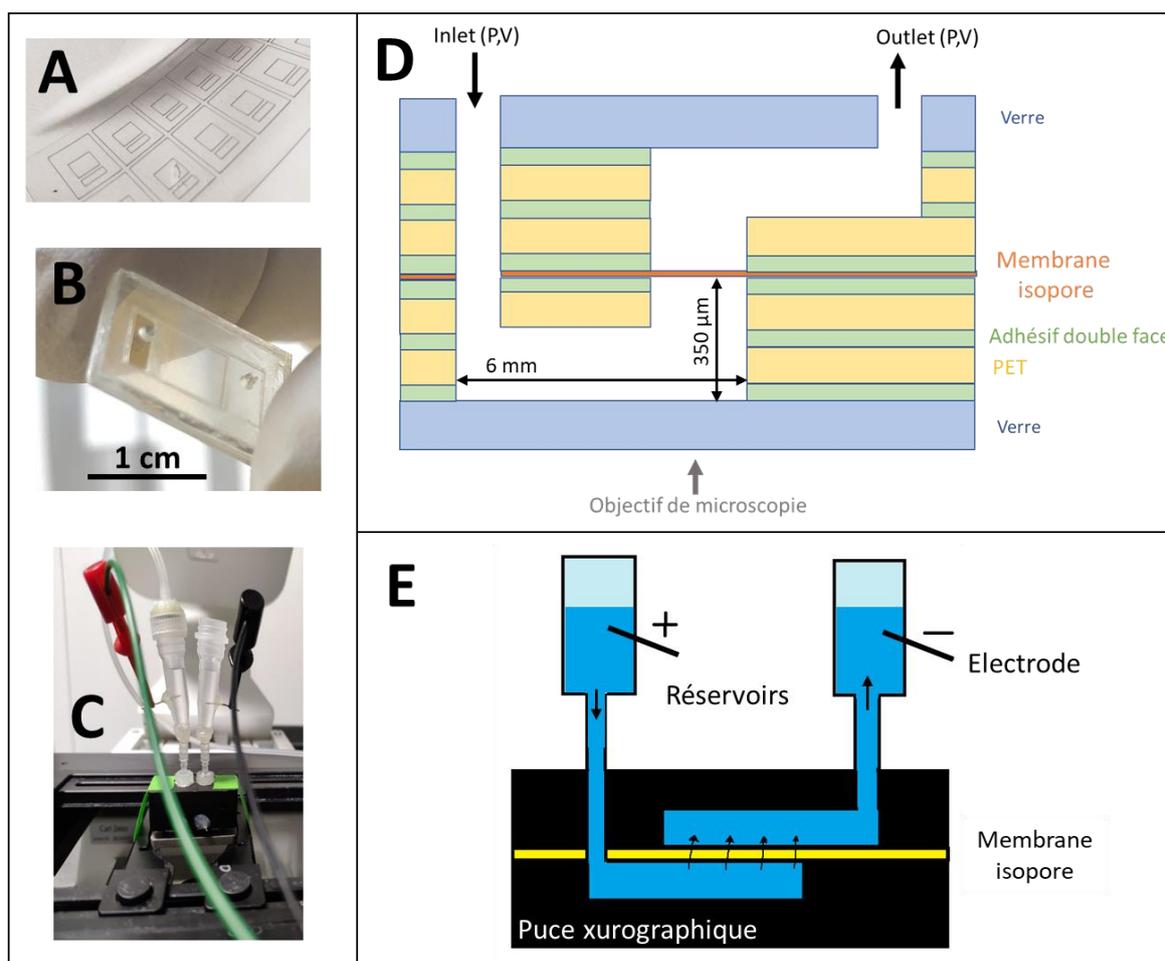


Figure 37 - Puce par xurographie. (A) couche de PET après découpe automatisée par xurographie. (B) Puce xurographique finale après collage des couches. (C) Puce xurographique insérée dans son support de puce avec connecteurs fluidiques, réservoirs et électrodes de platine pour l'application de tension électrique. (D) Représentation en coupe des différentes couches de la puce. L'échelle n'est pas respectée. (E) Schéma global du système avec la puce xurographique, les réservoirs et les électrodes.

La puce finale est transparente (Figure 37 B), ce qui permet de l'observer facilement au microscope inversé. On utilise un microscope Zeiss, un objectif 10X (Ouverture numérique de 0,2) ou 20X (O.N. 0,8), une caméra sCMOS (Zyla Andor) et une source lumineuse pour excitation cyan (Lumencore). L'ADN est marqué en fluorescence par des intercalants comme le YO-PRO-1 ou YOYO-1.

Chapitre 4

Caractérisation de la technologie μ LAP

Cas sans ADN

Après avoir identifié le principe physique en chapitre 2 et les différents éléments du système en chapitre 3, nous consacrons ce quatrième chapitre à la caractérisation de notre technologie μ LAP dans un cas sans ADN.

Dans un premier temps nous tâchons de modéliser le système sur les volets hydrodynamiques et électriques afin d'évaluer la manière dont nous pouvons moduler les paramètres nécessaires à la concentration et la séparation.

Ensuite, nous abordons les problématiques essentielles du format : l'électrolyse de l'eau, la production de bulles, l'échauffement, etc. et les réponses technologiques que nous avons apportées au design afin de les contourner.

4.1. Modélisation électrique et hydrodynamique

4.1.1. Modèle équivalent

Le modèle équivalent, qu'il soit électrique ou hydrodynamique peut être représenté selon la Figure 38. Chaque élément du système peut en effet être modélisé par des résistances (électriques comme hydrauliques). Comme chaque pore est une résistance, la membrane isopore est une mise en parallèle de tous les pores. La résistance de la membrane est mise en série avec les autres résistances du système, notamment les résistances des volumes compris entre les électrodes et la membrane. Nous décrivons ces résistances dans les paragraphes suivants.

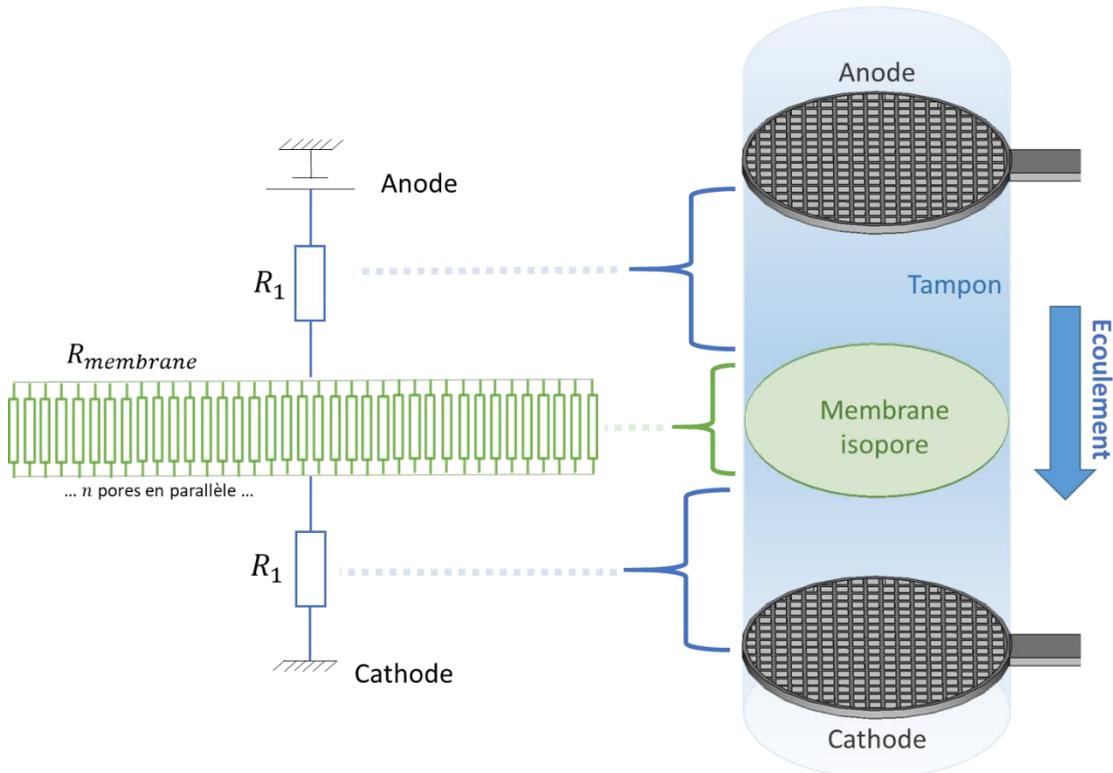


Figure 38 - Modèle résistif équivalent du dispositif

4.1.2. Analyse du modèle électrique

4.1.2.1 Géométrie des électrodes

Les électrodes doivent permettre l'application d'un champ électrique uniforme sur l'ensemble de la surface de membrane traversée par la solution d'ADN soit environ 1 cm^2 . Un simple fil d'électrode tel que couramment utilisé en électrochimie ou en électrophorèse sur gel, d'un diamètre d'environ $200 \mu\text{m}$, n'est pas pertinent pour l'uniformité du champ.

Pour uniformiser le champ électrique, nous avons opté pour une grille d'électrode. Le placement des grilles d'électrodes suffisamment éloigné de la membrane permet une répartition uniforme du champ électrique sur toute sa surface. En effet, on estime que le champ électrique généré par une grille métallique de maille a est uniforme au-delà d'une distance à cette grille de plusieurs a^{169} (voir Figure 39).

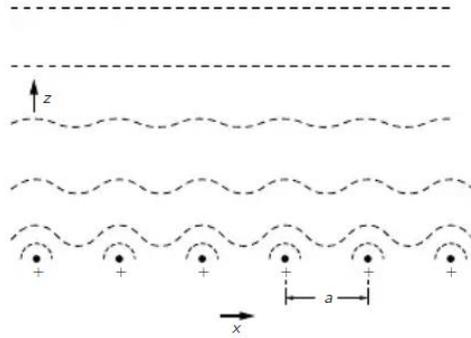


Figure 39 - Représentation des surfaces équipotentielles au-dessus d'une grille chargée de maille a . La grille peut être simplifiée par une rangée de fils infiniment longs espacés d'une distance a . A une distance suffisamment éloigné de la grille, un champ électrique constant est observé alors qu'une distance plus proche des fils de la grille, le champ n'est pas uniforme. (Source « The Feynman Lectures on Physics Vol II »)¹⁶⁹.

Nous allons présenter ici le calcul de la fonction potentiel électrique de la grille chargée de notre système qu'est l'électrode (à partir de « The Feynman Lectures on Physics Vol II »)¹⁶⁹. Nous allons alors montrer dans quelle mesure le champ électrique n'est pas uniforme localement à proximité de la grille, et à quelle distance de l'électrode nous devons placer la membrane isopore pour garantir cette uniformité.

La fonction potentiel électrique ϕ est liée au champ électrique \vec{E} par :

$$\vec{E} = -\overrightarrow{\text{grad}}\phi \quad (36)$$

Dans le cas d'une grille chargée, simplifiée par une rangée de fils espacés d'une distance de maille a selon x , on s'intéresse à l'évolution de la fonction potentiel suivant x (afin de vérifier l'uniformité du champ électrique) et selon z (afin de connaître à quelle distance nous devons placer la membrane pour obtenir ce champ uniforme selon x). La fonction potentielle électrique dans ce cas peut être écrite comme une fonction harmonique, soit la somme de plusieurs sous fonctions harmoniques de forme :

$$\phi_n(x, z) = F_n(z) \cos \frac{2\pi n x}{a} \quad (37)$$

avec n le rang de l'harmonique

On peut donc séparer la fonction en 2 parties : d'une part l'harmonique de rang 0 (équation 38) et d'autre part les harmoniques de rang supérieur.

$$\phi_0(z) = -E_0 z \quad (38)$$

L'harmonique de rang 0 ne dépend pas de x , elle est la composante uniforme. Les harmoniques supérieures sont quant à elles sinusoïdales selon x .

Les solutions de la fonction $F_n(z)$ de l'équation (37) pour satisfaire l'équation de Laplace

$\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} = 0$ sont de la forme :

$$F_n = A_n e^{-z/z_0} \quad \text{avec} \quad z_0 = \frac{a}{2\pi n} \quad (39)$$

Si l'on considère le premier harmonique ($n = 1$) l'amplitude de la fonction décroît d'un facteur $e^{-2\pi}$ pour chaque pas de a selon z . On observe donc une chute importante de l'amplitude des harmoniques à mesure que l'on s'éloigne selon z , chute d'autant plus importante que le rang de l'harmonique est élevé. Ainsi on peut considérer qu'à z élevé, tous les harmoniques différents de 0 deviennent négligeables, ne laissant place qu'à la composante uniforme du champ électrique selon x .

Le calcul des facteurs des fonctions F_n dans le cas de notre système avec la membrane à 2 mm de l'électrode renvoie les résultats suivants, avec une maille de grille de 500 μ m :

$$F_n = A_n e^{-8n\pi} \text{ (pour } n = 1 : e^{-8\pi} \sim 10^{-11}\text{)}$$

On peut donc considérer les harmoniques de rang supérieur à 0 négligeables devant ϕ_0 .

4.1.2.2 Résistances et champs électriques

Les résistances électriques des éléments du dispositif sont calculées à partir de leurs géométries et de la résistivité de la solution :

$$R = \rho \frac{L}{S} \quad (40)$$

avec ρ résistivité de la solution, L longueur du canal et S la section du canal

Electriquement, la résistance de la membrane est équivalente à la mise en parallèle de l'ensemble des résistances électriques des pores traversés :

$$R_{membrane} = \frac{R_{pore}}{n} \quad (41)$$

avec n le nombre de pores traversés.

Le potentiel électrique étant appliqué entre l'anode et la cathode, la résistance électrique d'intérêt est la mise en série de 3 résistances : la résistance du volume de solution situé entre l'anode et la membrane, la résistance équivalente de la membrane et enfin la résistance du volume entre la membrane et la cathode (Figure 38).

La réponse en courant par l'application d'une tension suit dans ce modèle une courbe linéaire de pente $1/R_{totale}$ où R_{totale} s'exprime comme la somme des résistances selon la loi d'Ohm :

$$R_{totale} = R_{membrane} + 2R_1 \quad (42)$$

Avec R_1 la résistance du volume entre une électrode et la membrane placée à équidistance des deux électrodes.

On peut également exprimer la résistance simplement par la porosité :

$$R = \rho \left(\frac{2L}{S} + \frac{d}{S\phi} \right) \quad (43)$$

avec ρ résistivité, L distance électrode-membrane, d l'épaisseur de membrane, S section de travail – soit la section du réservoir, ϕ porosité de la membrane. Lors de l'application d'une tension U aux bornes du dispositif, cette dernière se répartit proportionnellement sur les différentes résistances du circuit selon un pont diviseur de tension :

$$U_{totale} = I(R_{membrane} + 2R_1) \quad (44)$$

$$\text{ce qui donne } U_{membrane} = I \cdot R_{membrane} = U_{totale} \frac{R_{membrane}}{R_{membrane} + 2R_1} \quad (45)$$

Le champ électrique à la membrane, qui constitue l'un des paramètres fondamentaux de la technologie, peut s'estimer par la formule suivante :

$$E_{membrane} = \frac{U_{membrane}}{d} \quad (46)$$

Si l'on exprime le champ électrique directement selon les paramètres d'actuation et les caractéristiques du dispositif on obtient :

$$E_{\text{membrane}} = \frac{U_{\text{totale}}}{d+2Lr^2/R^2} \quad (47)$$

Avec d épaisseur de membrane, L distance électrode-membrane, r taille des pores et R rayon du réservoir.

Cette expression nous permet d'identifier l'influence des paramètres sur le champ : par exemple la diminution de la taille des pores, et de la distance électrode-membrane peut permettre d'augmenter le champ électrique à condition que d ne soit pas significativement supérieure à $2Lr^2/R^2$.

4.1.2.3 Calcul numérique électrique

En prenant en compte une distance électrode-membrane de 2 mm dans un réservoir de rayon 6 mm, une membrane de 123 μm d'épaisseur pour des pores d'un diamètre de 2 μm et une densité de pores de $4 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-2}$, une solution de BPTÉ 1x de conductivité 900 $\mu\text{S/cm}$, la résistance électrique totale du dispositif est estimée à environ 4,3 k Ω dont près de 90% représentent la résistance de la membrane et seulement 10% la résistance des volumes anode-membrane et membrane-cathode. Cette proportion des résistances est considérablement différente en fonction du type de membrane : pour les mêmes paramètres mais une membrane de 46 μm d'épaisseur et des pores de 5 μm , la résistance totale du dispositif est d'environ 700 Ω avec seulement 40% de résistance de la membrane et 60% dans les résistances des volumes électrodes-membrane.

Pour garantir l'arrêt de l'ADN à la membrane, il est important que le champ électrique au niveau de la membrane soit significativement plus élevé que le champ dans le volume. Si l'on applique une tension de 10 V avec les conditions précédentes, la membrane 5/46 μm a un champ théorique d'environ 850 V/cm contre 15 V/cm dans le volume ; la membrane 2/123 μm a un champ de 740 V/cm contre 2,3 V/cm dans le volume. On peut donc estimer le champ dans le volume négligeable devant le champ dans la membrane.

Le Tableau 6 suivant récapitule les caractéristiques électriques de deux membranes différentes (5/46 μm et 2/123 μm d'une densité de 10^5 cm^{-2}) :

| Paramètre | Valeur | | Unité |
|---|--------|------|------------------|
| conductivité solution (BPTÉ 1x) mesurée | 900 | | $\mu\text{S/cm}$ |
| rayon disque de membrane | 6 | | mm |
| distance électrode-membrane | 2 | | mm |
| tension appliquée | 10 | | V |
| épaisseur membrane | 46 | 123 | μm |
| taille des pores | 5 | 2 | μm |
| densité de pores | 10^5 | | cm^{-2} |
| porosité | 1,96 | 0,31 | % |
| Résistance membrane | 230 | 3847 | Ω |
| Résistance distance électrode-membrane | 197 | | Ω |
| Résistance totale du dispositif | 643 | 4239 | Ω |
| Champ E distance électrode-membrane* | 13 | 2 | V/cm |
| Champ E membrane* | 741 | 648 | V/cm |
| Courant théorique * | 12,1 | 2,1 | mA |

Tableau 6 - Caractéristiques électriques des membranes 2-123 10^5 et 5-46 10^5 .

La mesure de la conductivité est réalisée au conductimètre. Les champs et courants théoriques prennent ici en compte la surtension présentée en 0 (soit 1,23 V)

4.1.3. Analyse du modèle hydrodynamique

4.1.3.1 Résistance hydraulique et débit

La résistance hydraulique d'un canal fluide de section circulaire est définie par :

$$R_{hydro} = \frac{8\eta L}{\pi r^4} \quad (48)$$

avec η viscosité dynamique de la solution, L longueur et r rayon du canal.

De manière analogue à la loi d'Ohm pour le modèle électrique, la résistance hydraulique est liée au débit et à la pression par :

$$R_{hydro} = \frac{\Delta P}{Q} \quad (49)$$

avec Q débit volumique et ΔP le différentiel de pression entre l'entrée et la sortie fluide.

Le débit par pore et le débit total sont donc :

$$Q_{pore\ unique} = \frac{\pi r^4 \Delta P}{8\eta d} \text{ et } Q_{total} = \frac{\varphi S r^2 \Delta P}{8\eta d} \quad (50)$$

Avec d épaisseur de membrane et φ porosité.

La vitesse hydrodynamique moyenne est définie par le rapport du débit sur la section traversée :

$$\overline{v_{hydro}} = \frac{Q}{\pi r^2} \quad (51)$$

Le débit, la vitesse et la pression peuvent être reliés par la formule suivante :

$$\Delta P = \frac{8\eta L \overline{v_{hydro}}}{r^2} \quad (52)$$

4.1.3.2 Calcul numérique hydraulique

En considérant l'utilisation d'une solution viscoélastique de PVP 360 kDa à 5%, d'une viscosité d'environ 30 mPa.s injectée dans une membrane de rayon 6 mm. Si l'on souhaite fixer la vitesse hydrodynamique moyenne dans les pores à 5 mm/s pour deux membranes différentes (5/46 μ m et 2/123 μ m d'une densité de 10^5 cm⁻²), on obtient le Tableau 7 de valeurs suivant :

| Paramètres | Valeur | | Unité |
|---|-----------------|------------|------------------------|
| Viscosité | 42 | | mPa.s |
| rayon disque de membrane | 6 | | mm |
| vitesse hydrodynamique moyenne visée | 5 | | mm/s |
| épaisseur membrane | 46 | 123 | μ m |
| taille des pores | 5 | 2 | μ m |
| densité de pores | 10 ⁵ | | cm ⁻² |
| porosité | 1,96 | 0,31 | % |
| Résistance hydraulique pore unique | 1,3E+17 | 1,3E+19 | kg/(s.m ⁴) |
| Résistance hydraulique membrane | 1,2E+12 | 1,2E+14 | kg/(s.m ⁴) |
| Résistance hydraulique distance électrode-membrane | 1,7E+14 | 1,7E+17 | kg/(s.m ⁴) |
| Débit total | 666 | 107 | μ L/min |
| vitesse hydrodynamique zone électrode-membrane | 0,196 | 0,016 | mm/s |
| pression à appliquer | 0,13 | 2,07 | bar |

Tableau 7 - Caractéristiques hydrodynamiques des membranes 2-123 10⁵ et 5-46 10⁵

On notera que pour une même vitesse hydrodynamique dans les pores, la pression à appliquer est très différente (130 mbar contre 2 bar) et les débits sont eux aussi considérablement changés (670 μ L/min contre 110 μ L/min) selon la membrane utilisée ($5-46 \cdot 10^5$ contre $2-123 \cdot 10^5$). Le temps de traitement d'un même volume de solution varie donc fortement en fonction de la membrane.

4.1.3.3 Régime d'écoulement

Comme déjà expliqué en 2.2.2, le régime d'écoulement est caractérisé par le nombre de Reynolds $Re = \frac{\rho v L_c}{\eta}$. Un nombre de Reynolds $\ll 1$ correspond à un régime laminaire par opposition à un régime turbulent, où les forces visqueuses dominent les effets inertiels.

Le tableau suivant présente le calcul du nombre de Reynolds dans le cas de l'écoulement à l'intérieur d'un pore et de l'écoulement dans le volume électrode-membrane.

| Paramètre | dans un pore | dans le volume | Unité |
|---------------------------|-----------------|----------------|-------------------|
| masse volumique | 1000 | | kg/m ³ |
| vitesse caractéristique | 5 | 0,1 | mm/s |
| longueur caractéristique | 5 | 12000 | μ m |
| viscosité dynamique | 40 | | mPa.s |
| Nombre de Reynolds | 0,000625 | 0,03 | sans unité |

Tableau 8 - Calcul du nombre de Reynolds dans un pore et dans le volume électrode-membrane

Dans tous les cas, le dispositif présente donc un écoulement laminaire. Un écoulement laminaire se présente sous la forme d'un profil de Poiseuille, déjà exprimé dans le chapitre 2 comme $v(r) = v_{max} \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right)$ pour une canalisation cylindrique (r position radiale et R le diamètre du tube).

En d'autres termes, la vitesse est maximale au centre du canal, nulle sur les bords, et les vitesses maximale et moyenne sont reliées par :

$$\overline{v}_{hydro} = \frac{v_{max}}{2} \quad (53)$$

Enfin, on peut évaluer la nature du transport par le calcul du nombre de Péclet ¹⁷⁰:

$$P_{eM} = \frac{V L_c}{D} \text{ avec } D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (54)$$

Avec V vitesse caractéristique de l'écoulement soit la vitesse hydrodynamique, L_c longueur caractéristique, D coefficient de diffusion, k_B coefficient de Boltzmann, T température, η viscosité dynamique et a taille de la molécule.

Le nombre de Péclet est le rapport du transfert par convection sur le transfert par diffusion. Ici une approximation nous donne $P_{eM} \sim 10^5 \gg 1$ donc une convection qui domine largement sur la diffusion.

4.1.4. Evaluation expérimentale des conditions au sein du système

Au sein du système, il n'est pas possible de mesurer directement les deux paramètres fondamentaux de la concentration et de la séparation d'ADN, que sont le champ électrique et la vitesse hydrodynamique. Pour les estimer, nous réalisons des mesures indirectes et retrouvons ces paramètres à partir des équations citées plus haut.

En ce qui concerne le champ électrique, sa valeur est estimée à partir de la mesure du courant électrique au cours de l'expérience I_{exp} .

$$E_{exp} = \frac{I_{exp} R_{membrane}}{d} \quad (55)$$

La valeur de $R_{membrane}$ est elle-même estimée à partir des caractéristiques de la membrane :

$$R_{membrane} = \frac{\rho d}{n\pi r^2} \quad (56)$$

où l'épaisseur de membrane d , la taille des pores r , et le nombre de pores traversés n à partir de la densité de pores, sont des caractéristiques certifiées par le constructeur. La résistivité ρ de la solution tampon est quant à elle mesurée par conductimétrie.

Pour l'estimation de la vitesse hydrodynamique, elle est obtenue par la mesure expérimentale du débit (mesure de masse de tubes échantillonnés pendant une durée donnée) :

$$\overline{v}_{hydro_{exp}} = \frac{Q_{exp}}{n\pi r^2} \quad (57)$$

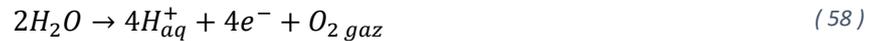
n et r sont ici aussi les caractéristiques constructeur.

4.2. Electrochimie et formation de bulles

4.2.1. Electrolyse de l'eau

L'électrolyse de l'eau est la décomposition de l'eau en hydrogène et oxygène sous forme gazeuse, sous l'action d'un potentiel électrique¹⁷¹.

A l'anode, soit la borne positive en amont du dispositif, a lieu l'oxydation :



Du dioxygène sous forme de gaz et des ions hydrogène (protons) sont donc produits à l'anode.

A la cathode, soit la borne négative en aval du dispositif, a lieu la réduction :



Les ions hydrogène génèrent du dihydrogène sous forme de gaz en acceptant des électrons à la cathode.

Le bilan de ces deux réactions peut s'écrire :



En d'autres termes, la réaction produit deux fois plus d' H_2 que d' O_2 .

De manière idéale, le potentiel standard de l'électrolyse de l'eau est de 1,23 V. Cette réaction électrochimique ne se produit donc que lorsqu'une tension supérieure à ce potentiel est appliquée.

4.2.2. Formation de bulles

Les solubilités d' O_2 et H_2 dans l'eau sont respectivement de 1,3 mmol/L (41,6 mg/L) et de 0,78 mmol/L (1,57 mg/L). L' H_2 est donc moins soluble dans l'eau que l' O_2 , de telle sorte que les bulles produites lors de la réaction sont majoritairement des bulles d' H_2 à la cathode. La différence est par exemple observable dans un bac d'électrophorèse sur gel classique : la quantité de bulles produites est bien plus importante à la cathode (H_2) qu'à l'anode (O_2)¹⁷².

Un calcul numérique simple dans le cas du passage de 2 mA pendant 4 min dans un volume de 500 μ L considéré comme fermé par simplification, donne une production d' H_2 et d' O_2 au-dessus de la solubilité, et l'évacuation finale de 23 μ L d' H_2 et 7 μ L d' O_2 . Dans la pratique, certainement en raison du renouvellement de la solution par le flux, la présence de bulles d' O_2 peut être négligée.

La présence de bulles est un inconvénient majeur de notre technologie car elles viennent écranter le champ électrique, et par conséquent altérer les performances de concentration d'ADN au niveau des pores. La Figure 40 présente une photo de bulles d' H_2 produites à la cathode.

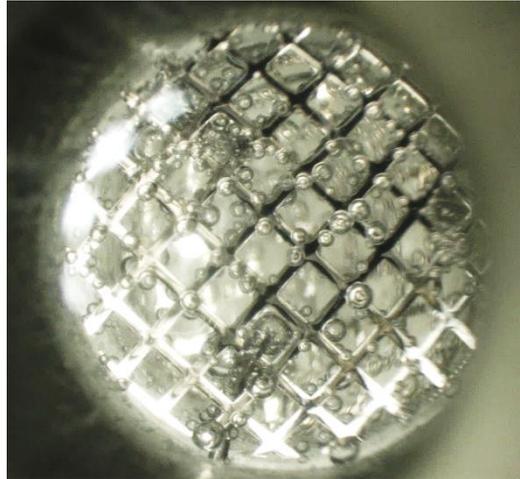


Figure 40 – photo de bulles d' H_2 produites sur une cathode en Nickel.

Le suivi du courant en cours d'expérience est un très bon indicateur de la présence de bulles. La Figure 41 présente un suivi de courant dans un cas où le système est en position verticale, avec la cathode en bas et l'anode en haut (Figure 42). Dans ce cas, on observe que les bulles induisent une instabilité du courant puis une chute. Le courant augmente par l'échauffement (voir 4.3) puis devient instable avant de chuter, en raison du gain de résistance apporté par la présence de bulles d' H_2 produites à la cathode et bloquées sous la membrane (Figure 42). Les bulles d' H_2 sont portées sous la membrane par poussée d'Archimède et l'intensité du flux de solution n'est pas suffisant pour les évacuer du système dans ce cas de figure. Une augmentation forte de la résistance de la zone cathode-anode vient alors totalement déséquilibrer le pont diviseur de tension et le champ électrique à la membrane est réduit pouvant entraîner la fuite de l'ADN.

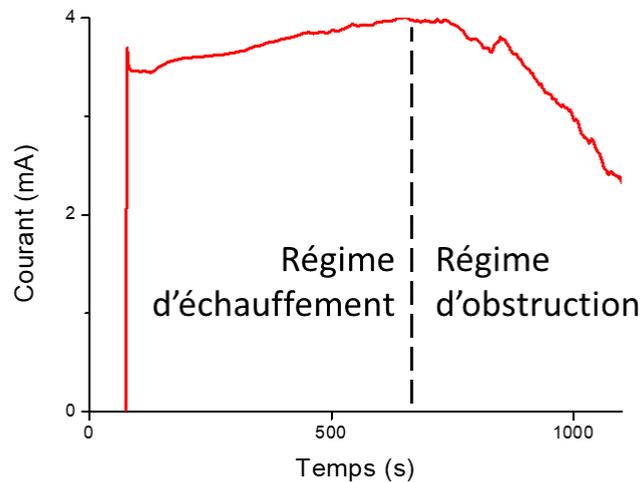


Figure 41 - Suivi de courant lors de l'application de 6,5 V pendant 20 min sur un dispositif avec membrane $2-48 \cdot 4 \cdot 10^5$ en configuration haut-bas

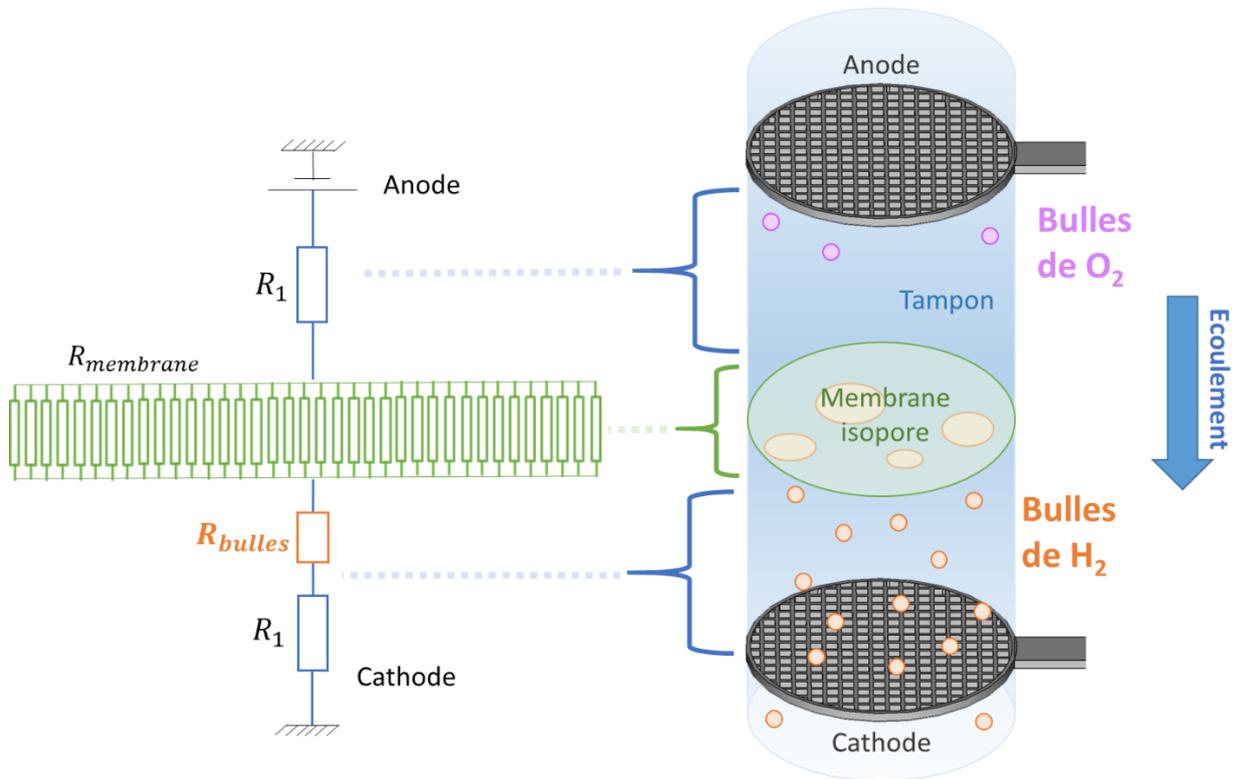


Figure 42 - Modèle électrique du dispositif avec présence de bulles d' H_2 . Le système est montré ici de manière verticale avec un écoulement de l'anode vers la cathode.

En fonction du positionnement du dispositif, l'influence des bulles sera différente. Dans les dernières versions du dispositif, nous avons préféré une disposition verticale mais inversée par rapport à la Figure 42 : l'écoulement s'effectue de bas en haut (comme précédemment montré Figure 36) afin que les bulles d' H_2 produites à la cathode s'évacuent avec le flux. Même si les bulles d' O_2 sont indiquées dans la Figure 42 nous n'avons pas caractérisé leur effet délétère sur le courant, car leur présence ne semble pas affecter le courant même sur une vingtaine de minutes.

4.2.3. Variation de pH

Comme le montre l'équation (59), des protons H^+ sont produits à l'anode sous l'action du courant électrique, et ces protons combinés aux molécules d'eau forment des ions hydronium H_3O^+ . C'est la concentration de ces ions qui définit l'acidité de la solution ($pH = -\log [H_3O^+]$) de sorte qu'une forte concentration d' H_3O^+ correspond à une forte acidité et donc un faible pH.

L'Annexe B présente le calcul de la diminution du pH à l'anode, pour une solution de BPTE 1x sous des courants d'1 mA et 10 mA. Nos estimations donnent une variation négligeable du pH à 1 mA ($<0,1$), alors que la variation de pH est importante (>1) à 10 mA. Pour compléter les calculs, des mesures de variations de pH par l'ajout d'acide fort permettraient d'évaluer précisément le pouvoir tampon de nos solutions. Nous verrons plus tard (5.4) comment cette acidification à l'anode peut être responsable de dégradations de l'ADN.

4.2.4. Comportement électrochimique et surtension

La Figure 43 A présente des relevés de courants en fonction du temps sous l'action d'échelons de tensions, dans le cas de deux types d'électrodes différentes : Platine et Nickel. La membrane utilisée est une 5-46 10^5 .

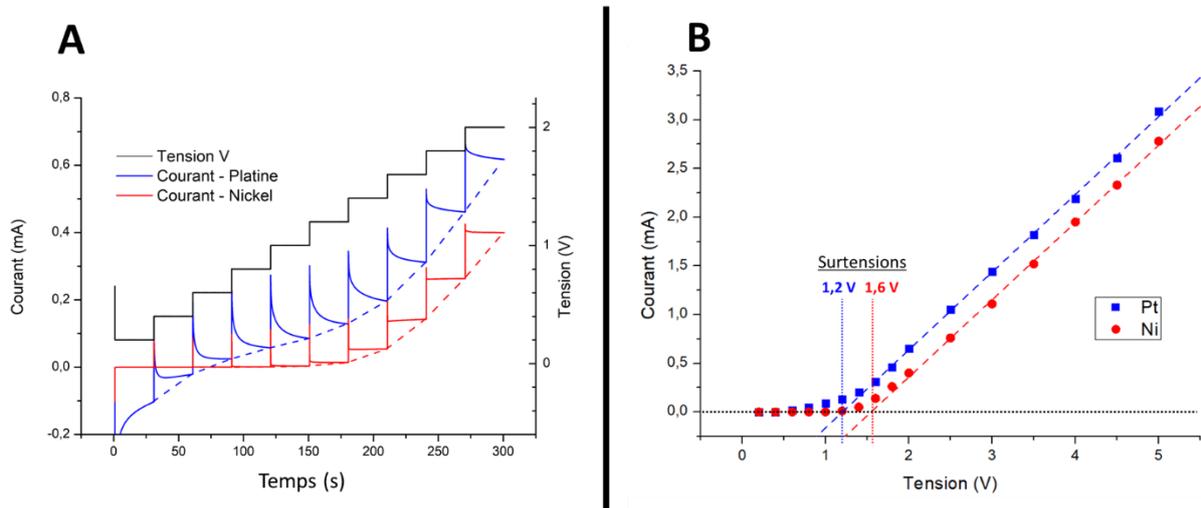


Figure 43 – (A) Electroampérométrie (suivi du courant en fonction du temps) lors de l'application d'échelons de tensions de 30 s, avec des électrodes en Platine (Pt) ou des électrodes en Nickel (Ni). (B) Caractéristique courant-tension du système avec des électrodes Pt ou Ni. La surtension s'obtient par la valeur de tension à l'origine de la régression linéaire en régime ohmique. Elle vaut environ 1,2 V pour une électrode en Pt contre 1,6 V pour une électrode en Ni.

Les résultats exposés en Figure 43 B montrent des courbes qui peuvent être séparées en deux régimes : un régime de surtension (également appelé régime non faradique, jusqu'à environ 1,3V dans notre cas) et un régime ohmique (régime faradique pour lequel I et U sont proportionnels).

Le régime de surtension est défini par un potentiel électrique pour lequel aucune réaction de transfert de charge n'est favorable thermodynamiquement. La surtension est définie comme la valeur algébrique à ajouter au potentiel d'équilibre pour observer le passage du courant I :

$$U(I) = RI + \eta \quad (61)$$

avec U potentiel appliqué et η la surtension.

Selon cette formule, la condition $U > \eta$ doit être appliquée pour théoriquement obtenir une valeur positive de courant. Néanmoins, un faible courant peut être mesuré par un transfert de charges d'impuretés (oxygène, espèces organiques, ions métalliques). D'un point de vue microscopique, cette surtension s'explique par la création d'une double couche électrique à la surface de l'électrode : la charge de l'électrode q^M et la charge de la solution q^S s'opposent ($q^M = -q^S$) de sorte qu'un excès (ou déficit) d'électrons est présent en surface de l'électrode en même temps qu'un excès de cations (ou anions respectivement) dans la solution à l'interface électrode/solution. Electriquement, on peut traduire ce phénomène par un comportement capacitif de tel sorte que le modèle électrique du système peut être simplifié comme montré en Figure 44.

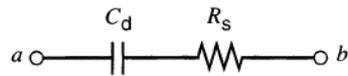


Figure 44 - Modèle électrique simplifié du système prenant en compte la capacité de la double couche électrique C_d et la résistance de la solution R_s

Dès lors, la réponse temporelle en courant du système suite à un échelon de tension peut s'écrire selon la formule suivante :

$$i(t) = \frac{U}{R_s} e^{-t/R_s C_d} \quad (62)$$

avec U la valeur de l'échelon de tension, R_s la résistance de la solution et C_d la capacité de la double couche électrique.

Cette réponse en courant, suivant une exponentielle négative, est observable sur les mesures de courant en fonction du temps (Figure 43 A).

La surtension est ici assez différente lorsque l'on compare l'électrode en Pt et l'électrode en Ni comme montré sur les caractéristiques courant-tension des différents systèmes, exposés en Figure 43 B. Elle est estimée autour de 1,2 V pour l'électrode en Pt, ce qui correspond directement au potentiel d'électrolyse de l'eau à 1,23 V précisément. Pour l'électrode en Ni, la surtension est légèrement supérieure à 1,6 V. Le régime ohmique quant à lui se caractérise par un comportement purement résistif du dispositif que l'on observe par une droite sur la courbe courant/tension. L'inverse de la pente de cette courbe est donc la résistance du système.

La surtension est une caractéristique du couple électrode/électrolyte. Le courant est gouverné par de multiples phénomènes¹⁶⁸ : le transfert de masse (déplacement des ions dans la solution), le transfert d'électrons à la surface de l'électrode, des réactions de surfaces (adsorption, désorption, etc.) ou des réactions chimiques. Les phénomènes mis en jeu sont donc complexes, et ils peuvent dépendre d'autres variables encore, certaines spécifiques à l'électrode (matériau, aire de la surface d'échange, géométrie, ...), à la solution (pH, concentrations d'autres espèces chimiques, ...) et à l'interface entre les deux. L'électrode ici fait partie du type des électrodes redox car le métal de l'électrode ne joue pas dans les réactions d'oxydoréduction (à la différence d'autres types d'électrodes comme les électrodes de type 1 pour lesquelles le métal est en présence d'un de ses sels en solution par exemple Cu et Cu^{2+}). Le transfert d'électrons dans le cas d'électrodes de type 1 est un processus généralement plus rapide (entre le métal de l'électrode et son ion) que le transfert d'électrons pour une électrode redox.

La surtension est à prendre en compte dans le calcul d'estimation du champ électrique à partir de la valeur de courant obtenue expérimentalement, puisqu'elle n'est qu'une condition électrochimique minimale à soustraire de la tension totale appliquée. En d'autres termes, il ne peut y avoir établissement d'un champ électrique en dessous de cette valeur de surtension. Dans le cas de l'application de faibles tensions, la part de surtension est assez importante et doit être prise en compte pour évaluer le champ électrique de manière correcte.

4.3. Echauffement

4.3.1. Puissance dissipée et élévation de température

Les courants électriques importants qui circulent dans le dispositif génèrent un échauffement significatif qui a des conséquences sur les propriétés du tampon (voir plus loin). La puissance dissipée par le dispositif est :

$$P = I^2 R_{totale} = I^2 (R_{membrane} + 2R_1) \quad (63)$$

Avec I courant et R_1 la résistance du volume membrane électrode (voir 4.1.2.2).

En fonction de la membrane, sa part de puissance dissipée est plus ou moins grande (environ 90% pour une membrane $2-123 \cdot 10^5$ contre seulement 40% pour une membrane $5-46 \cdot 10^5$). Si l'on considère un système adiabatique, c'est-à-dire un système qui n'échange pas de chaleur, la quantité de chaleur transférée au fluide est :

$$Q(t) = P \times t \quad (64)$$

Avec t le temps d'application de la tension.

L'élévation de la température résultante est déterminée par la capacité calorifique de la solution C_m : elle vaut $4,18 \text{ J.g}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pour l'eau liquide.

$$\Delta T(t) = \frac{Q(t)}{C_m} = \frac{I^2 (R_{membrane} + 2R_1) t}{C_m} \quad (65)$$

Ainsi, avec un dispositif avec membrane $2-123 \cdot 10^5$ dans lequel passe un courant de 3,5 mA, la température augmente de 1°C par minute. Bien entendu ce calcul ne prend pas en compte la dissipation de chaleur à travers le volume de résine du dispositif et la dissipation de chaleur par rinçage de la solution. Si l'on veut exprimer le système d'une manière plus complète, on peut le schématiser selon la Figure 45. La solution est injectée avec une température T_0 qui subit une augmentation de température $\delta T_1 = \frac{I^2 R_1 t_1}{C_m}$ lors de son passage dans la zone anode-membrane pendant une durée t_1 . Elle subit une nouvelle augmentation de température lors de son passage à la membrane $\delta T_m = \frac{I^2 R_{membrane} t_m}{C_m}$ avec t_m le temps de passage à la membrane. Enfin la solution est de nouveau échauffée dans la zone membrane-cathode de la même manière que pour la zone anode-membrane. La variation totale de température peut ainsi être détaillée comme $\Delta T(t) = 2\delta T_1 + \delta T_m$. Le temps de présence de la solution dans le volume électrode-membrane est considérablement plus grand que dans la membrane : pour une membrane $2-123 \cdot 10^5$ avec une vitesse dans les pores de 15 mm/s, le temps de présence dans le volume est de près de 300 s contre 16 ms dans la membrane. En résumé, il advient que la part d'élévation de température est dans ce cas majoritairement (> 99%) celle du volume électrode-membrane.

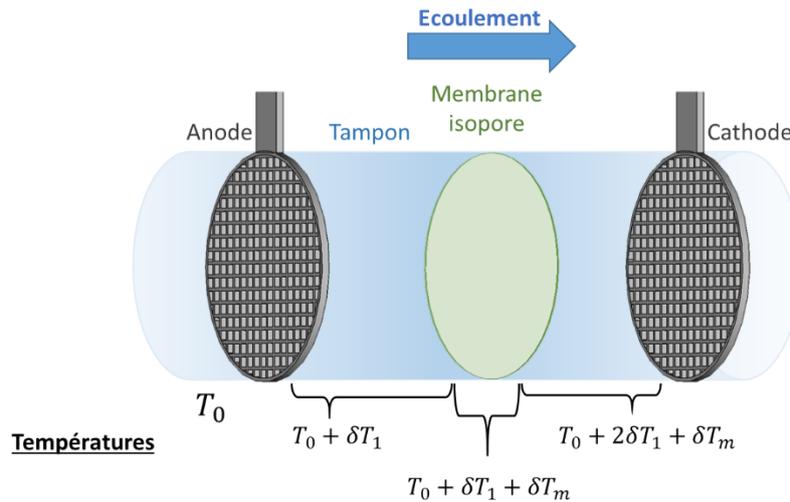


Figure 45 - Schéma de l'augmentation de la température par échauffement dans les différents éléments de volume. La dissipation de chaleur est négligée dans ce modèle.

4.3.2. Effets de la température sur les propriétés du fluide

L'élévation de température a des conséquences importantes sur les propriétés du tampon comme présenté Figure 46. Cette figure présente les mesures de variations de viscosité et de résistivité d'une solution de PVP 5% BPTÉ 1x en fonction de la température. Les mesures sont effectuées sur une machine d'électrophorèse capillaire (Agilent CE 7100) et un capillaire simple, où la température de la cassette peut être réglée. La résistivité est déduite à partir du courant mesuré à tension donnée dans le capillaire (dont les dimensions sont connues) rempli avec la solution à étudier. La viscosité est obtenue par l'injection à pression donnée de FITC (molécule fluorescente) et la mesure du temps de migration entre l'injection et la détection du FITC lors de son passage au niveau du détecteur fluorescent.

On observe Figure 46 que plus la température est élevée, moins la solution est visqueuse (bleu) et résistive (rouge). En d'autres termes, la baisse de viscosité provoque une baisse de force transverse, donc une efficacité moindre de la concentration d'ADN. Par ailleurs, la baisse de résistivité augmente le courant, ce qui augmente la puissance et fait rentrer le système dans une boucle de rétroaction délétère pour les performances du système.

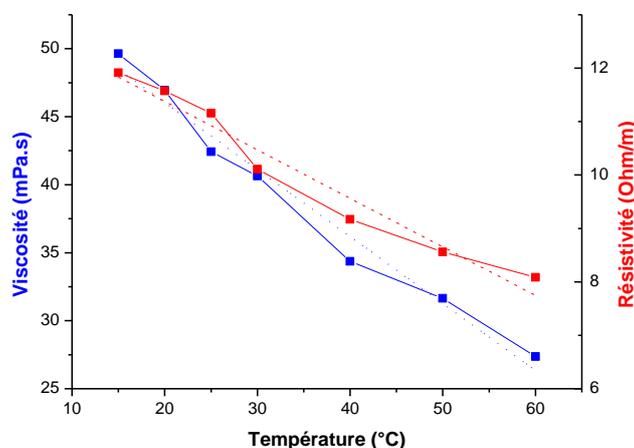


Figure 46 - Mesures de viscosité et résistivité d'une solution de PVP 5% BPTÉ 1x en fonction de la température.

4.3.3. Mesures d'élévation de température

La Figure 47 montre les mesures de courant et de températures effectuées sur des dispositifs avec membrane 2-123 10^5 et solution PVP 5% BPTe 1x mis sous tension de 15 à 32 V. Les mesures de températures sont effectuées avec un thermocouple inséré dans le dispositif pour une mesure proche de la membrane. On remarque une augmentation significative de la température pour des tensions supérieures ou égales à 27 V (plus de 6°C en 10 min). La température n'augmente que de 2°C et 4°C respectivement pour 15 et 20 V, et le courant reste stable avec ces conditions. En revanche, le courant augmente fortement au cours du temps à 32 V où il subit une augmentation de près de 30%. L'instabilité du courant dès 300 s et sa chute à 500 s sont typiques de la présence de bulles (voir 4.2.1).

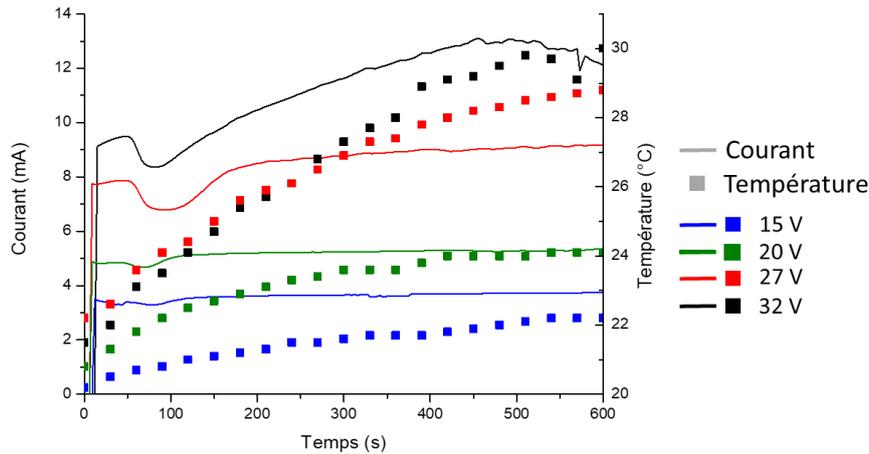


Figure 47 - Suivi de courant et de température suite à l'échauffement dans un dispositif sous tension et sans refroidissement. La solution utilisée est du PVP 5% BPTe 1x avec une membrane 2-123 10^5 . Le courant est représenté en traits pleins (gauche) et la température avec des carrés (droite), chaque couleur correspondant à une tension différente.

4.3.4. Canal de refroidissement

Pour limiter l'augmentation de température, nous avons mis en place un système de refroidissement autour de la membrane : la Figure 48 présente un ensemble de photographies du dispositif où les canaux de refroidissement sont mis en évidence par une solution colorée.

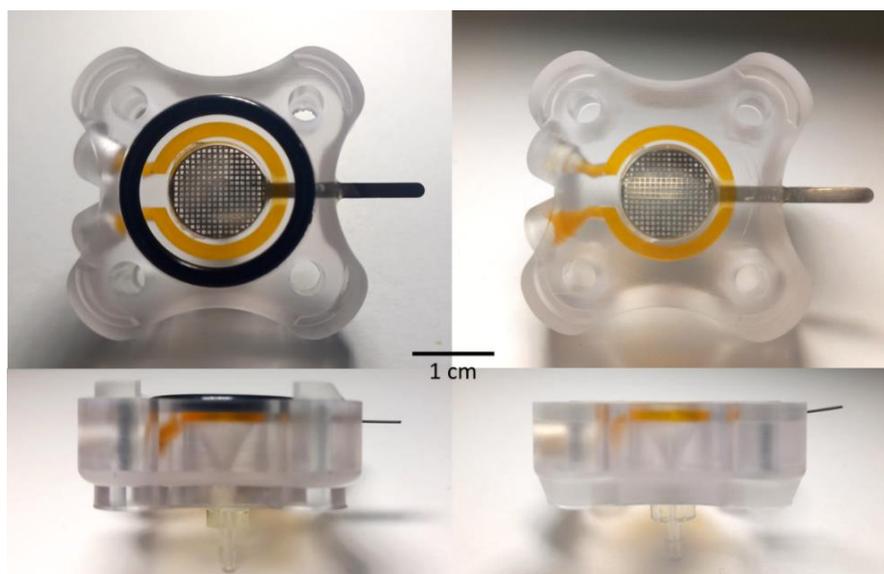


Figure 48 - Photographies du dispositif 3D côté inlet/anode (gauche) et outlet/cathode (droite) en vues intérieures (haut) et de côté (bas). Les canaux de refroidissement sont ici mis en évidence avec une solution colorée orange.

L'échauffement est particulièrement délétère lorsque les tensions et courants sont élevés, ce qui est typiquement le cas pour la concentration de fragments de faible taille (< 300 bp). Pour limiter l'élévation de température dans la solution, le canal de refroidissement est placé au plus proche de la membrane, dans la limite de faisabilité en impression 3D pour garder un système suffisamment robuste. Le canal est ainsi placé à $600 \mu\text{m}$ du canal principal (distance radiale) et $700 \mu\text{m}$ de la membrane. D'un point de vue instrumental, le refroidissement est effectué en boucle fermée via une pompe péristaltique. Un réservoir d'eau froide plongé dans de la glace est relié aux canaux de refroidissement des deux parties du dispositif et à la pompe. Le débit d'écoulement d'eau froide est très rapide (150 mL/min), ce qui correspond à un temps de passage inférieur à 100 ms dans le dispositif.

La Figure 49 montre le suivi de courant et de température avec et sans refroidissement à même tension. Le système de refroidissement permet de drastiquement réduire l'augmentation de la température. Ici pour une expérience de 10 min à tension élevée (25 V), l'élévation de température sans refroidissement est de 8°C contre seulement 2°C avec notre système de refroidissement. A titre de précision, nous supposons que la présence du thermocouple proche de la membrane perturbe le passage des bulles et provoque ici une instabilité du courant, même avec système refroidi (autour de 500 s Figure 49).

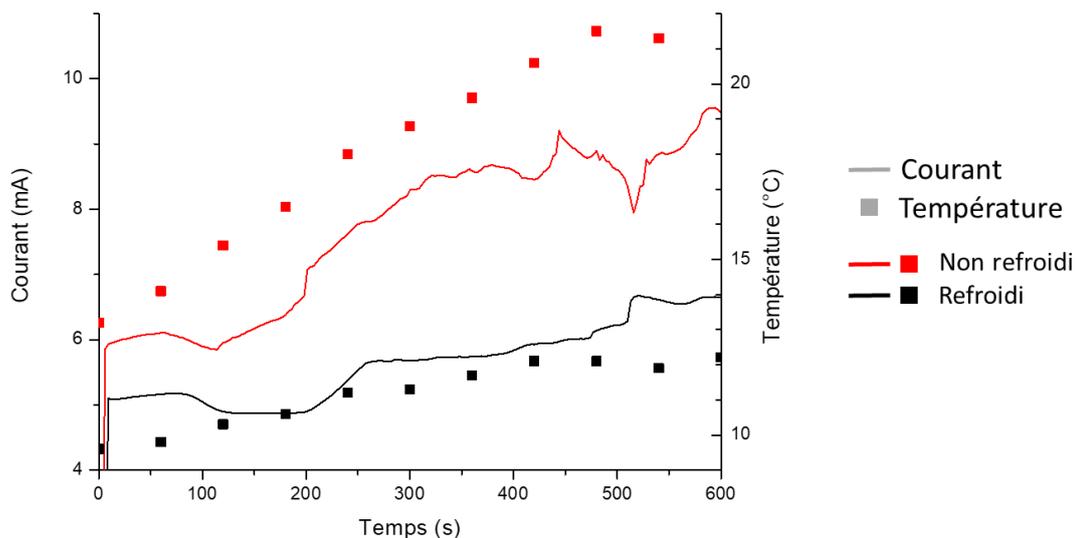


Figure 49 - Suivi de courant et de température suite à l'échauffement dans un dispositif avec PVP 5% BPTe 1x, membrane 2-123 10^5 sous une tension de 25V, avec et sans refroidissement.

4.3.5. Simulation des effets thermiques du refroidissement

La Figure 50 présente des résultats de simulation thermique d'un dispositif refroidi. Ici on approxime le refroidissement par un bord à 4°C et on observe le gradient de température dans le système. Cette figure permet d'illustrer l'inhomogénéité du système lorsqu'il est refroidi : la chaleur au centre de la membrane est peu dissipée contrairement aux bords. Cela peut engendrer une disparité locale des propriétés du fluide et donc de sa capacité à concentrer l'ADN.

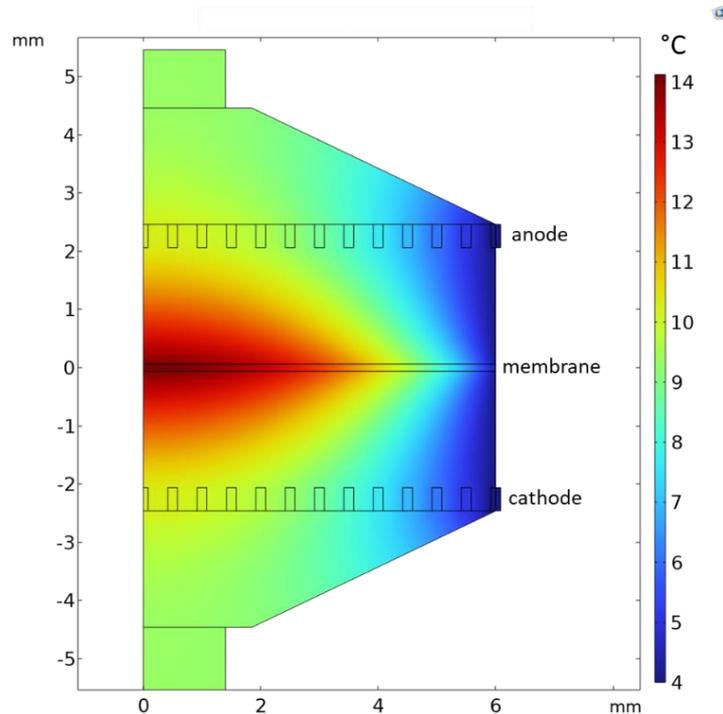


Figure 50 - Simulation COMSOL représentant le gradient de température dans le dispositif (coupe r,z avec symétrie axiale).
Paramètres : 4°C sur la surface, 40 V appliqués entre les électrodes.

4.4. Éléments de design du dispositif μ LAP

4.4.1. Structure fractale

Le dispositif comporte un élément de design plutôt complexe que l'on appellera « structure fractale » inspirée de la structure « flattened rhombus-shaped » décrite par Saias et al. (2011)¹⁷³. Cette structure a pour but de maximiser la répartition du débit. Comme le précise Saias, cette méthode permet de répartir uniformément la vitesse hydrodynamique sur une section, ce qui n'est pas le cas dans un Poiseuille où la vitesse est maximale au centre. Dans notre cas, cette structure fractale est placée en aval de la membrane afin de récupérer l'ADN concentré à la membrane uniformément sur sa surface. Aussi, la récupération de solution dans un tube nécessite une réduction de la section de sortie par rapport à la section de membrane. La forme de la structure permet de passer d'une section de 1,2 cm de diamètre, soit la section de passage de fluide à travers la membrane, à une section de 700 μ m en sortie de dispositif pour la collecte aisée de faibles volumes (de l'ordre d'une goutte de 20 μ L). La diminution de section implique donc la présence d'un volume mort entre la membrane (là où l'ADN est concentré) et la sortie (où cet ADN est collecté).

La Figure 51 A est une simulation COMSOL d'un système comportant une structure fractale en sortie (bas) et une structure non fractale en entrée. On observe une répartition inhomogène du flux en amont du système : l'absence de structure fractale se traduit par une vitesse d'écoulement plus importante au centre que sur les bords. Le flux de molécules est de plus accumulé de manière inhomogène sur la membrane puisque l'apport de matériel se fait essentiellement au centre. En revanche, la répartition de la vitesse hydrodynamique est davantage uniforme sur la sortie par la présence d'une structure fractale. La Figure 51 B présente une structure fractale en entrée comme en sortie et donne ainsi une répartition plus homogène de la vitesse hydrodynamique selon la surface.

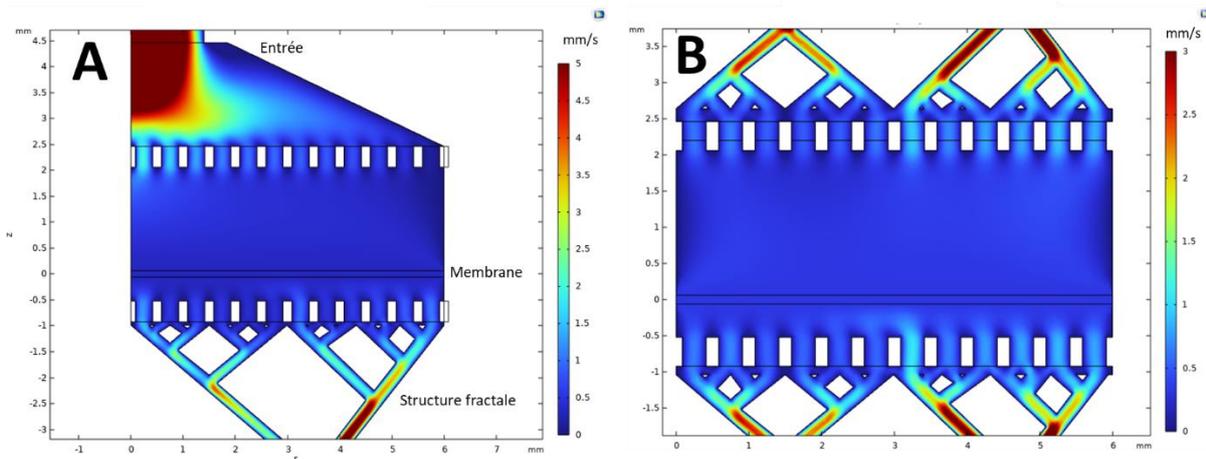


Figure 51 - Simulation COMSOL de la vitesse hydrodynamique dans deux modèles de dispositif : (A) sans structure fractale en entrée (haut) et avec structure fractale en sortie (bas). Coupe r,z avec symétrie axiale. ; (B) avec structure fractale en entrée et en sortie. En blanc (pas d'écoulement) sont représentées les grilles d'électrode. Une pression d'1 bar est appliquée entre l'entrée et la sortie.

La Figure 52 présente la structure fractale en représentation 3D (A et B), en images de pièces imprimées (C et D) ainsi que la reconstruction d'images en coupe par imagerie en tomographie X (E).

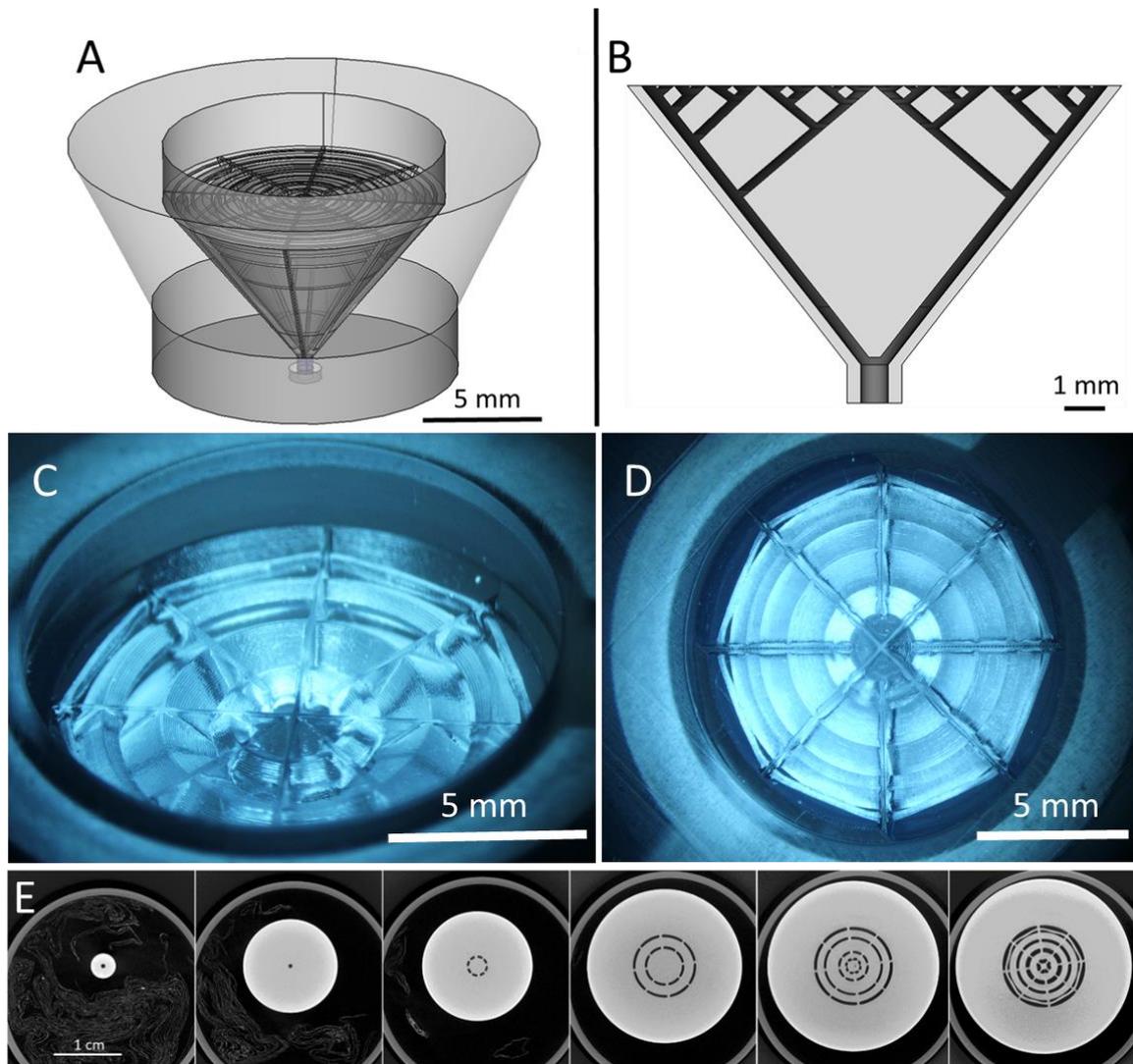


Figure 52 – Structure fractale. (A) Représentation 3D (FreeCAD) en vue d'ensemble avec transparence. (B) Représentation 3D (FreeCAD) en vue en coupe : les canaux d'une forme conique et d'une largeur de $240\ \mu\text{m}$ apparaissent en noir. (C) et (D) Images en loupe binoculaire de la structure vue de $\frac{3}{4}$ et de dessus. (E) Reconstruction d'images en coupe du support membranaire par Tomographie X (vue de dessus). La distance en z entre chaque coupe est de 2mm. Les canaux sont visibles en noir. La première image représente le bas de la pièce et la sortie unique. La dernière image représente le haut de la structure fractale.

4.4.2. Anciens designs

Avant d'adopter le format actuel, l'architecture du dispositif a beaucoup évolué au cours de cette thèse. Nous allons brièvement montrer cette évolution, en incluant également les mauvaises directions qui ont pu être prises mais qui ont à chaque fois permis d'améliorer la compréhension du système. Le Tableau 9 récapitule 3 familles de versions du dispositif en fonction de leur écoulement (Haut-Bas, Horizontal et Bas-Haut) et le comportement des bulles d' H_2 associé. Nous allons décrire ces familles dans les paragraphes suivants.

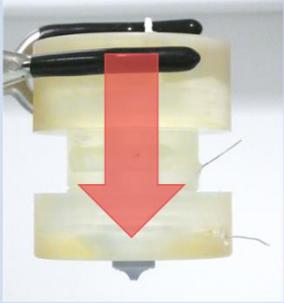
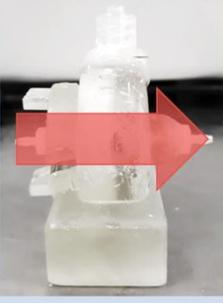
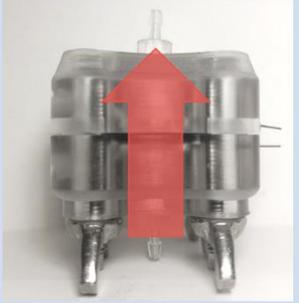
| Écoulement | Haut-Bas | Horizontal | Bas-Haut |
|------------|---|--|---|
| Image |  |  |  |
| Bulles | H_2 remontent sous la membrane | Évacuation de bulles | H_2 évacuées |

Tableau 9 – Récapitulatif de différents modes d'écoulement en fonction du design.

4.4.3. Evolution des designs

L'une des variations est l'orientation du système qui est liée à la problématique des bulles. Les toutes premières versions du système étaient verticales, avec un écoulement du haut vers le bas (Voir Tableau 9 et Annexe C pour plus de détails). L'inconvénient de ce format est que les bulles produites par la cathode (en aval) remontent sous la membrane et écrantent rapidement le champ électrique. Nous nous sommes alors rapidement dirigés vers un système horizontal avec chambre d'évacuation des bulles, exposé dans la partie suivante. Le système de serrage des éléments du dispositif est également passé d'un système où les parties sont vissées entre elles par des pas de vis imprimés en 3D, à un système où le serrage est effectué via des vis métalliques et des écrous à oreilles.

4.4.4. Evacuation des bulles

Le système avec évacuation des bulles, qui correspond à l'écoulement horizontal Tableau 9 est présenté sur la Figure 53. Comme déjà abordé, la majorité des bulles produites sont présentes à la cathode côté sortie. Le canal d'évacuation des bulles est ainsi placé juste au-dessus de la cathode. Les bulles remontent par poussée d'Archimède dans le canal. A l'extrémité de ce canal est placée un embout de vissage permettant soit (1) de visser un filtre hydrophobe (par exemple en PTFE) par lequel l' H_2 est susceptible de s'échapper contrairement à la solution, soit (2) de visser un tube qui permet de collecter le flux qui s'échappe par cette « cheminée » lorsque la sortie du système est bouchée.

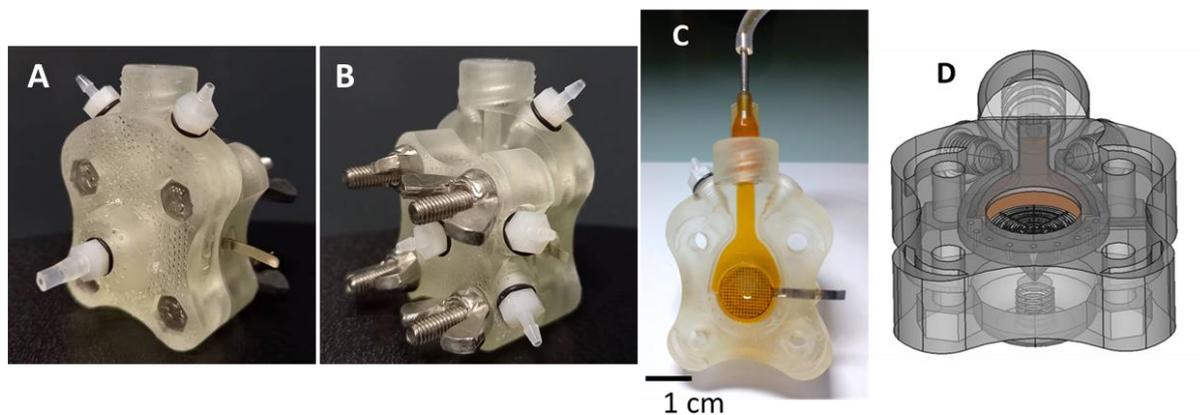


Figure 53 – Ancien dispositif horizontal avec évacuation de bulles à la cathode. (A) et (B) Photos du dispositif fermé. (C) Photo de la partie interne outlet/cathode. Une solution colorée orange met en évidence le canal d'évacuation des bulles. (D) Design 3D (FreeCAD) du même dispositif vue de 3/4, le canal est mis en évidence en orange.

Ce système quo qu'efficace pour l'évacuation des bulles et la tenue d'applications de tensions pendant plusieurs dizaines de minutes sans variation de courant, n'a pas été retenu pour la suite des utilisations. Il a été identifié qu'il favorisait la fuite d'ADN (5.2), et nous supposons que la chambre d'évacuation peut induire une inhomogénéité du champ hydrodynamique sur la membrane. Ceci n'a pas été vérifié par simulation.

4.4.5. Système vertical bas-haut

Nous avons finalement décidé de nous orienter vers un système vertical où l'injection a lieu en bas. Les bulles émises par la cathode sont majoritairement éliminées par le flux vers la sortie. Même s'il peut y avoir des bulles d' O_2 sous la membrane, nous avons montré l'obtention d'un courant stable de 6,5 mA pendant 10 min sous une tension de 30 V sur membrane $2/123 \cdot 10^5$, soit une tension élevée dans notre plage de performance : on s'assurera de ne pas trop excéder cette limite. C'est ce format de dispositif qui est utilisé dans les expériences des chapitres suivants, sauf mention contraire. Le dernier design en date du système est donné en Annexe D.

4.5. Conclusion du chapitre 4

In fine, nous pouvons tenter de dégager une plage de performance du système, même si cette dernière peut varier considérablement en fonction des tailles d'ADN visées, des membranes utilisées, de la salinité de la solution, etc. Pour parvenir à concentrer les plus petits fragments de 100 bp comme nous le verrons dans le chapitre suivant, il est nécessaire d'appliquer des champs élevés au-delà de 2 kV/cm, ce qui correspond à des tensions jusqu'à 40V et des courants pouvant atteindre plus d'une dizaine de mA. La tension peut être appliquée pendant environ une dizaine de minutes avec un dispositif refroidi. C'est dans une visée de concentration des plus petites tailles que l'on rencontre les limites de notre système ; à l'inverse, le haut poids moléculaire, qui ne nécessite que des tensions faibles, n'a pas besoin de refroidissement pour fonctionner efficacement. Les débits d'injection typiquement appliqués sont autour de 300 μ L/min, ce qui permet de traiter un grand volume.

La Figure 54 résume comment l'application d'un champ électrique engendre un certain nombre de modifications dans le système qui peuvent altérer les performances de concentration de l'ADN. Une augmentation du courant génère de l'échauffement qui augmente la conductivité et diminue la viscosité, atténuant la force transverse qui concentre l'ADN. La présence d'un refroidissement dans le système nous permet de diminuer cette influence néfaste. Par ailleurs, l'augmentation du courant augmente l'électrolyse de l'eau, c'est-à-dire la production de bulles et la variation du pH localement entre l'anode et la cathode. Nous verrons dans le chapitre suivant comment nous supposons que le pH pourrait détériorer l'ADN.

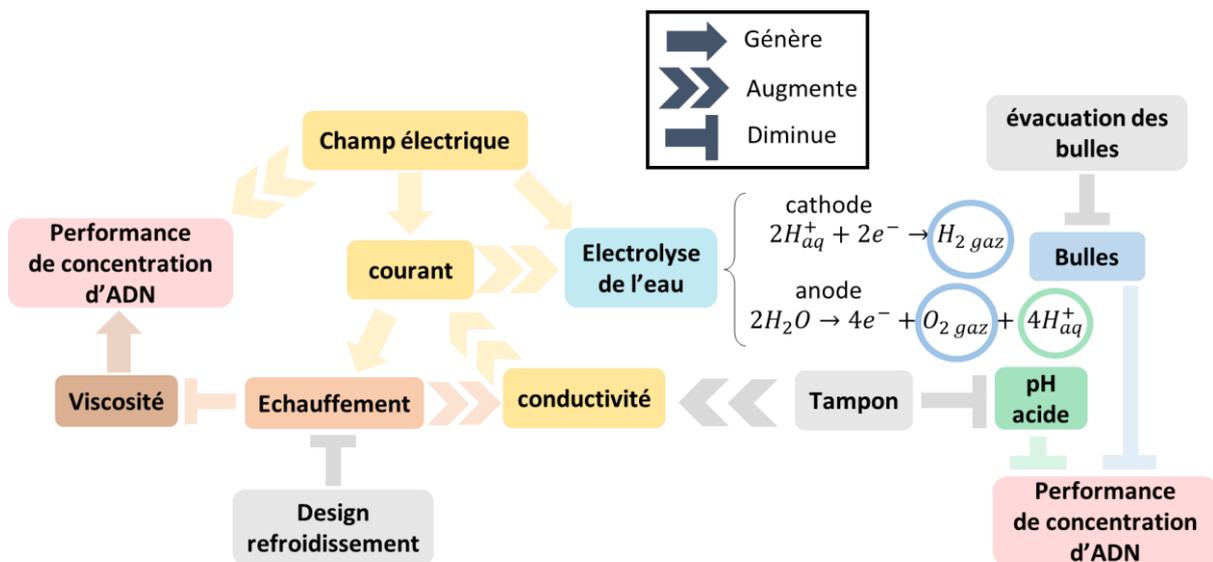


Figure 54 - Schéma récapitulatif des influences des paramètres expérimentaux sur le système lors de l'application d'un champ électrique.

Chapitre 5

Performances du système

μ LAP

Etude du système sur solution idéale d'ADN

Ce chapitre a pour but de présenter les performances du dispositif dans un cadre idéal, c'est-à-dire avec des solutions artificielles d'ADN qui maximisent ses performances. Typiquement, un fragment d'ADN ou un ladder est ajouté à une solution viscoélastique de PVP 360 kDa 5% et de tampon BPTE.

Nous présentons dans ce chapitre les fonctions essentielles, à savoir la concentration d'ADN et la séparation en taille. Nous détaillons les différents protocoles expérimentaux, avec ou sans rinçage, et les résultats obtenus pour la concentration d'ADN de différentes tailles. Nous montrons aussi comment varier la sélection en taille de l'échantillon. De plus, nous présentons le phénomène de fuite (ADN non retenu à la membrane), et notre modèle physique de plaquage de l'ADN à la membrane. Nous verrons également la problématique de perte d'ADN, les réponses préliminaires que nous avançons quant à son origine, et les solutions proposées pour limiter les défauts du système.

5.1. Optimisation de la concentration d'ADN

Les paragraphes suivants ont pour but de détailler les procédés d'expériences de concentration d'ADN dont les résultats seront exposés plus loin dans ce chapitre.

5.1.1. Concentration en flux continu

La Figure 55 illustre le procédé de concentration en flux continu. Ce procédé est le plus simple : une pression, le plus souvent continue, est appliquée à un tube contenant un mélange de tampon (BPTe et PVP) et d'ADN (ladder ou fragment unique) que nous appellerons « solution d'ADN ». L'injection résulte en un débit d'environ 300 μ L/min. Ainsi dans une étape (1), le dispositif est rempli de solution d'ADN. L'étape (2) dite de concentration consiste à appliquer la tension et à retenir l'ADN sur la membrane. La collecte des échantillons en sortie permet d'évaluer les « fuites d'ADN » (Voir 5.2). La dernière étape (3) consiste en un retour à 0V pour libérer l'ADN retenu à la membrane et le récupérer dans un échantillon concentré appelé « enrichissement ».

La durée de l'expérience est d'environ 5 min : la tension est appliquée pendant 3 min pour un temps de collecte à 0V de 2 min.

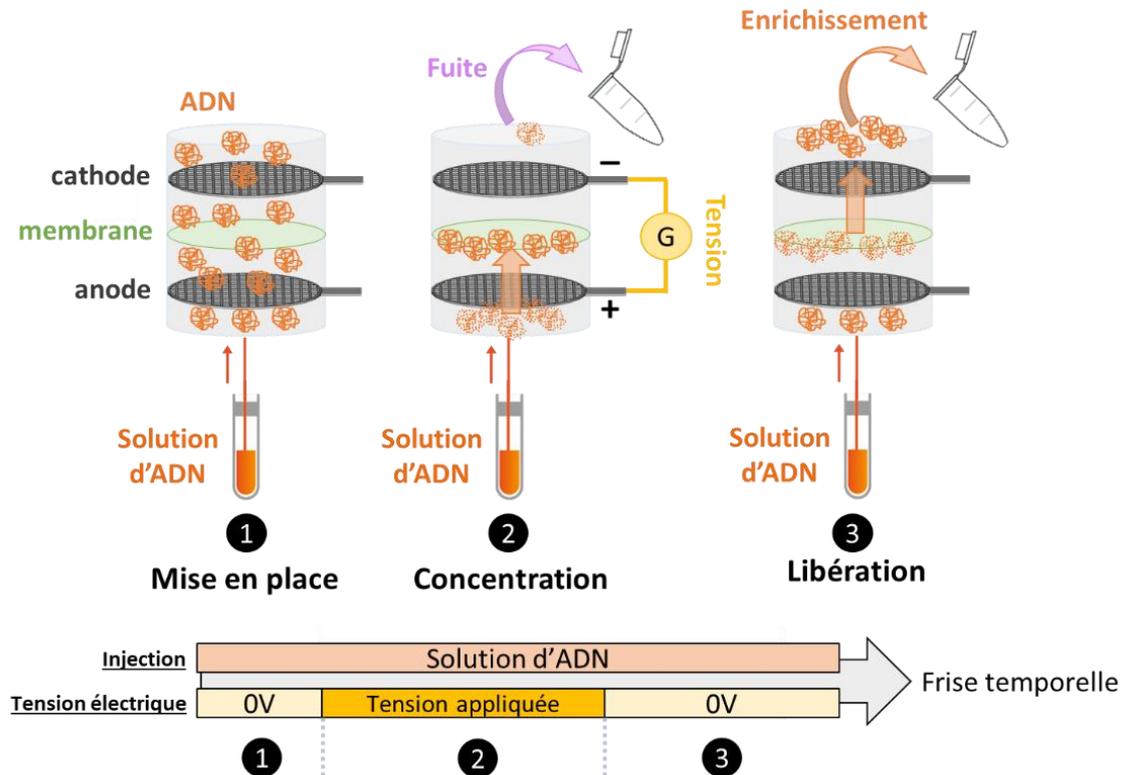


Figure 55 – Procédé de concentration en flux continu. (1) Le dispositif est rempli de solution d'ADN (BPTe + PVP + ADN). (2) La tension électrique est appliquée : l'ADN est concentré à la membrane. Les échantillons de collecte en sortie révèlent d'éventuelles fuites d'ADN. (3) La tension est coupée, l'ADN concentré à la membrane est libéré ce qui résulte en une augmentation de la concentration en sortie, on appelle cette fraction l'enrichissement.

5.1.2. Concentration avec rinçage

Le procédé de rinçage diffère du précédent par l'utilisation d'une valve 3-ports/2-voies, que l'on appellera 2-Switch qui permet l'alternance entre l'injection d'une solution de rinçage (tampon BPTe et PVP) et la solution d'ADN (Voir 3.5.2). Cette solution d'ADN contient du PVP en même concentration

que la solution de rinçage pour éviter toute irrégularité dans l'alternance d'injection entre les solutions. Dans ce procédé illustré Figure 56, le dispositif est d'abord rempli de tampon (1) puis l'ADN est injecté avec application de tension pour le concentrer à la membrane (2). S'ensuit alors un temps de rinçage du dispositif avec l'injection de solution tampon, tout en gardant l'ADN concentré à la membrane par l'application de la tension (3). L'ADN concentré est finalement libéré par le retrait de la tension (4). On obtient une solution purifiée et éventuellement enrichie en ADN.

La durée d'expérience est ici allongée par le rinçage d'environ 3 min par rapport à une expérience en flux continu.

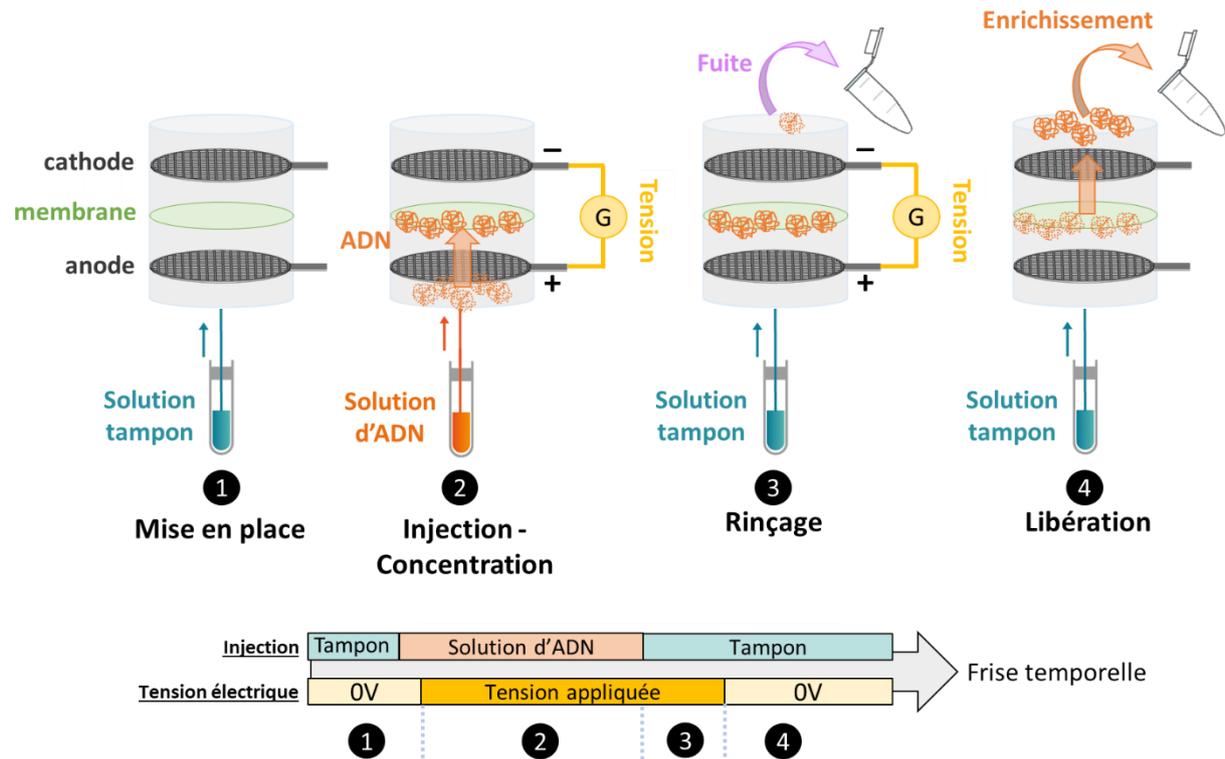


Figure 56 - Procédé de concentration avec rinçage. (1) Le dispositif est rempli de solution tampon (BPTe + PVP). (2) La solution contenant de l'ADN est injectée dans le dispositif mis sous tension. L'ADN est concentré à la membrane. (3) L'injection se fait ensuite avec une solution tampon avec une tension toujours maintenue. L'ADN est gardé à la membrane pendant que la solution est rincée. D'éventuelles fuites sont mesurées en sortie de dispositif. (4) La tension est relâchée, l'ADN concentré est libéré de la membrane et est récupéré dans un tube que l'on appelle « enrichissement ».

5.1.3. Prélèvement et mesures de concentration

Les mesures de quantification d'ADN sont essentiellement réalisées avec un fluorimètre Qubit. Cet instrument peu onéreux permet de réaliser des mesures sélectives (l'ADN double brin est marqué en fluorescence : le simple brin, les nucléotides libres et l'ARN sont exclus du marquage) avec une très bonne sensibilité jusqu'à 5 pg/ μ L pour un volume de 20 μ L (High sensitivity kit). Comme les mesures au Qubit sont très rapides, on peut suivre de manière précise le comportement de l'ADN dans le dispositif par un grand nombre de relevés. Les mesures de concentration peuvent également être effectuées par BIABooster qui est bien plus sensible (100 fg/ μ L). Cependant, ce dernier est principalement utilisé pour identifier les profils de taille. Nous détaillerons la méthode de caractérisation par BIABooster dans la section 5.3.2.

Les fractions d'échantillons d'ADN en sortie de dispositif sont collectées dans des tubes de 500 μ L. Une goutte en sortie de système représente environ 20 μ L. Les échantillons de contrôles de fuites, qui sont

récupérés lorsque la tension est appliquée, sont généralement collectés pendant une durée d'une minute continue. Lorsque la tension est stoppée, les relevés sont beaucoup moins espacés, avec deux gouttes par relevé (Figure 57).

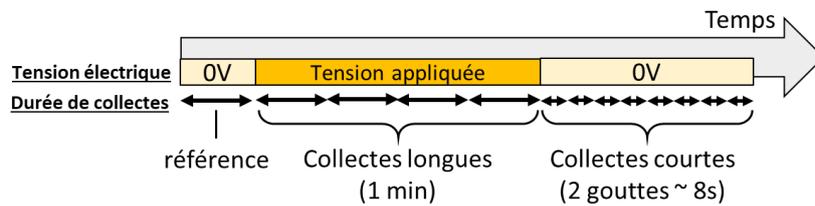


Figure 57 - Procédure de prélèvement classique pour l'analyse de concentration d'ADN au Qubit

En définitive, l'intégralité du volume d'ADN traité est collectée. Chaque tube de collecte est pesé afin d'en évaluer le volume. On retrouve avec cette mesure le débit moyen pendant l'expérience, mais également la masse d'ADN dans chaque tube à partir de la mesure de concentration. Ces évaluations de masse et volume permettent entre autre d'estimer la masse totale d'ADN et le volume total traités. Ce procédé est réalisé entièrement de manière manuelle.

5.1.4. Profil de concentration d'ADN

La Figure 58 présente les profils de concentration des collectes au cours du temps, mesurés au Qubit. En pointillé noir est indiquée la valeur de concentration de l'échantillon d'ADN injecté (référence). L'expérience en flux continu est représentée en bleu : on distingue nettement une déplétion de la concentration en ADN lors de l'application de la tension (rétention de l'ADN à la membrane), puis à 0V un pic de concentration (enrichissement). L'expérience avec rinçage est représentée en vert. La frise temporelle indique les étapes d'injection pour cette expérience. La courbe en rouge est l'expérience contrôle de celle avec rinçage : les étapes d'injection sont les mêmes, mais aucune tension électrique n'est appliquée. L'expérience de rinçage avec ADN a un profil de concentration très similaire à celui obtenu en flux continu, à l'exception du début et de la fin de l'expérience où la concentration d'ADN débute et termine à 0.

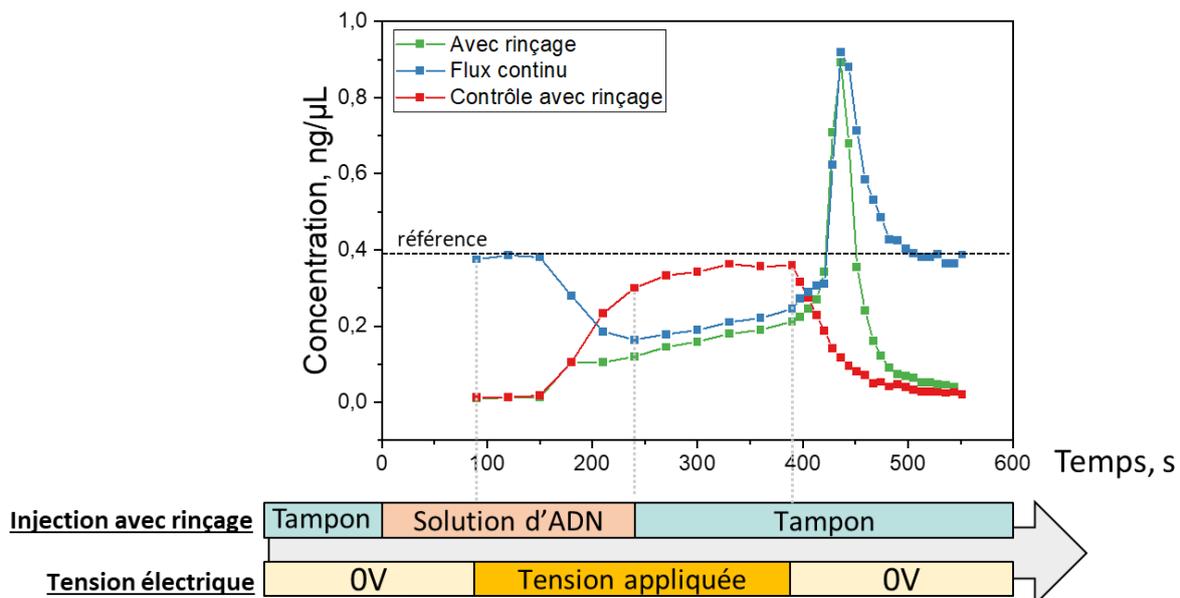


Figure 58 - Profil de concentration d'ADN comparatif entre une injection en flux continu et avec rinçage. La frise temporelle rappelle les étapes successives d'injection dans le cas du rinçage, ainsi que les étapes d'application de tension. Condition expérimentales : membrane 5-46 10^5 , ADN λ (48 kb).

Une autre méthode de représentation de l'expérience, complémentaire à la précédente est illustrée Figure 59. Sur cette figure, on représente la masse cumulée d'ADN, en fonction du volume collecté cumulé au fur et à mesure des fractions. Les expériences en flux continu (A) et avec rinçage (B) sont toutes deux représentées avec leurs expériences contrôle sans application de tension. Sur les figures, sont indiquées les pentes des courbes aux moment critiques, ces pentes correspondent à une concentration (en $\text{ng}/\mu\text{L}$). En rouge les pentes correspondent à la concentration de l'échantillon d'ADN injecté. En bleu et vert, elles correspondent grossièrement à la concentration de l'échantillon du pic d'enrichissement. Cette représentation permet de rendre compte de la masse totale et du volume total traités durant l'expérience.

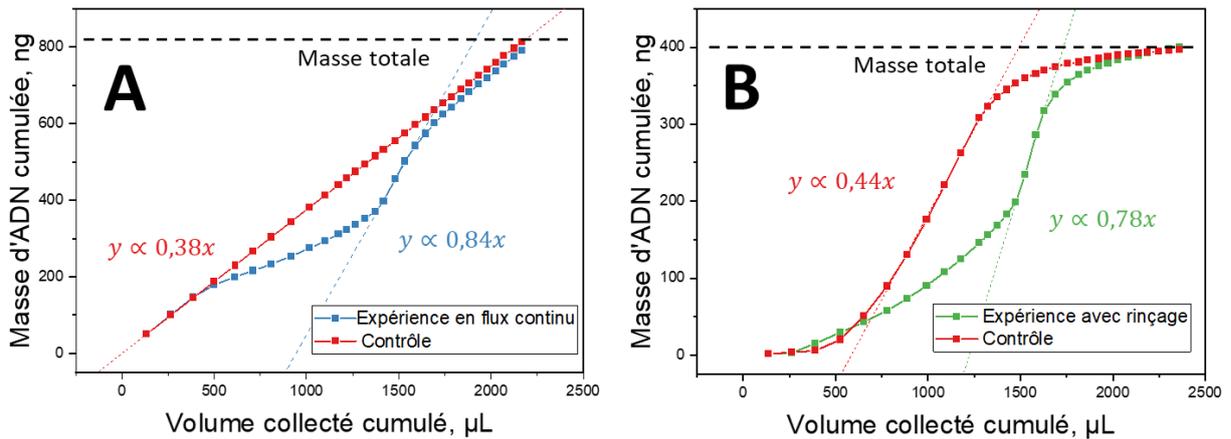


Figure 59 – Profil de masse d'ADN cumulée en fonction du volume pour des expériences de concentration. (A) Expérience en flux continu (B) expérience en rinçage. Les courbes rouges correspondent aux expériences contrôles, où l'injection est identique mais aucune tension électrique n'est appliquée.

Ces différentes courbes nous permettent d'introduire une notion importante que nous développerons dans la suite du manuscrit qui est la fuite d'ADN. On remarque sur la Figure 58 que lors de l'application de la tension, la concentration d'ADN est déplétée sans pourtant atteindre une concentration nulle : cela indique qu'une partie de l'ADN n'est pas concentrée à la membrane : elle fuit. L'évaluation des courbes de masse (Figure 59) rend compte directement de la quantité d'ADN perdue lors de la fuite.

Les objectifs d'optimisation de la fonction de concentration sont donc les suivants : minimiser les fuites et obtenir un pic d'enrichissement le plus fin possible. Sur une courbe de masse sur expérience de rinçage (Figure 59 B), cela se traduirait par un profil proche d'une fonction de Heaviside. Nous allons montrer dans la section suivante comment l'enrichissement peut être amélioré, puis nous aborderons notre modèle de fuite.

5.1.5. Affinement du pic d'enrichissement

Comme on peut l'observer Figure 58, le système comporte un certain délai de réponse entre un actionnement (hydrodynamique ou électrique) et sa réponse dans la concentration mesurée en sortie. Ce délai est intrinsèque au design du système et caractéristique du phénomène de dispersion. Du point de vue de l'injection, la courbe de contrôle du rinçage (en rouge Figure 58) suit une fonction erf caractéristique de la diffusion de l'ADN dans le système, lors de l'injection puis lors du rinçage. Le délai entre le début de l'injection et la mesure du maximum de concentration avec rinçage est ici d'environ 4 min. Ce temps correspond au remplissage du volume des tubes d'injection entre le tube de solution et le 2-switch, puis le tube d'injection entre le 2-switch et le dispositif (l'intégralité du tubing représente environ 100 μL) et enfin le volume intrinsèque du dispositif qui est d'environ 1 mL, variable en fonction du design, notamment l'éloignement entre les électrodes et la membrane (ici on a 1,2 mL

à un débit d'environ 300 μ L/min en 4 min). Il existe également un délai de réponse entre l'arrêt de la tension et son observation en sortie par l'arrivée du pic de concentration. Ce délai est bien plus court que pour l'injection puisque l'ADN est concentré à la membrane et que le volume entre la membrane et la sortie est d'environ 400 μ L d'où la réponse en environ 1 min (Figure 58).

L'élargissement de la bande d'ADN dans le sens de l'écoulement est un phénomène que l'on appelle dispersion de Taylor : comme cette bande est soumise à un écoulement de Poiseuille, elle subit une déformation parabolique dans le sens de l'écoulement, on appelle cela l'advection. Ensuite, la diffusion radiale va limiter l'advection en homogénéisant la bande en raison du gradient de concentration des espèces. Tout ceci résulte en une bande dispersée : ce phénomène est illustré en Figure 60.

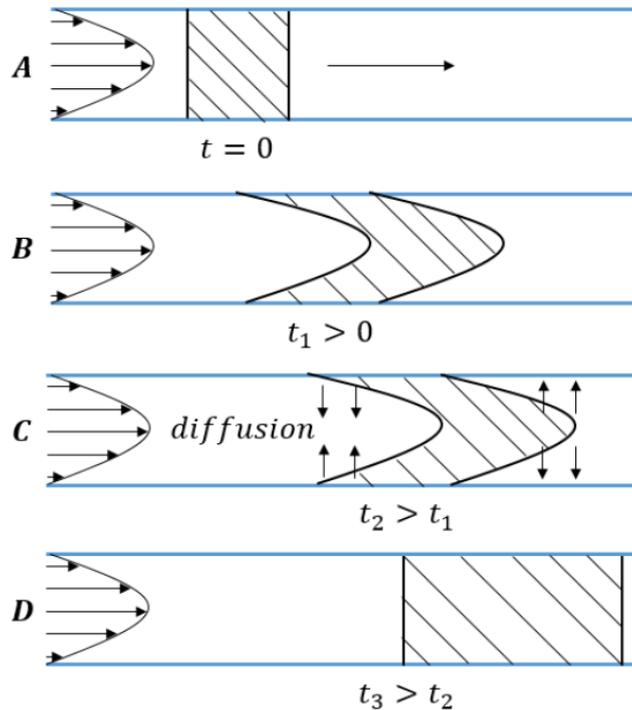


Figure 60 - Schéma explicatif de la dispersion de Taylor. (A) Bande dans un canal soumis à un profil de Poiseuille. (B) Déformation de la bande par le profil de vitesse entraînant son advection. (C) La diffusion radiale tend à homogénéiser l'asymétrie de la bande. (D) Après un certain temps, la bande est à nouveau symétrique mais est élargie par rapport à l'état initial de la bande [extrait de la thèse de Jeffrey Teillet (2020)¹⁷⁴].

Nous allons montrer comment il est possible de réduire cette dispersion.

La formule de la diffusion effective dans le cas d'une dispersion de Taylor est ¹⁷⁵ :

$$D_T = D \left(1 + \frac{P_e^2}{48} \right) \sim \frac{v^2 R^2}{48D^2} \text{ avec } D = \frac{k_B T}{8\eta a} \quad (66)$$

Le pic en sortie est une gaussienne, et la largeur du pic w , en considérant la prise en compte de 95% des molécules de la gaussienne, peut s'exprimer comme :

$$w \cong 4\sqrt{2D_T t} \quad (67)$$

Avec t le temps de sortie que l'on peut exprimer comme

$$t = \frac{H_{\text{sortie}}}{Q} = \frac{H_{\text{sortie}}}{v_{\text{hydro}} \pi R^2} \quad (68)$$

Avec H_{sortie} le volume de sortie du dispositif.

On obtient donc *in fine* :

$$w = \frac{4}{\sqrt{6\pi}} \frac{\eta a \sqrt{v H_{\text{sortie}}}}{kT} \quad (69)$$

D'après cette formule on comprend qu'on peut minimiser la dispersion par différents mécanismes. Mettons de côté la viscosité qui est fixée, et la taille de la molécule à séparer. On peut donc jouer essentiellement sur deux paramètres : le premier est l'actionnement, en baissant la pression entraînant la diminution de la vitesse de l'écoulement ; le deuxième est géométrique en diminuant le volume de sortie.

La Figure 61 présente par exemple comment la largeur du pic peut être réduite en diminuant le volume de sortie (volume entre la membrane et sortie). Ici on compare les concentrations d'ADN sur deux dispositifs différents : le premier en bleu comporte un volume de sortie de 400 μ L (absence de structure fractale et distance de 2 mm entre l'électrode et la membrane) et le deuxième en rouge comporte un volume de sortie de 180 μ L (présence de structure fractale et distance de 500 μ m entre l'électrode et la membrane). La concentration mesurée est normalisée par la concentration de la référence (solution injectée) pour chaque taille. On observe une variation d'un facteur deux des largeurs des pics entre les deux expériences, plutôt en accord avec le calcul de (69) qui donne un facteur 1,6 (ajusté avec la différence de débit mesurée).

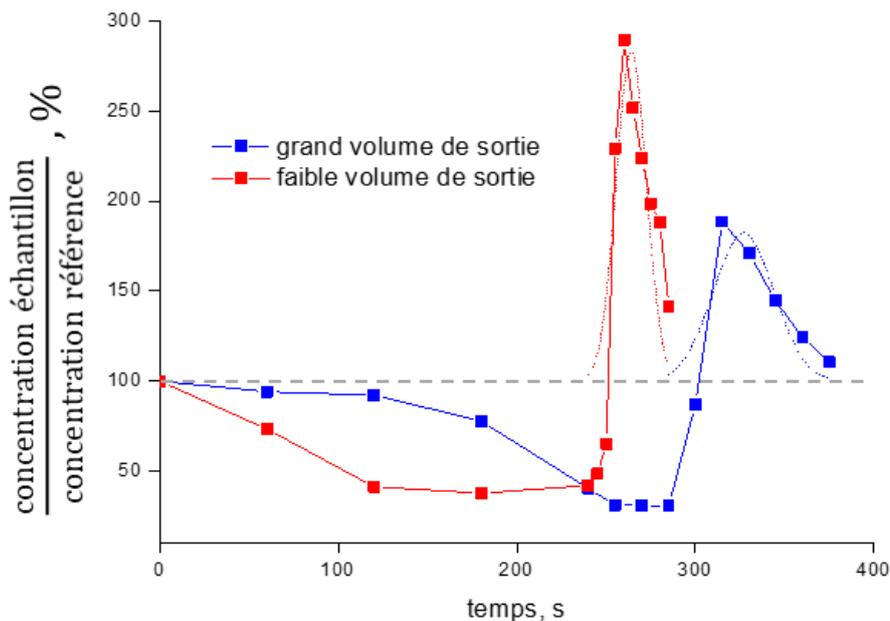


Figure 61 - comparaison des résultats de concentration d'ADN λ entre deux dispositifs à différents volumes de sortie : en bleu 400 μ L, en rouge 180 μ L. En pointillé sont représentées les approximations de fonctions gaussiennes des pics d'enrichissement. Conditions expérimentales : injection continue d'ADN, membrane 5-46 10^5 , solution PVP 5% TBE 1x.

5.1.6. Observation de la concentration à la membrane

Les expériences sur puce xurographique permettent de rendre compte visuellement de la concentration de l'ADN. La Figure 62 rapporte les images de concentration d'ADN (500 bp) marqué en fluorescence et observé au microscope et les profils d'intensité lumineuse associés. L'expérience est réalisée à flux continu de solution. Lorsque la tension est appliquée, l'ADN est concentré à la membrane : le profil d'intensité révèle une concentration proportionnelle au temps. Lorsque la tension est relâchée, on observe un pic d'intensité lumineuse correspondant à la libération de l'ADN. Ces observations viennent conforter les mesures de concentration présentées plus tôt.

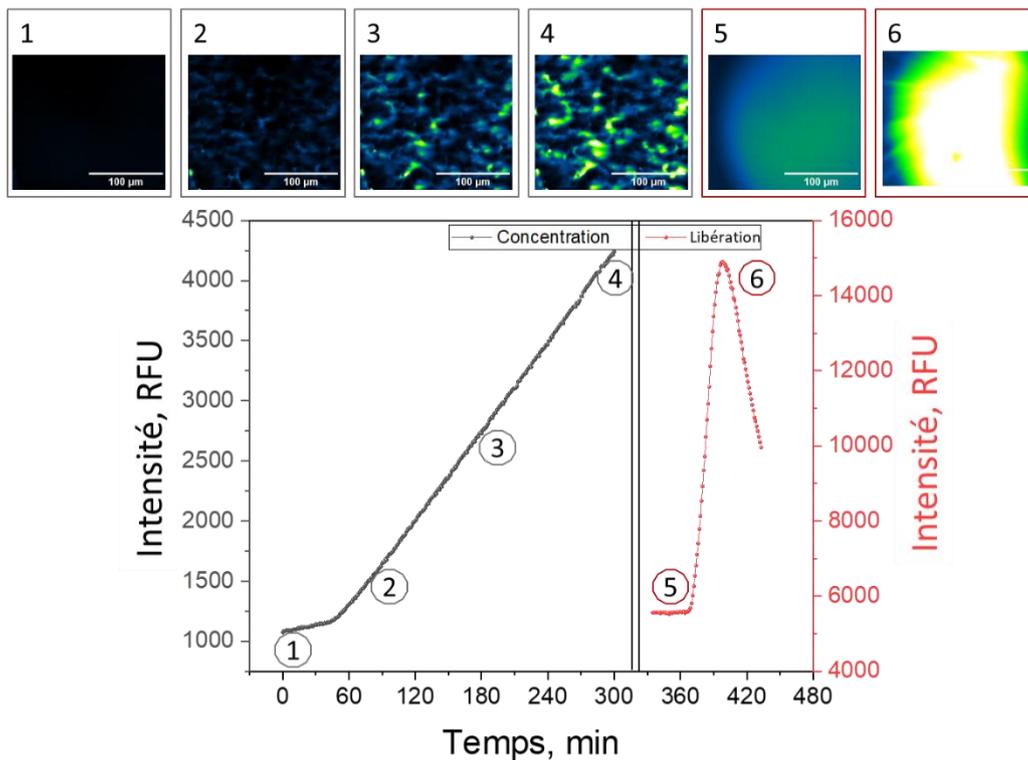


Figure 62 – Observation au microscope de la concentration d'ADN (500 bp) marqué en fluorescence (Yo-Pro1) sur puce xurographique. La concentration est effectuée pendant 5 min sur une membrane $2-123 \cdot 10^5$. La courbe en noir (gauche) correspond à l'intensité lumineuse (RFU) détectée sur la membrane lors de l'application de la tension ; la courbe rouge (droite) correspond à l'intensité lumineuse détectée à 0 V. Les images numérotées sont rapportées à des moments de l'expérience sur les profils d'intensité.

5.2. Phénomène de fuite d'ADN

5.2.1. Considération générale sur la fuite

La fuite d'ADN qualifie la fraction d'ADN non retenue à la membrane lors de l'application d'une tension. Cette fuite peut s'expliquer par un certain nombre de phénomènes différents. Par exemple, lorsque les bulles sont trop présentes sous la membrane, le champ électrique est écranté, l'ADN n'est plus stoppé et fuit. Aussi, lorsque l'échauffement est trop important, la viscosité diminue, l'écoulement s'accélère et la force transverse diminue. En outre, il existe un mécanisme intrinsèque lié à la force transverse qui explique que l'ADN fuit si l'épaisseur de membrane n'est pas suffisante. Nous proposons ainsi un modèle expliquant l'origine des fuites.

5.2.2. Etude du plaquage d'ADN en fonction de la longueur de canal

L'idée générale de cette étude est la suivante : lorsque l'ADN pénètre dans un pore de la membrane, il est immédiatement soumis à la force transverse de plaquage qui est l'élément central de notre technologie. La molécule suit alors une certaine trajectoire balistique, à la fois longitudinale par le couplage de sa vitesse hydrodynamique dans le profil de Poiseuille et sa vitesse électrophorétique en opposition, et radiale par cette force transverse. La Figure 63 illustre la fuite. La trajectoire de la molécule est indiquée en orange. En fonction de la position radiale de la molécule lors de son entrée dans le pore, elle peut être ou non arrêtée. Dans la situation A Figure 63, elle est suffisamment éloignée du centre (1) pour que sa trajectoire la porte près de la paroi à un point d'équilibre où la vitesse longitudinale est nulle (les vitesses hydrodynamique et électrophorétique s'annulent) (2). Elle est ensuite soumise essentiellement à l'électrophorèse (3) qui la ramène à l'entrée du pore, générant une zone de concentration de l'ADN sur la face d'entrée de la membrane (4). Dans la situation B en revanche, sa position radiale initiale est trop proche du centre. Elle n'a pas le temps d'être plaquée à la paroi avant de sortir du pore.

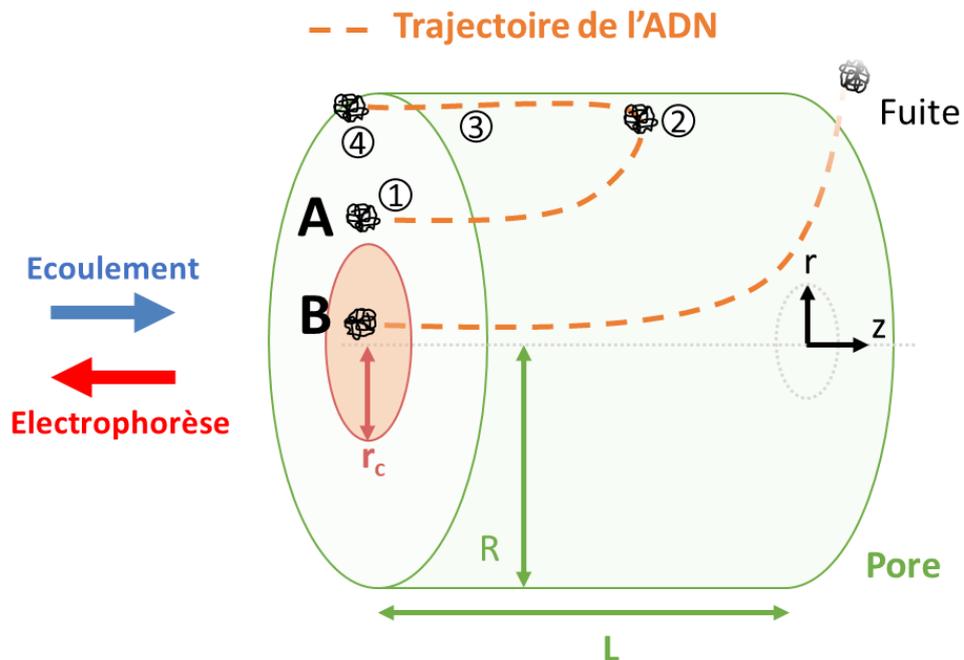


Figure 63 - Schéma de la trajectoire de l'ADN à travers le pore. Le pore a une longueur L et un rayon R . Dans un repère cylindrique on définit comme z la position longitudinale de la molécule et r sa position radiale. r_c est le rayon de coupure, à la jonction entre l'arrêt de la molécule et sa fuite. La molécule A entre à une position radiale suffisamment éloignée du centre pour être plaquée ($r > r_c$). La molécule B ($r < r_c$) est trop proche du centre à l'entrée du pore et fuit.

Exprimons maintenant cette trajectoire, et le lien que l'on peut faire entre la fuite et l'épaisseur de la membrane (la longueur du pore). Nous nous placerons dans un repère cylindrique où r est la position radiale ($r = 0$ est le centre de la canalisation ; $r = R$ la paroi du canal) et où z est la position longitudinale dans le pore, c'est-à-dire selon l'axe du cylindre ($z = 0$ l'entrée du pore ; $z = L$ la sortie du pore).

La formule de la force transverse telle qu'exprimée dans le chapitre 2 se lit :

$$F_T(r) = 16\pi K\tau\eta a v_{h0} v_e \frac{r}{R^2} \quad (70)$$

L'équation de frottement ou Loi de Stokes¹⁷⁶ nous permet de relier la force transverse à la vitesse transverse de la molécule :

$$F_T(r) = 6\pi\eta a \frac{dr}{dt} \quad (71)$$

L'estimation du nombre de Péclet ($P_{eM} = \frac{L_c v}{D}$ avec $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a}$) nous permet de négliger la diffusion par rapport à la convection, avec L_c longueur caractéristique $\sim 10^{-6}$ m ; v vitesse $\sim 10^{-2}$ m/s ; D coefficient de diffusion $\sim 10^{-13}$ m²/s. On obtient $P_{eM} \sim 10^5 \gg 1$ donc une convection qui domine largement la diffusion.

L'égalité entre les équations (70) et (71) nous permet de déduire :

$$\frac{dr}{dt} = \alpha r \quad \text{avec} \quad \alpha = \frac{8}{3} K\tau v_{h0} v_e \frac{1}{R^2} \quad (72)$$

La résolution d'équation différentielle d'ordre 1 nous renvoie l'expression de la position radiale de la molécule en fonction du temps :

$$r(t) = r_0 e^{\alpha t} \quad (73)$$

Avec r_0 la position initiale de la molécule à l'entrée du pore à $t=0$

A partir de l'expression de position longitudinale, on peut identifier si la molécule a été capturée ou non.

La vitesse longitudinale de la molécule s'exprime par la vitesse hydrodynamique et contre-électrophorétique :

$$\frac{dz}{dt} = v_{h0} \left(1 - \frac{r(t)^2}{R^2} \right) - v_e \quad (74)$$

En injectant (73) dans (74) on obtient l'expression de la position longitudinale en fonction du temps :

$$z(t) = (v_{h0} - v_e)t - \frac{r_0^2 v_{h0}}{R^2} \frac{1}{2\alpha} (e^{2\alpha t} - 1) \quad (75)$$

L'équation (73) nous permet d'exprimer t en fonction de r :

$$t = \frac{1}{\alpha} \ln \left(\frac{r}{r_0} \right) \quad (76)$$

Avec (75) et (76) on peut alors exprimer la position longitudinale de la molécule en fonction de sa position radiale :

$$z(r) = \frac{v_{h0} - v_e}{\alpha} \ln \left(\frac{r}{r_0} \right) - \frac{v_{h0}}{2\alpha} \left(\frac{r^2 - r_0^2}{R^2} \right) \quad (77)$$

La molécule d'ADN est estimée concentrée à la membrane dès lors que l'électrophorèse domine sur l'hydrodynamique ($v_e > v_h$) et qu'elle est alors ramenée vers l'entrée du pore. Cette condition est obtenue pour une molécule à quelques dixièmes de nm de la paroi, on appellera r_f cette position. Si L est l'épaisseur de membrane (la longueur du pore), il y a arrêt de la molécule pour $z(r_f) < L$. Appelons r_c le rayon de coupure (voir Figure 63), c'est-à-dire la position radiale initiale (à l'entrée du pore) en-dessous de laquelle l'ADN n'est pas arrêté [soit le cas particulier de r_0 tel que $z(r_f) = L$].

On peut donc écrire :

$$L = \frac{v_{h0} - v_e}{\alpha} \ln\left(\frac{r_f}{r_c}\right) - \frac{v_{h0}}{2\alpha} \left(\frac{r_f^2 - r_c^2}{R^2}\right) \quad (78)$$

En développant l'expression avec celle d' α en (72), on obtient l'expression complète :

$$L = \frac{3R^2}{8K\tau} \left[\frac{v_{h0} - v_e}{v_{h0}v_e} \ln\left(\frac{r_f}{r_c}\right) - \frac{1}{2v_e} \left(\frac{r_f^2 - r_c^2}{R^2}\right) \right] \quad (79)$$

Si l'on considère une répartition uniforme de l'ADN sur la section du pore à son entrée (Figure 63) on peut définir la fuite d'ADN Φ comme le rapport de la section correspondante à l'ADN perdu sur la section totale du pore, soit :

$$\Phi = \frac{r_c^2}{R^2} \quad (80)$$

L'expression reliant la longueur du pore et la fuite s'écrit donc :

$$L = \frac{3R^2}{8K\tau} \left[\frac{v_{h0} - v_e}{v_{h0}v_e} \ln\left(\frac{r_f}{R\sqrt{\Phi}}\right) - \frac{1}{2v_e} \left(\frac{r_f^2 - \Phi R^2}{R^2}\right) \right] \quad (81)$$

Cette expression peut être simplifiée, dès lors que l'on considère $v_e \ll v_{h0}$ (dans nos conditions expérimentales, on a $v_{h0} > 20v_e$). Ce qui nous permet de simplifier $v_{h0} - v_e \sim v_{h0}$, soit :

$$L \sim \frac{3R^2}{8K\tau v_e} \left[\ln\left(\frac{r_f}{R\sqrt{\Phi}}\right) - \frac{1}{2} \left(\frac{r_f^2 - \Phi R^2}{R^2}\right) \right] \quad (82)$$

En d'autres termes, cette simplification tend à négliger l'influence de la vitesse hydrodynamique sur la tendance à la fuite.

On peut aussi faire l'approximation que $r_f \sim R$, ce qui revient à l'expression simplifiée suivante :

$$L \sim \frac{-3R^2}{16K\tau v_e} [1 - \Phi + \ln(\Phi)] \quad (83)$$

Comme il n'est pas possible d'exprimer simplement r_c en fonction des autres variables du système, c'est également le cas de Φ . Nous allons donc l'exprimer numériquement avec un modèle. Pour obtenir ce modèle, nous devons nous appuyer sur des valeurs expérimentales afin de trouver une valeur moyenne de la constante de correction K. Nous avons ainsi évalué la fuite expérimentalement sur 9 expériences réalisées avec des conditions très différentes : membranes 2-123, 2-23, 2-48, 5-46, des vitesses hydrodynamiques de 2 à 20 mm/s et des champs électrique de 150 à 1900 V/cm, sur une taille d'ADN de 500 bp. Pour chacune de ces expériences, la valeur de K est déduite de la formule (79), en prenant en considération une valeur du temps de relaxation du fluide de $\tau = 2$ ms. La valeur moyenne de K obtenue est de $1,4 \cdot 10^{-3}$ (écart type de 10^{-3}). Le modèle de fuite qui prend en compte les valeurs moyennes de nos expériences ($v_{h0} = 11,57$ mm/s ; $v_e = 0,48$ mm/s avec $R = 2,5$ μ m) est

représenté en Figure 64. Les valeurs expérimentales de fuites sont représentées sur la figure (en rouge), et notre modèle (en bleu) est en accord avec les résultats expérimentaux.

A partir de ces résultats, on déduit que les fuites peuvent être diminuées géométriquement en augmentant l'épaisseur de membrane et en diminuant le rayon des pores. Elles peuvent également être réduites par l'actionnement en augmentant la vitesse électrophorétique, c'est-à-dire en augmentant le champ électrique.

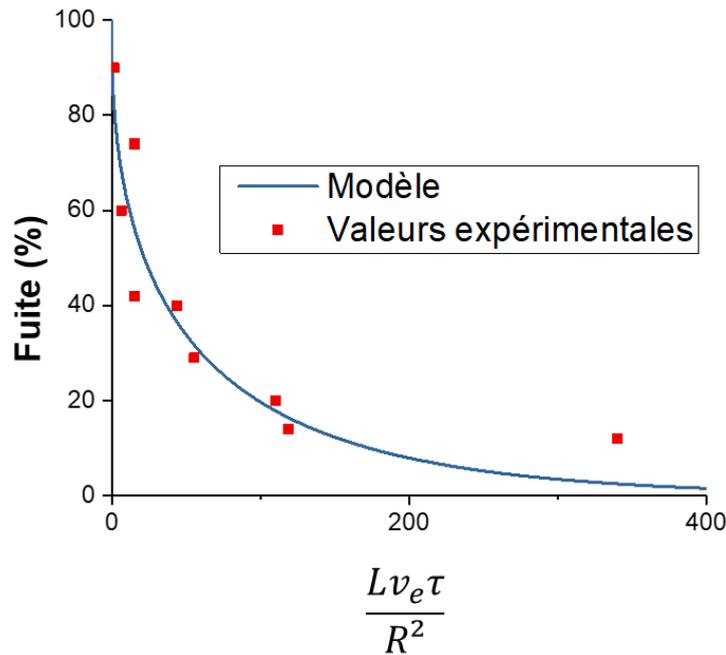


Figure 64 – Modèle de fuite en fonction des paramètres du système (épaisseur de membrane, vitesse électrophorétique, temps de relaxation du fluide et rayon du pore).

5.2.3. Conclusion sur les fuites

Pour résumer, les fuites peuvent être significatives si les paramètres de l'expérience sont mal choisis : la fuite peut être limitée par l'utilisation d'une membrane épaisse avec des pores de petite taille et en augmentant le champ électrique. Les limitations viennent cependant assez vite : des pores de $1 \mu\text{m}$ sont facilement sujets au colmatage et ne semblent donc pas pertinents sur un travail de purification, nous resterons donc à une limite à $2 \mu\text{m}$ de diamètre de pores ; l'épaisseur de membrane est limitée par le constructeur et $2/123 \mu\text{m}$ semble être le meilleur rapport d'aspect réalisable pour l'instant sans risquer une variation entre les sections d'entrée et de sortie du pore ; pour le champ électrique, comme nous l'avons déjà abordé, il provoque une augmentation du courant et donc de la production de bulles et de l'échauffement. Un fort champ électrique provoque également une plus grande perte d'ADN, comme nous allons le montrer dans la section explicative des pertes. Il est donc important de trouver un équilibre entre les pertes, les fuites et les performances de concentration.

5.3. Optimisation de la sélection en taille

5.3.1. Principe de sélection en taille

Le principe de la sélection en taille sur système μ LAP est identique à la vanne électrique présentée en 2.4.1. En fonction du couple d'actuation de champ électrique et de vitesse hydrodynamique, on peut concentrer à la membrane les tailles d'ADN de l'échantillon de manière différenciée. Ce couple définit une certaine taille-seuil ou cut-off et concentre en passe-bas : les tailles d'ADN au-dessus de ce cut-off sont concentrées alors que les tailles en dessous de ce cut-off fuient. Le procédé d'expérience est identique à celui présenté dans la section 0 (flux continu ou rinçage) avec l'application d'une tension continue puis un retour à 0 V. Dans les paragraphes suivants, nous verrons la méthode de caractérisation des échantillons et la preuve de concept par la variation du cut-off.

5.3.2. Méthode de caractérisation sur BIABooster

Pour analyser le profil en taille des échantillons, nous utilisons la technologie BIABooster développée par Adélis. Nous avons déjà abordé le principe de fonctionnement de la technologie BIABooster dans la section 2.3.2. Ici nous aborderons plus en détail notre méthode d'analyse de résultats. La raison qui préside au choix de cette technique de séparation est sa simplicité d'utilisation par rapport à une électrophorèse sur gel d'agarose par exemple. Egalement, cette technique possède une grande sensibilité permettant de réaliser des tests avec des concentrations faibles d'ADN (quelques pg/ μ L), et une fiabilité dans la mesure de concentration, par rapport à d'autres techniques comme le Bioanalyzer d'Agilent. Les mesures étaient effectuées à Adélis en début de thèse, puis ont ensuite été faites directement au LAAS avec un instrument prêté par Adélis sur une CE Agilent 1600.

Comme cette technique nécessite un temps de préparation et d'analyse bien supérieur à l'analyse de concentration au Qubit (compter une nuit pour l'analyse de 12 échantillons), les collectes durant l'expérience sont beaucoup plus restreintes. On analysera à chaque fois la référence, c'est-à-dire l'échantillon d'ADN injecté, et quelques échantillons durant la rétention et au niveau du pic d'enrichissement (voir Figure 65).

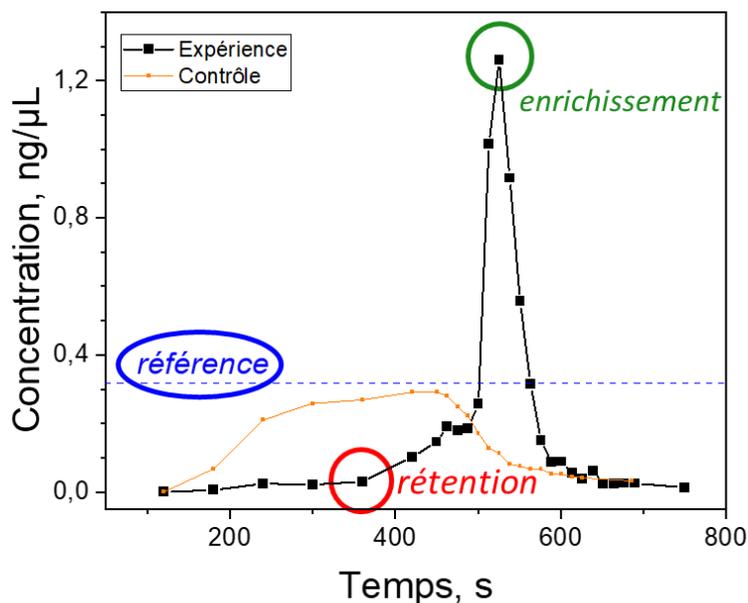


Figure 65 - Représentation des échantillons analysés sur BIABooster (en couleurs) à partir d'un profil de concentration obtenu au Qubit (en noir).

L'analyse de ces échantillons est présentée en Figure 66. (A) présente les résultats bruts de signaux de fluorescence, et (B) est l'interprétation de ces signaux.

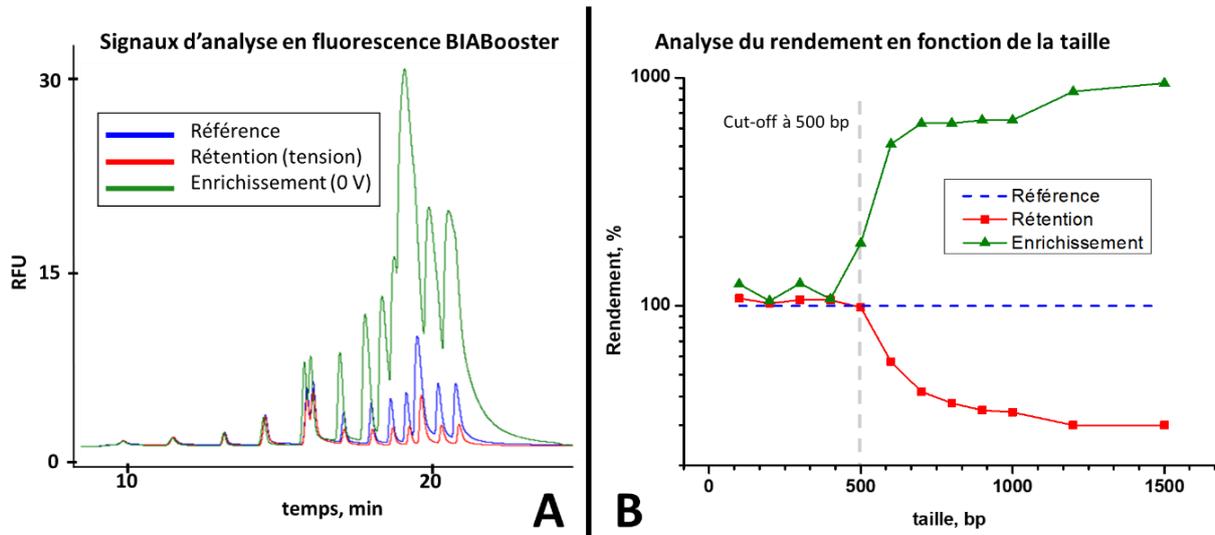


Figure 66 – Exemple de résultats d'analyse en taille et concentration d'échantillons par la technologie BIABooster. (A) Signaux de fluorescence (RFU pour relative fluorescence units) en fonction du temps sur BIABooster (B) Analyse des signaux par calcul du rendement en fonction de la taille. Les échantillons analysés ont été obtenus sur technologie μ LAP. En bleu l'échantillon ladder de référence avant son injection dans le dispositif. En rouge l'échantillon de rétention lorsque la tension est appliquée, et en vert l'échantillon d'enrichissement lorsque la tension est relâchée. Le cut-off est ici à 500 bp : les tailles au-dessus sont concentrées lors de l'application de la tension et récupérées lors du relâchement de tension. Conditions expérimentales : injection continue de solution d'ADN ladder 100 bp à un débit de 340 μ L/min (vitesse de 4 mm/s), membrane 2-48 400 000, tension de 4 V (champ électrique de 180 V/cm).

L'ADN étant marqué en fluorescence au sein du capillaire, l'aire sous la courbe de signal en fluorescence (Figure 66 A) est directement proportionnelle à la concentration d'ADN. Le rendement d'un pic se calcule par l'expression suivante :

$$\text{rendement pic} = \frac{\text{Aire}_{\text{pic échantillon}}}{\text{Aire}_{\text{pic référence}}} \% \quad (84)$$

Afin de limiter les erreurs de mesures sur système BIABooster on peut utiliser la formule de rendement présentée en Annexe E. La représentation du rendement pour chaque taille d'ADN (Figure 66 B) permet de mettre en évidence un seuil de taille (cut-off) ici à 500 bp. En dessous de ce cut-off, les conditions hydroélectriques du système ne permettent pas l'arrêt de l'ADN. Les molécules passent la membrane que la tension soit appliquée ou non comme on peut le voir sur le graphique (rendement à 100%). En revanche, au-dessus de ce seuil l'ADN est concentré à la membrane lorsque la tension est appliquée, on appelle ce phénomène la rétention : on observe en rouge un signal avec une faible concentration d'ADN. Cette concentration résiduelle constitue la fuite d'ADN. En vert, lorsque la tension est relâchée, l'ADN n'est plus arrêté à la membrane, on récupère donc une fraction enrichie en ADN.

Pour présenter nos résultats de profils en taille dans la suite de ce manuscrit, nous utiliserons systématiquement la représentation du rendement comme en Figure 66 B.

5.3.3. Contrôle du cut-off

La Figure 67 A présente comment le cut-off en fonction du champ électrique, à vitesse hydrodynamique constante. On observe qu'un champ électrique faible (200 V/cm) viendra concentrer les tailles d'ADN au-dessus de 500 bp, en revanche un champ élevé de 2 kV/cm peut concentrer les tailles jusqu'à 200 bp. Les différents champs présentés sur cette figure sont obtenus avec des membranes différentes. Les pores sont toujours de 2 μ m mais l'épaisseur et la densité sont différentes : 48 μ m d'épaisseur et 4.10^5 cm⁻² de densité est une condition suffisante à l'application de champs modérés jusqu'à \sim 500 V/cm ; 123 μ m d'épaisseur et 10^5 cm⁻² de densité est bien plus adapté à l'application de champs élevés au-delà de 1 kV/cm car cette membrane réduit de manière importante les courants.

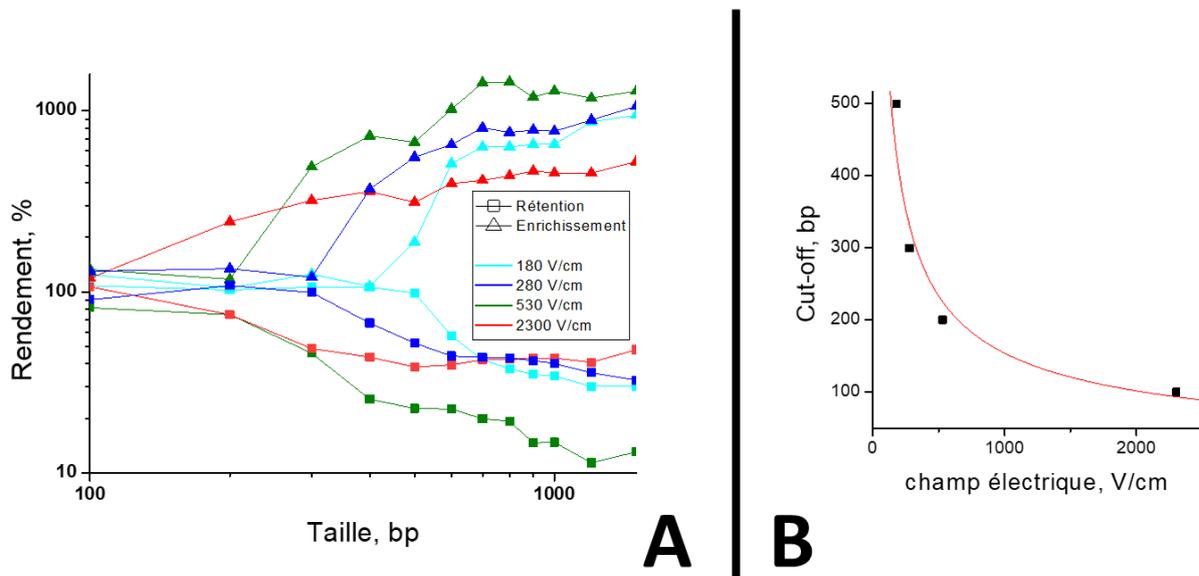


Figure 67 - Résultats de variation du cut-off en fonction du champ électrique appliqué. La tension appliquée est de 4V, 5V, 8V, 24V respectivement pour des champs électriques de 180 V/cm, 280 V/cm, 530 V/cm, 2300 V/cm. Une membrane 2-123 10^5 est utilisée pour le champ de 2300 V/cm alors qu'une membrane 2/48 4.10^5 est utilisée dans les autres cas. L'injection de solution d'ADN est réalisée en continu, la vitesse hydrodynamique est de 4 mm/s. (A) présente le détail des rendements pour chaque expérience. (B) résume la variation du cut-off en fonction du champ.

Comme le montre la Figure 67 B, la variation du cut-off n'est pas linéaire selon le champ électrique. Nous avons déjà évoqué cette non-linéarité dans la section 2.4.1 qui présente les résultats de prédiction du cut-off de séparation d'ADN de haut poids moléculaire sur BIABooster. Ici en revanche la courbe de tendance diffère du modèle de Nicolas Milon qui présentait une variation en $1/E^3$ du cut-off, alors que l'on retrouve ici une variation en $1/E^{3/5}$. Cette différence peut être due à la géométrie différente des systèmes, ou à la différence entre les tailles de fragments considérés. Une étude plus étoffée de variation du seuil sur notre système μ LAP appliqué à l'ADN de plus grande taille est nécessaire afin d'identifier la tendance sur une gamme plus large.

Cette non-linéarité du seuil implique qu'il est nécessaire d'appliquer des champs très élevés pour la concentration des plus petits fragments de l'échantillon. Cela constitue un défi important que nous détaillerons dans la section 5.6.

5.4. Réduction des pertes d'ADN

5.4.1. Caractérisation de la perte

Nous définissons la perte comme la quantité d'ADN qui n'est jamais collectée en sortie de dispositif. Elle est à différencier du phénomène de fuite déjà décrit. Comme présenté plus tôt (5.1.3), tout le volume d'ADN injecté est collecté en sortie et chaque fraction est pesée et analysée en concentration, de sorte à obtenir la quantité d'ADN traitée. Si l'on compare le profil de masse d'ADN cumulée au cours de l'expérience contrôle (injection d'une solution d'ADN sans application de tension), et le profil au cours de l'expérience de concentration avec l'application de tension, on peut observer une différence finale de masse (Figure 68). Cette différence est la perte d'ADN. Cette perte est détectée dès lors qu'une tension est appliquée au système.

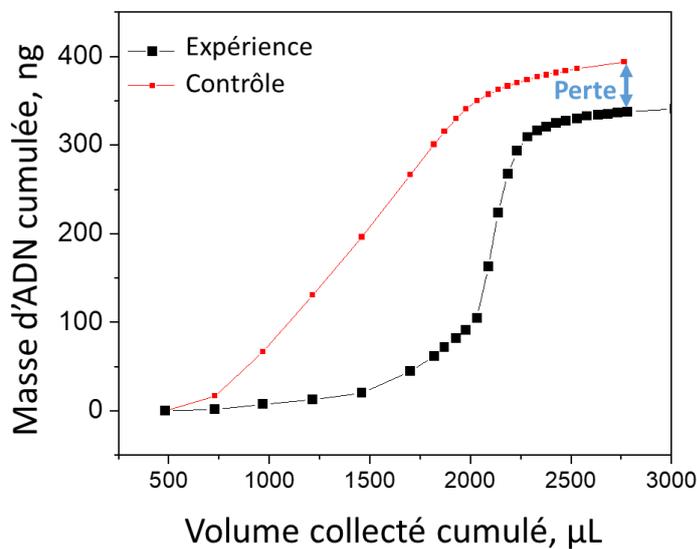


Figure 68 - Caractérisation de la perte dans une expérience de concentration d'ADN avec rinçage.

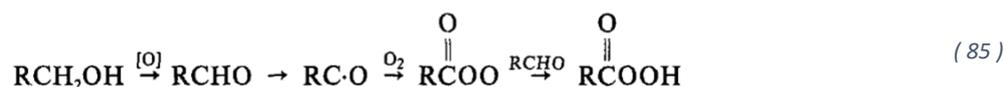
La perte peut également être caractérisée par des expériences qui seront présentées dans les sections suivantes (Figure 69, Figure 70). Le dispositif fluidique est mis sous écoulement sans membrane poreuse et subit des échelons de tension successifs. Comme la vitesse électrophorétique est théoriquement négligeable par rapport à la vitesse hydrodynamique dans ce régime ($v_h \sim 10^3 v_e$), la mesure d'une baisse de la concentration d'ADN en sortie indique directement une perte de l'ADN.

On peut s'interroger sur l'origine de la perte. En l'occurrence, nous avons des éléments de réponses sans certitudes. La présence de pertes dans des situations sans membrane nous indique qu'il ne s'agit pas d'une mauvaise libération de l'ADN lors de l'arrêt de la tension. Sur la caractérisation Figure 68, les mesures de concentration d'ADN sont effectuées au fluorimètre Qubit. Le fluorophore utilisé pour l'analyse de concentration d'ADN double brin au Qubit est probablement un intercalant qui s'appuie sur la structure en double brin pour un marquage spécifique d'ADN double brin par rapport à de l'ADN simple brin. La non-détection d'ADN sur une mesure Qubit semble écarter l'idée d'une cassure ou d'une fragmentation des molécules puisque les fragments seraient toujours détectés au Qubit. Nous reviendrons sur la caractérisation en taille de la perte. La perte semble résulter d'effets chimiques comme nous allons le montrer avec les paragraphes suivants et les recherches que nous avons menées en modifiant le tampon et la géométrie des électrodes.

5.4.2. Influence du tampon

Dans ce paragraphe, nous interrogeons comment le tampon utilisé pourrait engendrer des pertes, puis nous comparons les pertes entre différents tampons.

Ray et al. (1992 et 1995)^{177,178} indiquent que sous l'action d'un champ électrique dans une solution contenant du Tris, des espèces nucléolitiques (qui coupent les liaisons entre nucléotides) sont générées à l'anode. Ils incriminent un dérivé peracide du Tris, généré par oxydation du groupe hydroxyméthyle (85) à l'anode¹⁷⁸.



Ils montrent ainsi que l'utilisation de tampon HAE (HEPES, acétate, EDTA, soit le remplacement du Tris par de l'HEPES dans un tampon classique d'électrophorèse qui est le TAE) prévient la dégradation de l'ADN. De même, l'ajout d'agents réducteurs comme la thiourée ou le DTT permettent d'inhiber les cassures. Cependant on peut noter que le courant de 150 mA mis en jeu dans leur expérience est significativement plus important que notre cas (souvent <10 mA), en plus de fonctionner à système fermé ce qui n'est pas notre cas où le flux est continu. Liesegang et al. (2002)¹⁷⁹ montrent aussi des dégradations liées au Tris sur gel d'électrophorèse à champ pulsé et leur inhibition par thiourée ou le remplacement du Tris par l'HEPES.

Pour cette raison, nous avons testé l'ajout de DTT (10 mM) dont les résultats sont présentés Figure 69. Le dispositif sans membrane subit des échelons de tension (Figure 69 A) et la concentration d'ADN en sortie est suivie au Qubit au fur et à mesure de ces échelons (Figure 69 B). La chute vertigineuse de la concentration lorsque la tension passe à 4 V puis 6 V indique de manière nette une perte. Ce résultat est obtenu avec ou sans DTT de manière très similaire. On observe une influence très faible du DTT sur la perte finale (entouré Figure 69 C). En revanche, comme l'ajout de DTT se caractérise ici par une baisse de courant, on peut supposer que la perte (faiblement) inférieure dans l'expérience avec DTT n'est due qu'à un courant plus faible donc une réduction d'effets électrochimiques dans le dispositif. Nous n'observons donc pas d'inhibition des pertes par le DTT, ce qui tend à infirmer l'hypothèse sur les cassures par dérivés du Tris.

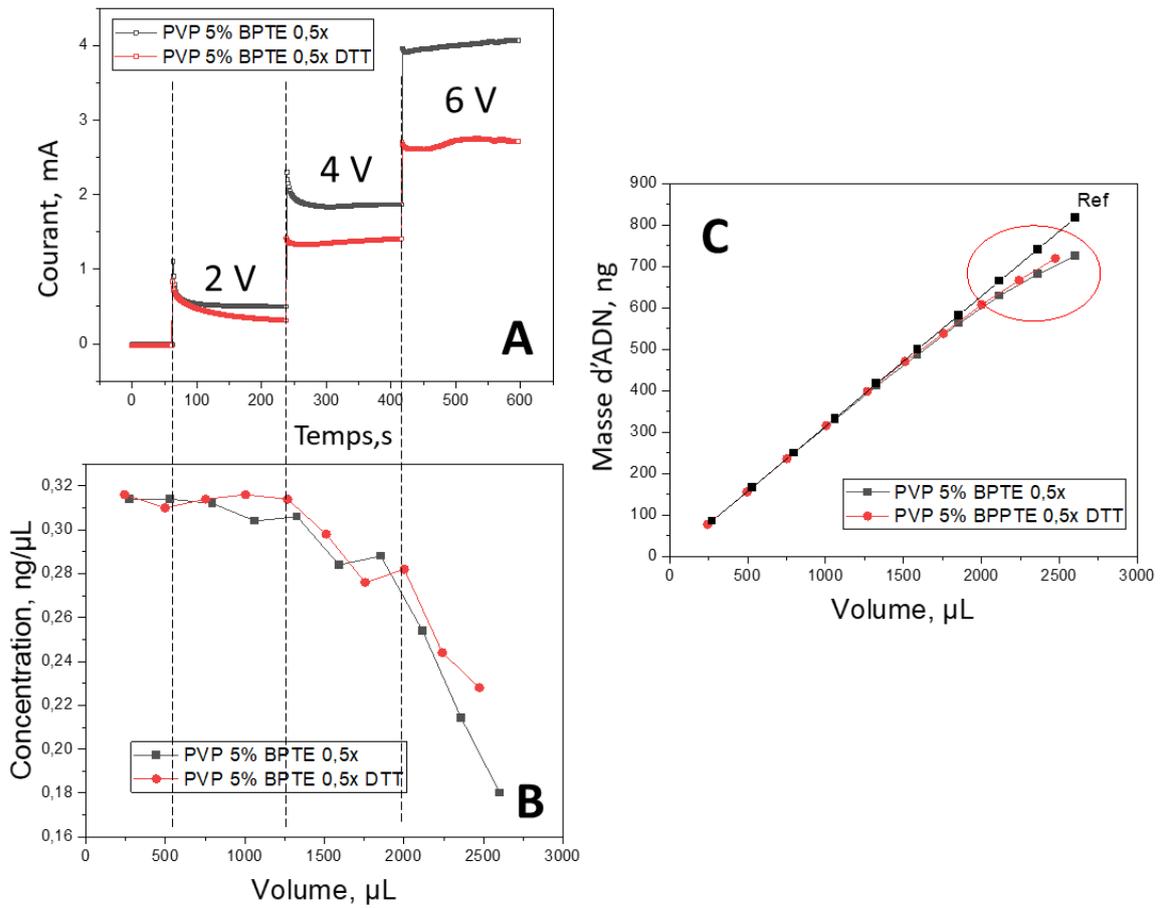


Figure 69 – Comparaison de l'évolution des pertes avec (rouge) et sans DTT (noir) pour des expériences à injection continue de solution d'ADN sans membrane poreuse dans le dispositif sous échelons de tensions (2 à 6 V). (A) Evolution du courant au cours du temps. (B) Evolution de la concentration d'ADN en sortie en fonction du volume cumulé injecté dans le système. (C) Evolution de la masse cumulée d'ADN collectée en sortie par rapport au volume cumulé injecté.

Pour poursuivre malgré tout la vérification de cette hypothèse, nous avons remplacé le Tris par l'HEPES. Sur la Figure 70, nous exposons les résultats comparatifs de pertes pour un tampon de BPTE et HAE à différentes concentrations (0,1x à 1x – voir 3.4 pour le détail des concentrations de chaque composant) et différentes tensions.

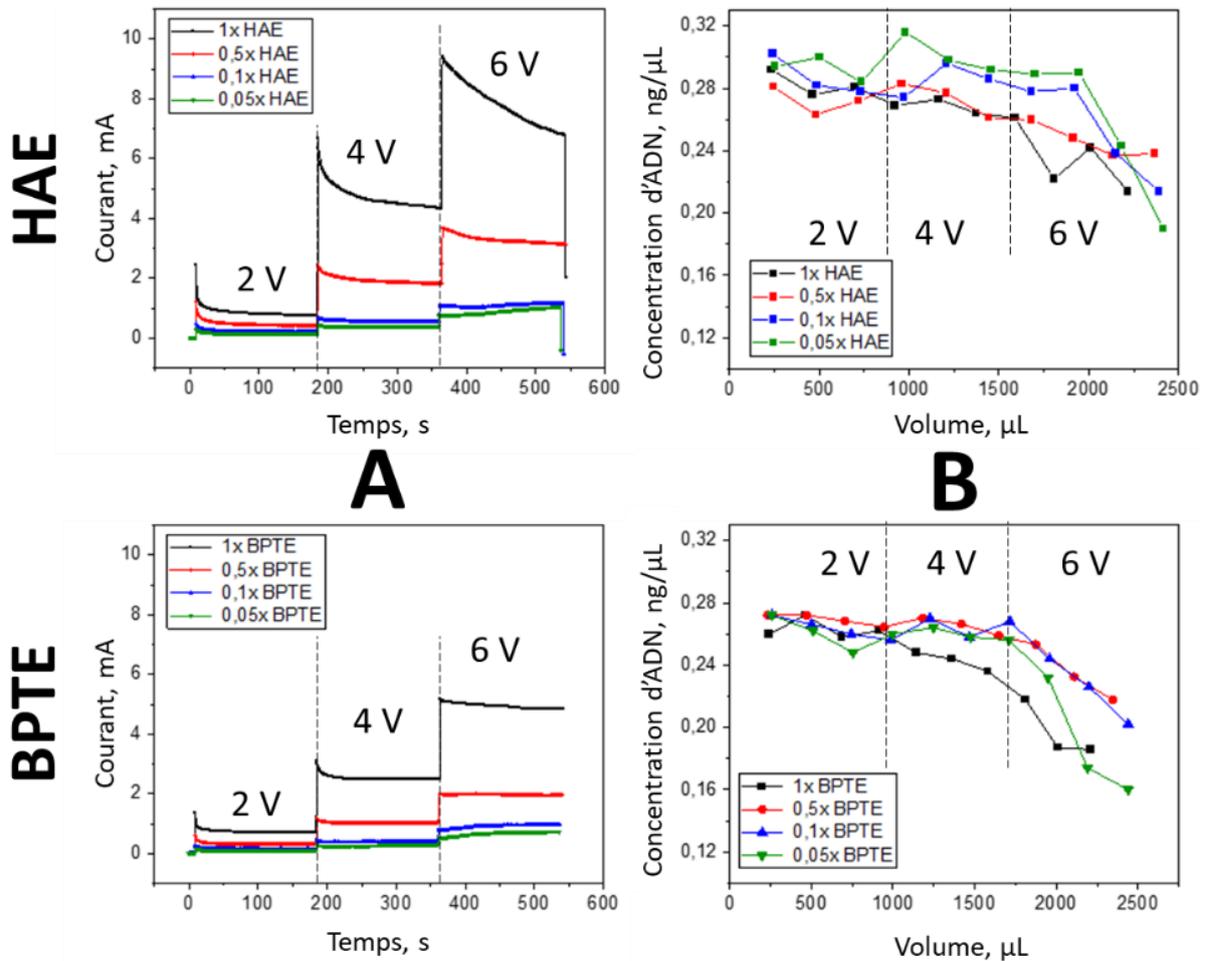


Figure 70 - Etude des pertes pour des solutions d'ADN 500 bp avec tampons HAE ou BPTE à différentes concentrations (0,05x ; 0,1x ; 0,5x ; 1x). Conditions expérimentales : absence de membrane dans le dispositif, application de tensions de 2 à 6 V par pas de 2 V pendant 3 min. (A) Suivi du courant au cours des échelons de tension. (B) Suivi de concentration des échantillons collectés en sortie.

On remarque en Figure 70 A (suivi de courants sous l'application des échelons de tension) que les courants ne sont pas toujours stables en fonction de la concentration en tampon : on observe des courants qui augmentent à 6V pour des concentrations faibles (0,05x ou 0,1x) pour le BPTE comme pour le HAE. On peut supposer que cette augmentation du courant est liée à des variations de pH au niveau des électrodes car l'effet tampon n'est pas suffisant à ces concentrations. A l'inverse un courant fortement descendant est observé sur la solution de HAE en concentration 1x pour une raison inconnue. En Figure 70 B, on remarque qu'à mesure que la tension et le courant augmentent, la concentration chute indiquant une augmentation des pertes. Ces résultats vont nous permettre d'identifier la solution la plus adaptée pour nos expériences en Figure 71.

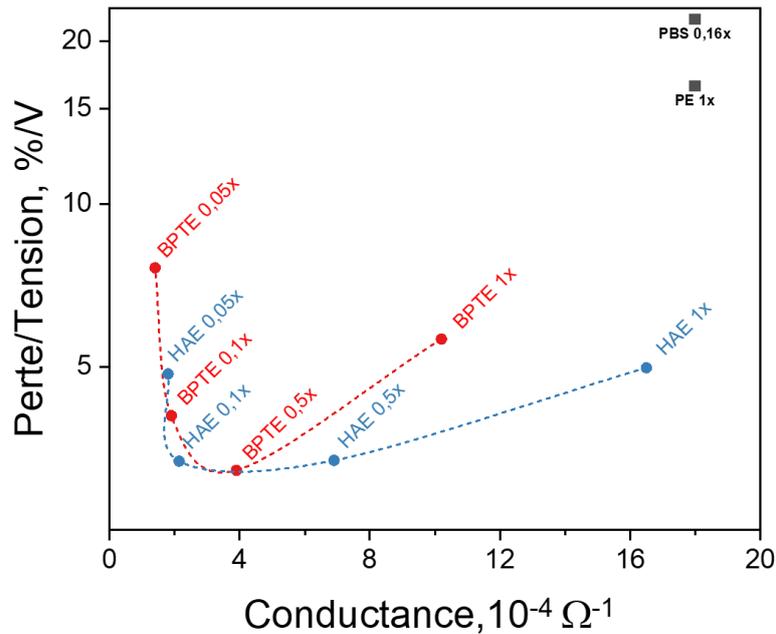


Figure 71 - Comparaison des différents tampons. L'ordonnée représente la tendance à la perte des différentes solutions et l'abscisse la résistance des solutions. En plus des solutions HAE et BPTe, le graphique inclut des mesures de pertes effectuées avec des solutions salées de PBS 0,16x et PE 1x (Phosphate EDTA).

La Figure 71 représente la tendance à la perte, normalisée par la tension appliquée, en fonction de la conductance de la solution. Les meilleurs candidats sont situés en bas à gauche : plus la solution est à une position basse sur l'axe des ordonnées, plus elle minimise ces pertes ; plus la solution est à gauche sur l'axe des abscisses, moins cette solution conduit, donc moins elle est susceptible d'augmenter le courant électrique ayant pour effet l'augmentation des effets électrochimiques et des variations de pH. On repère donc, pour le BPTe comme pour le HAE, qu'il existe un optimum de concentration en tampons qui permet de minimiser à la fois la perte et la conductance. Les concentrations trop faibles de tampons (0,05x) se caractérisent par des pertes importantes malgré une faible conductivité. Les pertes deviennent dans ce cas de figure très importantes dès que la tension passe à 6 V malgré le fait que le courant reste faible. Ce résultat semble tendre vers l'hypothèse d'une origine de la perte dans la variation de pH. A l'inverse, une concentration importante de tampon (1x) se caractérise par une grande conductivité des solutions, avec des pertes significatives probablement en raison d'un courant très élevé. L'optimum est évalué entre 0,1 et 0,5x, à la fois pour le BPTe et le HAE.

En définitive, le remplacement du Bis-Tris par de l'HEPES n'a pas engendré de diminution significative des pertes. On peut supposer que l'hypothèse de la dégradation de l'ADN par des agents nucléolitiques issus du Tris n'est pas responsable des pertes dans notre système. En revanche, l'étude des concentrations en tampons semble conforter l'hypothèse d'effets chimiques à l'électrode, et que le courant électrique est un catalyseur de perte.

5.4.3. Influence de la géométrie d'électrode

Comme la dégradation de l'ADN semble liée à des phénomènes physico-chimiques à l'anode, nous avons tenté de faire varier la géométrie des électrodes en élargissant la taille des mailles à 1 mm contre 500 μ m auparavant (Figure 72).



Figure 72 - Comparaison des électrodes à maille courte (500 μ m) et maille large (1 mm).

Nous avons ensuite comparé des expériences de concentration d'ADN 500 bp avec ces différentes mailles d'électrodes (Figure 73). Les courants sont identiques pour les deux électrodes lors des expériences. En revanche, la surface d'échange entre les électrodes et la solution diffère. La surface frontale (observable en Figure 72) est identique ; c'est en revanche la surface interne, au sein même des mailles de l'électrode, qui est multipliée par deux dans le cas de l'électrode de maille 500 μ m par rapport celle de maille 1 mm. En Figure 73 on observe tout d'abord qu'avec un même type d'électrode, l'application d'une tension plus élevée augmente la perte (de 10 à 60% de perte pour un passage de 10 à 25 V sur une maille 500 μ m). Par ailleurs, l'électrode de maille large présente une plus faible perte que l'électrode de maille courte pour les deux tensions testées (à 10 V, 0% contre 10% ; à 25 V 50% contre 60%) même si la perte reste significative à tension élevée. Lorsque l'électrode possède une maille plus courte, la probabilité de contact entre l'ADN et l'électrode est davantage favorisée. L'ADN peut ainsi être davantage exposé à des agents chimiques nucléolitiques produits à la surface de l'électrode, ou bien également être adsorbé suite à l'électrophorèse lorsqu'il se trouve à une position suffisamment proche de la surface pour que l'adsorption domine sur l'écoulement.

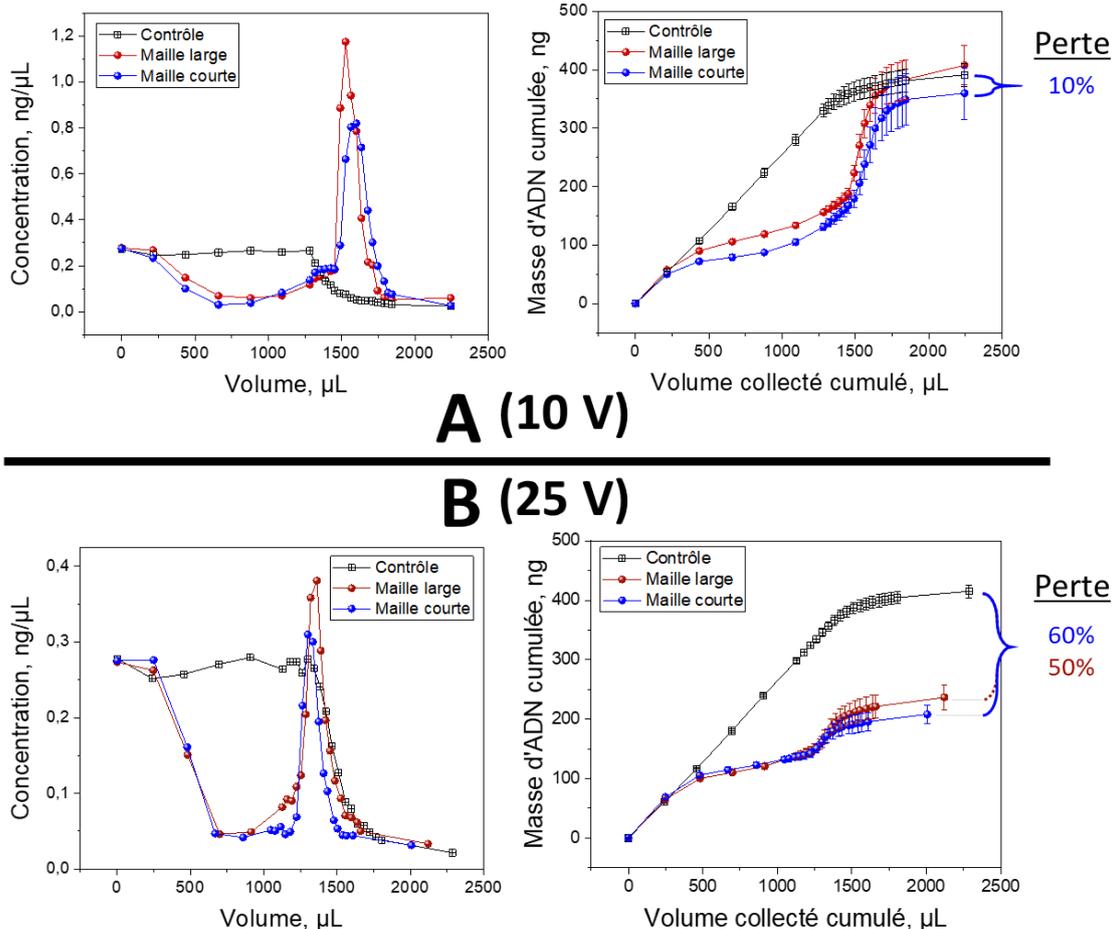


Figure 73 – Profils de concentration en fonction de la maille d'électrode (bleu : maille courte 500 μ m ; rouge : maille large 1 mm) et en fonction de la tension (A) 10 V (B) 25 V.

5.4.4. Contournement de l'anode

Puisque des réactions, qui ont lieu à l'anode, peuvent être responsable des pertes d'ADN, nous avons testé différentes méthodes de contournement de l'anode.

La Figure 74 présente l'une de ces méthodes. Une pièce additive imprimée en 3D est intégrée au système, au plus proche de l'anode. Elle se présente sous la forme d'un disque contenant des piliers venant s'insérer à l'intérieur des mailles de l'électrode, de sorte que les piliers dépassent légèrement de l'électrode (Figure 74 C). Chacun de ces piliers comporte un canal fluïdique (500 μ m de diamètre) qui traverse la pièce de part en part. Ainsi, lors de l'injection de la solution dans le dispositif, les piliers avec canaux fluidiques permettent à l'ADN d'éviter d'être en proche contact avec l'électrode. Au-delà de cette grille à piliers, aucun obstacle n'écrante le champ électrique de l'anode.

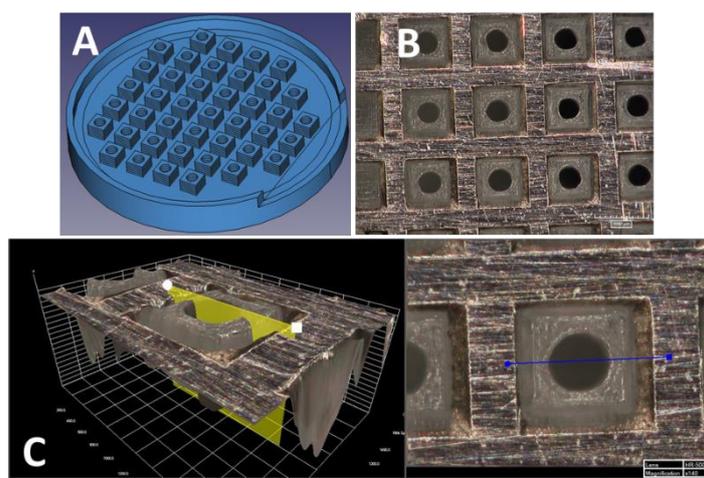


Figure 74 - Contournement d'électrode par grille à piliers. Les piliers sont placés à l'intérieur de la maille et contiennent chacun un canal fluïdique de sorte que l'écoulement ne passe pas sur les surfaces internes de l'électrode (A) Design 3D (FreeCAD) de la pièce additionnelle sur laquelle l'électrode est posée. (B) Image au microscope numérique Hirox RX-100 d'une électrode posée sur le support imprimé et percé. (C) Image au microscope numérique d'une maille avec son pilier et canal d'injection, reconstruction 3D de la prise de vue à droite.

Malheureusement, l'utilisation d'un tel système a donné des résultats désastreux avec des pertes très importantes ou l'absence de signal ADN en fluorescence. On peut supposer que l'utilisation de cette pièce additive, par absence de flux hydrodynamique aux abords de l'anode, tend à favoriser la concentration d'éventuelles espèces nucléolitiques produites à l'électrode. A la sortie des piliers, l'ADN pourrait être affecté de manière plus importante du fait de l'absence de convection.

5.4.5. Caractérisation en taille de la perte d'ADN

Afin de mieux comprendre l'origine des pertes, nous avons analysé sur le système BIABooster des échantillons soumis à des pertes importantes. Ces échantillons correspondent aux manipulations effectuées Figure 70 : des solutions d'ADN avec espèce unique de 500 bp, à différentes concentrations de tampons (de 0,05X à 1X de BPTe et HAE) sont soumises à des tensions de 6 V dans le système μ LAP sans membrane. L'intégrité de ces pics est étudiée Figure 75. En Figure 75 A est représenté le signal en fluorescence du BIABooster pour un échantillon de HAE 0,05x espèce unique de 500 bp avant (bleu) et après le passage (rouge) dans le dispositif sous tension. En B et C sont représentées les évolutions de signal en fonction de la concentration en tampon. La tendance pour les deux solutions est la même : plus la concentration en tampon est basse, plus le signal du pic à 500 bp présente une intensité faible (en accord avec la perte évaluée précédemment au Qubit). En revanche, l'intégrité du pic lui-même n'est pas affectée : il ne s'étale pas vers les petits fragments comme cela pourrait se produire suite à

une dégradation¹⁷⁷. De manière étonnante, les échantillons présentent une bande additive entre 100 et 200 bp, discernable Figure 75 A. Cette bande est elle aussi très bien définie et sa concentration devient importante lorsque le tampon est en faible concentration (courbes rouges Figure 75 B).

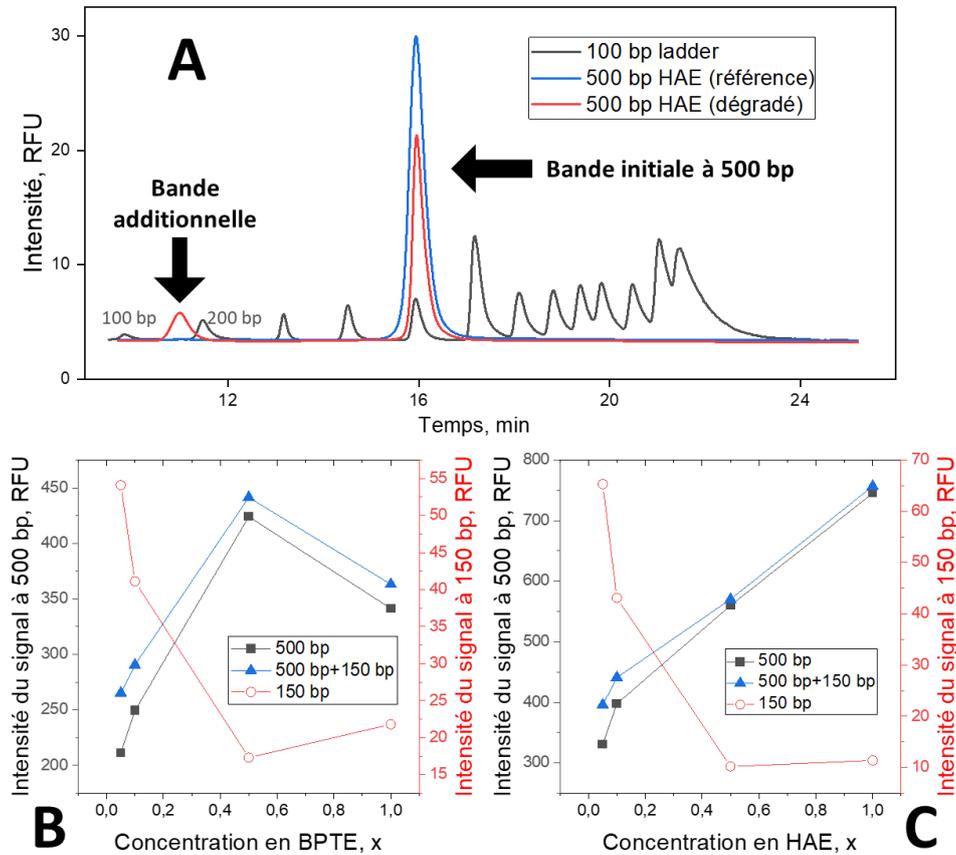


Figure 75 – Etude de l'intégrité d'une bande unique d'ADN (500 bp) sous l'action d'un champ électrique dans le système μ LAP en fonction de la nature et de la quantité de tampon (A) Profil BIABooster de la bande unique à 500 bp avec HAE 0,05x avant son passage dans le dispositif (bleu) et après son passage dans le dispositif (rouge). En gris, le profil du ladder utilisé comme marqueur de taille. (B) et (C) représentent les valeurs comparatives d'intensité de signal de la bande originelle (500 bp) et la bande additionnelle (150 bp) en fonction de la concentration en tampon respectivement pour le BPTe (B) et le HAE (C)

Même si on observe une baisse de concentration du fragment de 500 bp et une augmentation de la concentration de la bande additionnelle, la somme des signaux des bandes à 500 bp et 150 bp n'est pas constante pour les différentes concentrations de tampon, en bleu Figure 75 B et C. En définitive, une majorité de la bande à 500 bp est « détruite » (en tout cas non détectée) et possiblement une faible proportion forme cette bande additionnelle dont nous ne connaissons pas l'origine précise.

On peut supposer qu'il s'agit d'effets liés au pH, comme la dépurination d'ADN expliquée dans l'article de An et al. (2014)¹⁸⁰. Lors de la dépurination, la liaison entre une base azotée purine (adénine ou guanine) et le squelette désoxyribose-phosphate de l'ADN est rompue. An et al. indiquent que ce processus est dû à une protonation (attaque par un ion H^+) de la purine. Ils montrent que plus une solution est acide, donc plus elle contient d'ions H^+ , plus le taux de dépurination est élevé. On peut donc supposer que la présence de courants élevés dans notre système, responsables de la production d'ions H^+ par électrolyse de l'eau à l'anode, peut engendrer une dépurination de l'ADN aux abords de l'anode. Suite à une dépurination, l'ADN expose un site abasique (site AP, emplacement où la base est absente) très sensible aux cassures^{181,182}, mais les mesures en fluorescence ne révèlent pas de dégradation progressive de l'ADN. On peut par exemple supposer que la dépurination empêche la

fixation du marqueur intercalant sur l'ADN. Une étude plus approfondie des pertes est nécessaire afin de comprendre les mécanismes en jeu dans notre système. Comme pour An et al. (2014)¹⁸⁰, une analyse de la dépurination par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) est une piste intéressante.

5.4.6. Conclusion sur les pertes d'ADN

En définitive, nous n'expliquons pas de manière totale le phénomène de perte d'ADN. En revanche, nous avons déterminé que l'intensité du courant électrique dans le système catalyse les pertes. La concentration en tampon dans l'échantillon joue un rôle important : si la concentration en tampon est trop importante, les courants seront élevés et les pertes seront grandes, mais à l'inverse une perte importante est également observée pour des concentrations faibles de tampon. Par ailleurs, une plus grande surface d'électrode tend à augmenter ces effets de perte.

Nos expériences de modification du tampon ne nous permettent pas d'incriminer le Tris comme responsable de cette perte. En revanche, il semble que la perte d'ADN soit liée à une acidification à l'anode. En effet, cette acidification est d'autant plus forte que le courant électrique circulant dans le système est important, et elle est également plus forte lorsque le pouvoir tampon de la solution est trop faible. Le mécanisme de détérioration de l'ADN par cette acidification est encore mal compris, mais il pourrait provenir d'un effet de dépurination. Comme nos méthodes d'analyse ADN s'appuient sur un marquage fluorescent qui pourrait être affecté par ce processus, nous pourrions nous tourner vers d'autres méthodes d'analyses afin d'approfondir l'étude.

Dans la mesure du possible, nous tâcherons de limiter les pertes dans le système. Pour cela, l'utilisation d'un tampon en concentration optimisée (Figure 71) et le fonctionnement avec refroidissement sont des procédés faciles à mettre en place. Nous avons cependant des propositions pour tenter de les limiter à plus long terme. Une première possibilité est l'éloignement de l'anode de la membrane comme nous en discuterons également plus tard (5.6.2). L'idée est d'éviter le passage de l'ADN à travers l'anode sous tension. Le deuxième point est la réduction de surface des grilles d'électrodes, afin d'accentuer la tendance observée plus tôt sur des grilles à maille large. Le troisième levier est à nouveau sur le tampon en essayant d'en changer la composition. Un exemple de piste intéressante se trouve dans l'article de Morani et al. (2019)¹⁸³ où les auteurs utilisent un tampon d'électrophorèse capillaire comportant du Tris et du CHES (2-(Cyclohexylamino)ethanesulfonic acid) afin de diminuer la conductivité tout en conservant un pouvoir tampon important.

5.5. Concentration d'ADN de haut poids moléculaire

5.5.1. Généralités et objectifs sur la concentration d'ADN de haut poids moléculaire

Dans le but d'élargir le potentiel applicatif de notre technologie, nous avons travaillé sur de l'ADN de haut poids moléculaire (≥ 50 kb). Comme expliqué dans le Chapitre 1, les plus grandes tailles d'ADN sont sélectionnées en particulier pour le séquençage de 3^{ème} génération (nanopore). Cette visée applicative nécessite l'isolement de ces plus grands fragments ainsi que leur concentration (400 ng à 1 μ g dans 50 μ L) afin de maximiser la lecture de la séquence.

Notre travail s'est donc focalisé sur la concentration d'ADN λ (48 kb) puis s'est étendu à l'ADN T4 (172 kb). Nous présenterons aussi comment la tension est susceptible d'affecter le comportement de l'ADN dans notre système, en particulier en déclenchant une agrégation des molécules.

5.5.2. Concentration d'ADN lambda (48 kb)

Les résultats présentés plus tôt sur la concentration d'ADN Figure 58 exposent les performances de concentration d'ADN λ avec une expérience en injection continue (sans rinçage) et avec rinçage. Il est important de noter que la membrane utilisée pour concentrer l'ADN λ présente des pores de 5 μ m : une membrane avec pores de 2 μ m à tendance à se boucher avec de l'ADN de grande taille. Le colmatage s'observe généralement par une diminution du débit à pression constante. Les résultats montrent une fuite qui reste importante ($\sim 45\%$), ce qui se traduit par de faibles facteurs d'enrichissement (2x). L'injection est réalisée ici à concentration de 380 pg/ μ L. En termes de quantités d'ADN traitées, celles-ci diffèrent entre l'expérience avec rinçage (400 ng au total) et celle en injection continue (800 ng). En revanche, la quantité d'ADN qui est récupérée à l'enrichissement (0 V) dans 5 fractions de collectes (~ 150 μ L) est cohérente entre les deux expériences : 220 ng avec rinçage et 440 ng en continu. Les objectifs mentionnés plus haut de 400 ng dans 50 μ L sont donc qualitativement atteints.

La Figure 76 décrit la concentration d'ADN λ sous différentes tensions. On note des concentrations très similaires à 4,4 V (270 V/cm) et 6,4 V (440 V/cm). En revanche, le profil de concentration à 8 V (570 V/cm) est intéressant car il est caractéristique d'un phénomène d'agrégation d'ADN. En effet, le profil à 8 V montre une récupération d'ADN disparate : au lieu de présenter un pic à haute concentration, le profil présente deux pics diffus. Ajouté à cela on observe une perte plus importante (Figure 76 B), et on peut supposer qu'une partie de l'ADN n'a pas été relâché à 0 V. Une observation sur puce xurographique permet de visualiser le phénomène d'agrégation d'ADN à fort champ électrique mais pas à champ plus faible (Figure 77).

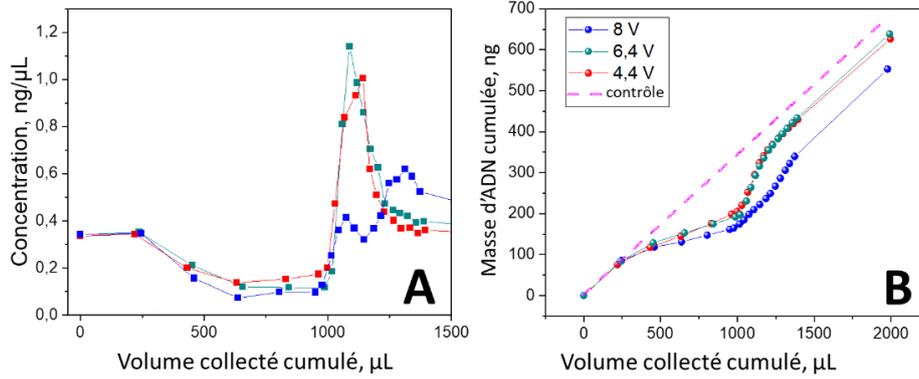


Figure 76 - Concentration d'ADN λ avec différentes tensions : 4,4 V ; 6,4 V ; 8V. (A) Concentration en fonction du volume cumulé. (B) Masse collectée en fonction du volume cumulé. Conditions expérimentales : membrane 5-46 10^5 ; PVP 5% BPTE 0,5x ; débit de concentration (tension appliquée) de 250 μ L/min ; débit de libération (tension relâchée) de 602 μ L/min.

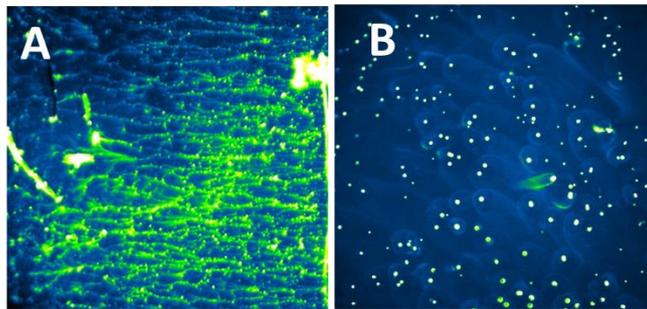


Figure 77 - Phénomène d'agrégation d'ADN λ . Images au microscope inversé de puces xurographiques. L'ADN est marqué au Yo-Pro1 et concentré sur différentes membranes (A) membrane 5-46 10^5 avec champ électrique \sim 500 V/cm. (B) membrane 5-21 10 000 avec champ électrique de 3,3 kV. L'ADN semble ici s'agréger à fort champ.

5.5.3. Concentration d'ADN T4 (172 kb)

Après avoir prouvé la concentration sur ADN λ , nous avons essayé d'étendre les performances sur des tailles plus grandes avec l'ADN T4 (172 kb). La Figure 78 expose les résultats de concentration de T4. Les conditions sont sensiblement proches de celles appliquées sur ADN λ . On observe une fuite tout aussi significative (jusqu'à 50%) et un enrichissement plutôt faible : par rapport à l'expérience sur lambda le pic d'ADN à 0 V est plus large. Les pertes observées sont autour de 15%, comme cela était aussi observé lors de l'agrégation d'ADN λ , on peut donc aussi supposer que ce phénomène a lieu même à faible tension sur T4.

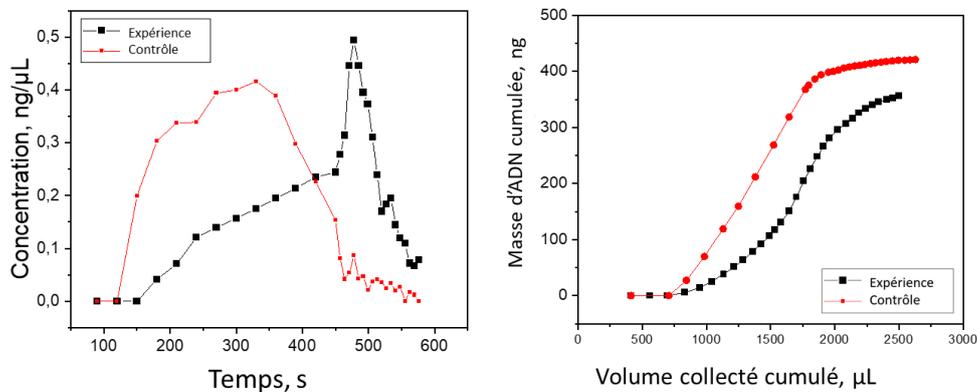


Figure 78 - Concentration d'ADN T4 avec rinçage de solution. Conditions expérimentales : membrane 5-46 10^5 ; PVP 5% BPTE 0,5x ; 4,4 V ; débit de concentration (tension appliquée) de 270 μ L/min ; débit de libération (tension relâchée) de 680 μ L/min.

5.5.4. Analyse qualité des échantillons d'ADN lambda et T4

Comme les fragments d'ADN λ et T4 sont de tailles importantes, on peut interroger l'intégrité des fragments alors qu'ils sont soumis à un cisaillement hydrodynamique et à un champ électrique. En effet, plusieurs auteurs présentent des phénomènes de fragmentation d'ADN sous cisaillement^{184,185}, cisaillement que l'on retrouve aussi dans le pipetage comme le montrent les simulations réalisées par l'entreprise Beckman qui commercialise des pointes de pipettes plus larges (wide bore) pour limiter le cisaillement¹⁸⁶.

Pour vérifier la qualité des échantillons, nous les avons analysés par méthode BIABooster à Adélis (Figure 79). La méthode très haut poids moléculaire utilisée pour cette étude n'est pas encore commercialisée par Adélis. L'information importante de la Figure 79 est le profil en taille et non l'intensité du signal dont l'interprétation n'est pas fiable, d'une part car les échantillons présentaient des concentrations variables et d'autre part car ils ont été dilués pour l'analyse, ce qui peut impliquer des erreurs de dilution. Contrairement aux indications des articles, il a été observé à Adélis que le pipetage avec pointes larges ou standards était sans conséquence sur l'intégrité de fragments d'une solution mère.

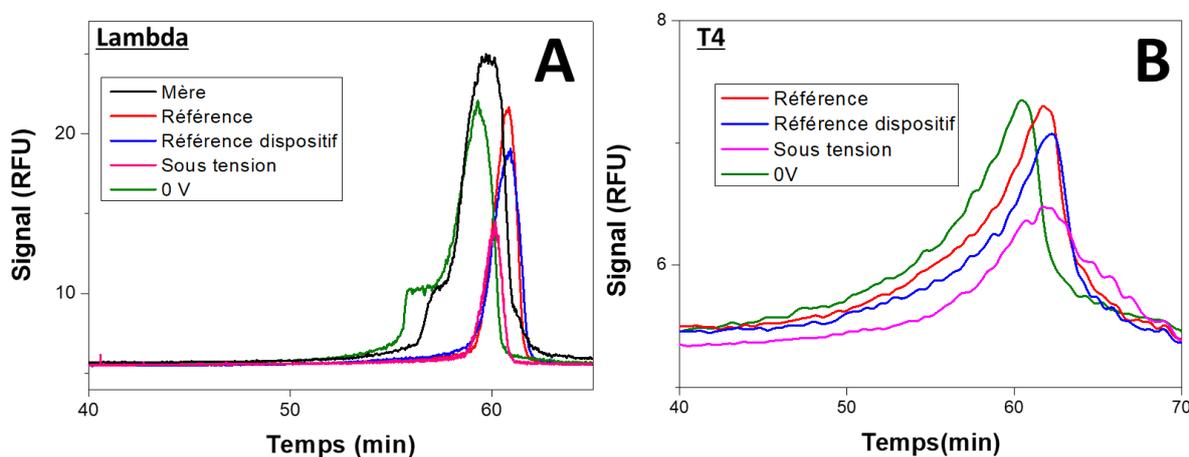


Figure 79 – Analyses de profils en taille par BIABooster d'échantillons d'ADN λ et T4 à différentes étapes de l'expérience. Courbes traitées avec transformées de Fourier (A) ADN λ (B) ADN T4. « Mère » correspond à l'échantillon mère de solution lambda, « Référence » à une dilution de la solution mère dans une solution de PVP, « Référence dispositif » la référence à travers le dispositif par unique actionnement hydrodynamique, « sous tension » lorsqu'une tension d'environ 4 V est appliquée pendant 2 min, « 0 V » collecte après application de la tension précédente et relâchement.

Comme on peut le voir sur la Figure 79 A (noir), l'échantillon mère de lambda (Thermo Fisher) pipeté avec pointe large présente un pic assez large mais relativement symétrique malgré une faible marche vers les plus bas poids moléculaires. La « référence » (rouge) qui est cette même solution mère pipetée avec une pointe standard et diluée dans une solution de PVP présente un pic très proche cette fois bien plus symétrique. Comme il paraît peu vraisemblable que la pureté de l'échantillon soit supérieure après dilution, on peut supposer que la « marche » d'asymétrie du pic de la solution mère est dû à un artefact d'analyse engendré par la concentration plus importante d'ADN dans l'échantillon. Le même phénomène est en effet observé sur l'échantillon collecté après application de tension et relâchement (0 V en vert) pour lequel la concentration est plus élevée.

De manière générale, que ce soit pour l'expérience avec ADN λ (Figure 79 A) ou ADN T4 (Figure 79 B), les profils de tailles sont suffisamment proches entre les échantillons pour conclure que le passage de la solution à travers notre dispositif fluide et l'application de tensions faibles (4 V) n'altèrent pas l'intégrité des molécules d'ADN au moins jusqu'à ~ 170 kb.

5.5.5. Conclusion sur la concentration d'ADN de haut poids moléculaire

Pour conclure, nous avons montré qu'il est possible de concentrer de l'ADN λ et de l'ADN T4 avec notre dispositif μ LAP. Les paramètres à appliquer pour de telles concentrations diffèrent des paramètres pour les bas poids moléculaires : une membrane avec des pores plus larges (5 μ m) est nécessaire, les champs électriques appliqués doivent rester faibles (< 500 V/cm) pour éviter l'agrégation. Les molécules n'ont pas montré de fragmentation détectable sous ce régime d'après les analyses au BIABooster. L'objectif initial de parvenir à collecter près de 400 ng dans 50 μ L en sortie est pratiquement atteint mais il semble prématuré d'évaluer les performances sur ce volet : les collectes dépendent de la concentration initiale de l'échantillon injecté et du mode d'injection (continu ou avec rinçage). Si l'échantillon à concentrer est présent dans un grand volume, un mode d'injection en continu est à favoriser. Par ailleurs, et nous en discuterons dans les perspectives finales du manuscrit, une simple augmentation d'échelle du dispositif permettrait de gagner considérablement en quantité traitée.

5.6. Les défis de la concentration d'ADN de bas poids moléculaire

5.6.1. Comparaison des performances à différentes tailles

Alors que nous avons vu à la section 0 comment il nous est possible de varier le cut-off, nous allons ici aborder la concentration d'ADN de bas poids moléculaire (< 200 bp), nécessaire pour l'application à la concentration d'ADN circulant. Pour parvenir à concentrer ces fragments, un champ électrique très élevé doit être appliqué au système. Pour diminuer le courant électrique, le dispositif est refroidi et un tampon de BPTe 0,5x est utilisé. La Figure 80 expose ainsi différents profils de concentration obtenus avec différentes tailles d'ADN de 100 à 500 bp. Nous avons appliqué des champs de 770 V/cm pour le 500 bp, 1,9 kV/cm pour le 200 bp et 2,4 kV/cm pour le 100 bp. Même en tentant d'optimiser les conditions de concentration en fonction de la taille, les performances de concentration sont toujours amoindries lorsque les fragments sont de plus faible poids moléculaire : augmentation des fuites et faibles enrichissements. Les pertes d'ADN s'élèvent jusqu'à 30% en raison des courants importants à champs élevés.

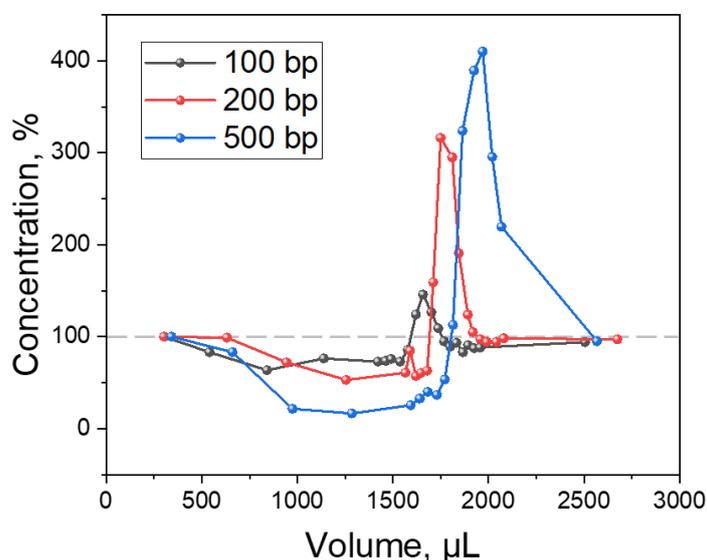


Figure 80 - Comparaison de concentrations de bandes uniques : 100, 200 et 500 bp.

5.6.2. Influence du temps d'expérience sur la concentration

La Figure 81 présente deux résultats de concentration de fragments de petite taille (< 500 bp) pour des temps de concentration de 2 ou 4 min. Leur comparaison est intéressante car elle révèle des différences significatives pour la concentration de la bande de 100 bp alors même que la tension appliquée est la même dans les deux cas (40 V). Sur cette figure on remarque tout d'abord que quel que soit le temps de concentration, les rendements obtenus pour toutes les bandes lors de la rétention (40 V) sont inférieurs à 100 %. On pourrait en déduire que ces fragments sont concentrés à la membrane, mais comme le révèle le signal pour la concentration de 4 min, l'espèce de 100 bp est récupérée à l'enrichissement avec une concentration toujours inférieure à 100%. La molécule de 100 bp subit donc une perte importante dans le cas d'une concentration de 4 min. A l'inverse, pour une concentration de 2 min, le fragment de 100 bp est récupéré en concentration légèrement supérieure à 100 %. Globalement les enrichissements sont très faibles et on suppose des pertes importantes d'ADN pour toutes les tailles.

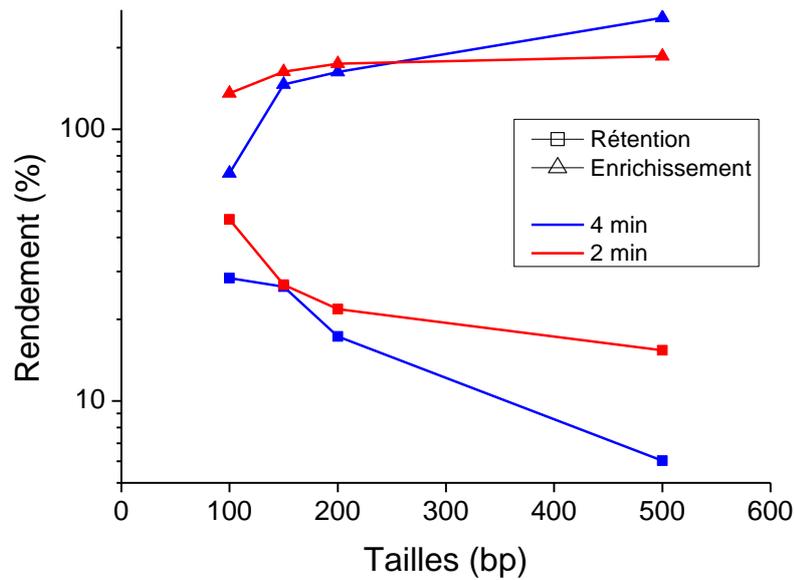


Figure 81 - Comparaison des profils en taille et concentration de ladders de petites tailles (100 ; 150 ; 200 ; 500 bp) avec un temps de concentration de 2 ou 4 min. Mesures effectuées sur BIABooster. Conditions expérimentales : injection continue de solution ADN ; membrane 2-123 10^5 ; PVP 5% BPTe 0,5x ; 40 V ; débit de 200 μ L/min.

Comme évoqué dans la section des pertes, on suppose une forte dégradation de l'ADN lors de son passage à l'anode. Sur le dispositif utilisé dans cette expérience, le volume entre l'anode et la sortie est d'environ 500 μ L. A un débit de 200 μ L/min, après 2 min, on collecte donc grossièrement un volume de solution qui n'a pas traversé l'anode lorsqu'elle était sous tension. Ce n'est pas le cas pour l'expérience de 4 min pour laquelle on récupère à la fin une solution qui a traversé l'électrode sous tension. Cela pourrait expliquer la faible concentration de 100 bp récupérée à 0 V dans ce cas.

En définitive, pour parvenir à concentrer l'ADN de bas poids moléculaire (autour de 100 bp), il faut réussir à appliquer des champs élevés, tout en diminuant le courant afin d'atténuer les pertes. Pour le moment les pertes sont trop importantes sur cette plage de fonctionnement. Nous devons approfondir l'origine des pertes et identifier des solutions pour les atténuer.

Etant donné la meilleure efficacité du système à temps court, lorsque la solution d'ADN ne traverse pas l'anode sous tension, on peut imaginer qu'un procédé de fonctionnement à volume fini est plus favorable. Le principe consiste à ne jamais laisser l'ADN traverser l'anode. On peut injecter l'ADN afin qu'il remplisse la zone anode-membrane avant la mise sous tension. Comme ce volume n'est que de 500 μ L sur le système actuel, il peut être intéressant de l'élargir afin d'augmenter le volume de traitement. Cela peut être fait en éloignant l'anode de la membrane et/ou en augmentant la section de fonctionnement de la membrane.

5.7. Conclusion du chapitre 5

A travers ce chapitre nous avons identifié les performances et la plage de fonctionnement de notre système. L'ADN peut être concentré de manière efficace sur une gamme de tailles allant de 200 bp à plus de 150 kb. Nous avons également montré une adaptabilité de la séparation en taille sur une gamme allant de 200 à près de 700 bp. Nous devons poursuivre cette adaptabilité vers des plus grandes tailles d'ADN. Le facteur d'enrichissement reste assez variable en fonction des tailles, mais nous avons pu atteindre des facteurs jusqu'à 10X avec des tailles autour de 1 kb en 4 min de concentration. Un travail plus approfondi doit être effectué afin d'évaluer les meilleurs facteurs d'enrichissement et identifier la limite de saturation en masse d'ADN de notre système. Pour le moment nous avons pu concentrer jusqu'à près de 450 ng d'ADN λ , sans pour autant identifier une saturation du système, ce qui nous permet d'envisager une marge de progression importante.

La Figure 82 résume les principaux composants d'optimisation de la concentration du système μ LAP : les réductions des fuites et des pertes, ainsi que la finesse de la concentration. De manière paradoxale, la réduction des fuites et la réduction des pertes tendent à s'opposer : l'augmentation de la tension appliquée réduit les fuites, mais peut engendrer davantage de pertes, dont l'origine est encore peu comprise. C'est pour cette raison que la concentration de l'ADN de plus bas poids moléculaire rencontre des difficultés importantes. Pour les tailles allant de 200 bp à 50 kb, notre système fonctionne avec des pertes réduites (< 10%), et nous verrons dans le chapitre suivant comment nous pouvons appliquer ces performances au traitement d'échantillons de séquençage.

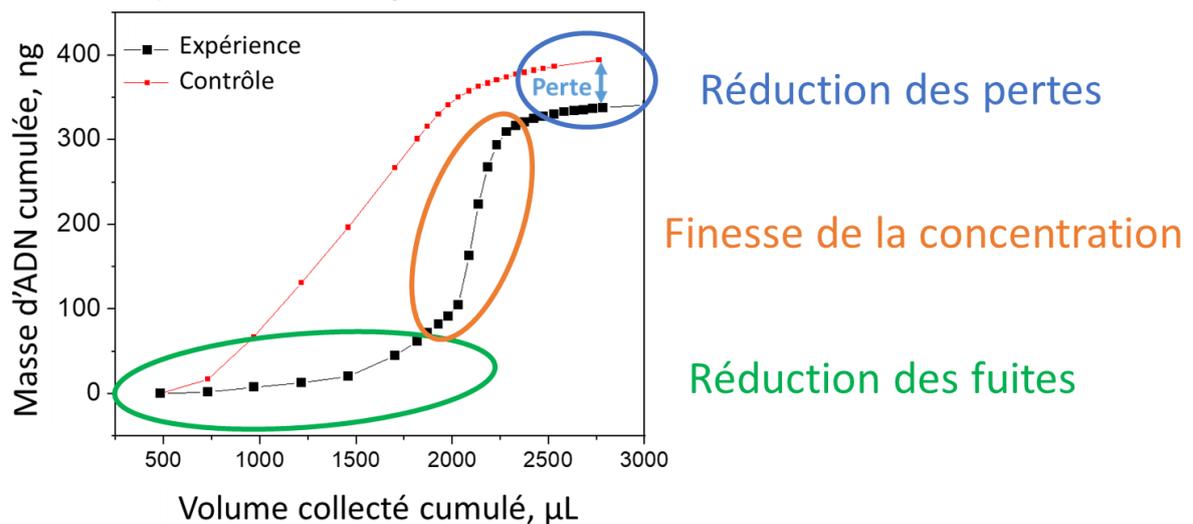


Figure 82 - Synthèse des pistes d'amélioration des performances des expériences de concentration.

Chapitre 6

Applications du système

μ LAP

Etude du système sur solutions réelles pour des visées applicatives

Dans le but de se diriger vers des applications de la technologie, en particulier sur le volet de l'ADN circulant, il est important de tester l'efficacité du dispositif sous la contrainte d'une concentration élevée en sels et en présence de protéines. La concentration en sels du plasma sanguin est d'environ 140 mM, soit l'équivalent de la concentration d'un tampon PBS dit en concentration 1x. Dans un premier temps nous montrons comment la fonction de concentration peut être effective malgré la forte concentration en sels, et comment il est possible de rincer les sels de l'échantillon tout en gardant l'ADN concentré, réalisant une fonction de purification. Ensuite nous abordons les difficultés rencontrées sur des expériences préliminaires en présence de protéines.

Dans une deuxième partie, nous appliquons notre système pour la purification d'un échantillon de séquençage NGS, et nous comparons nos performances avec celles obtenues avec un kit de purification par billes magnétiques.

6.1. Vers une application sur échantillons complexes

6.1.1. Performances sur solutions salées

6.1.1.1 Concentration et fractionnement en taille sur solution salée

La Figure 83 présente les profils de concentration en fonction de la taille et les courants associés lors de l'injection continue de solutions salées de PBS. On teste différentes concentrations : 0,1x ; 0,2x et 0,5x de PBS soit de 14 à 70 mM de NaCl (la moitié de la salinité d'un plasma sanguin). Ici la tension appliquée est modérée, 10 ou 13 V ce qui correspond à un champ électrique de 630 V/cm ou 770 V/cm. Le cut-off est environ à 200/300 bp (on peut expliquer la variabilité de cut-off entre l'expérience 0,1x et 0,2x par la différence d'échauffement pouvant faire varier la viscosité, et l'expérience à 0,5x est réalisée à tension plus basse d'où le cut-off plus élevé). Ce mode opératoire n'est pas suffisant à la concentration des plus petites tailles qui sont 200 et 100 bp. La valeur d'enrichissement pour les tailles au-dessus du cut-off sont légèrement inférieures pour le 0,5x que pour le 0,1 et 0,2x, mais les performances sont assurées quelle que soit la concentration en sels, malgré des courants très élevés comme on peut le voir à 18 mA sur PBS 0,5x. On peut noter que les courants restent stables : le refroidissement du dispositif est indispensable pour stabiliser ce courant.

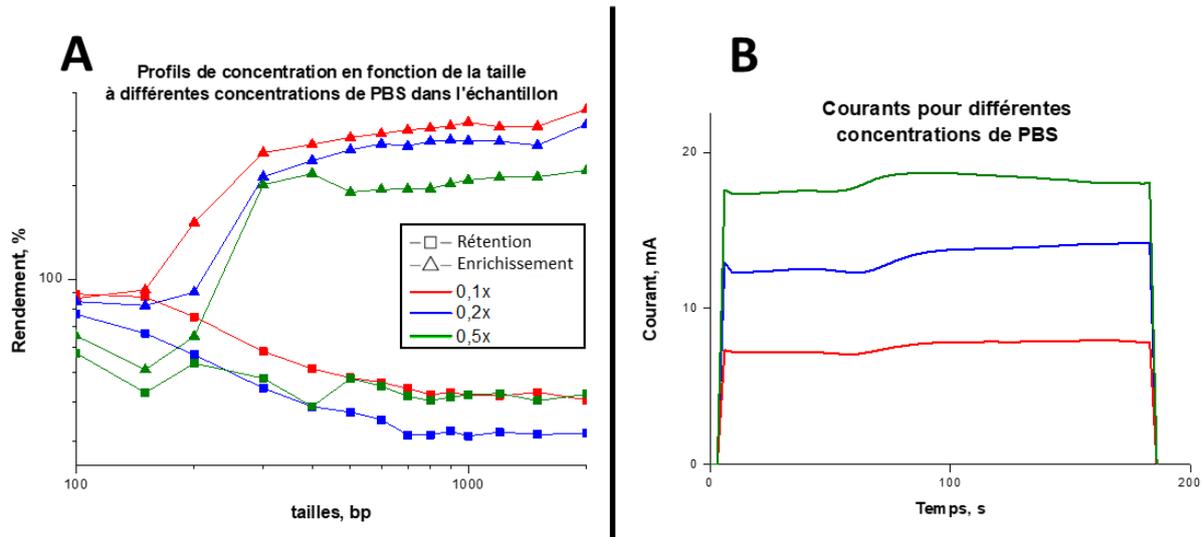


Figure 83 - Résultats de concentration d'ADN avec trois solutions salées de concentrations différentes. Toutes les solutions contiennent du PVP 5% BPTe 1x et une concentration en PBS allant de 0,1x (14 mM NaCl) à 0,5x (70 mM NaCl). Les expériences sont effectuées sans aucun rinçage : l'injection de solution d'ADN ladder de 100 à 2000 bp est réalisée en continu. La tension est appliquée pendant 3 min. Une tension de 13 V est appliquée sur les solutions 0,1x et 0,2x : une tension de 10 V est appliquée sur la solution 0,5x. (A) représente le profil de concentration en fonction de la taille à partir de l'analyse BIABooster. Pour chaque expérience est représenté une fraction de rétention (lorsque la tension est appliquée) et la fraction de concentration maximale d'enrichissement (à 0 V). (B) Mesures de courant au cours de l'application de tension pour les trois expériences. Le dispositif est refroidi dans les trois cas avec un dispositif à évacuation de bulles. La membrane utilisée est $2/123 \cdot 10^5$.

Ces expériences nous montrent que la présence importante de sels dans la solution n'est pas nécessairement un frein pour notre technologie dans le sens où les performances globales de cut-off sont assurées. Cependant, on peut regretter le fait qu'une concentration des plus petites tailles n'est pas possible en l'état et que les performances d'enrichissement sont bien en-deçà de ce qui peut être obtenu sur solution BPTe sans PBS. On soupçonne ici des pertes importantes d'ADN qui ne sont pas mesurées. Il semble vraisemblablement plus raisonnable de diluer un échantillon salé avant son traitement. Une concentration équivalente à PBS 0,1x permet de rester sur des courants modérés et nous permettrait de progresser sur la concentration des plus petits fragments.

6.1.1.2 Purification des sels

Pour retirer les sels contenus dans une solution d'ADN, on procède à l'injection d'une solution tampon de rinçage tout en gardant la tension activée. Deux expériences de rinçage sont exposées Figure 84 avec des solutions PBS 0,2x et 0,5x.

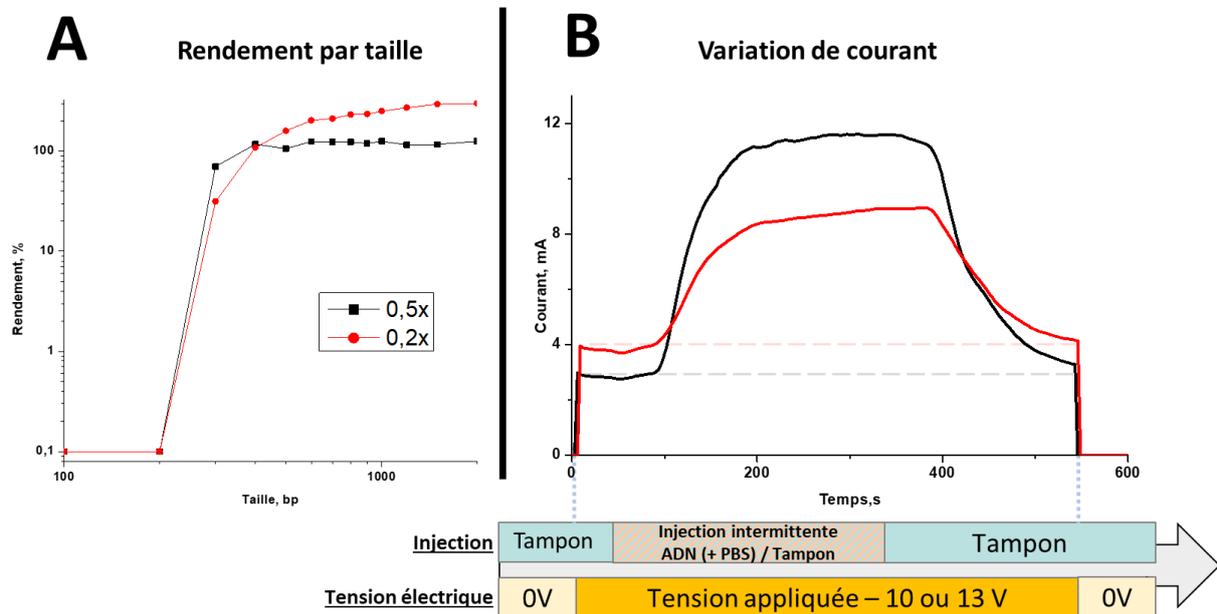


Figure 84 - purification des sels d'une solution d'ADN (A) profil de concentration en taille (BIABooster) d'échantillons récupérés à 0 V (B) Profil de courant et diagramme d'expérience. Le dispositif est d'abord rempli de solution tampon (PVP 5% BPE 1x) puis la solution d'ADN avec sels (PVP 5% BPE 1x + PBS 0,2x ou 0,5x) est injectée en intermittence avec une solution tampon pour le rinçage. L'intermittence consiste à une injection tiers ADN et deux-tiers tampon (4 s d'ADN ; 8 s de tampon). Une injection de tampon seul permet enfin de rincer les sels du dispositif. La tension appliquée est de 13V pour la solution de PBS 0,2x et 10 V pour la solution PBS 0,5x. La membrane utilisée est 2-123 10⁵.

On observe en Figure 84 B l'évolution du courant au cours de l'expérience : lors du passage de la solution salée dans la région comprise entre les deux électrodes, la conductivité augmente progressivement, ce qui se traduit par une augmentation du courant électrique mesuré. De la même façon, le courant revient au niveau initial lors du rinçage final du dispositif. L'injection de la solution salée est réalisée en intermittence avec l'injection de tampon BPE 1x pour permettre non seulement de diminuer la valeur maximale de courant passant dans le dispositif, mais également d'éviter la variation brutale de courant qui peut être délétère pour la tenue du champ électrique. En effet, rappelons que le champ électrique à la membrane se lit :

$$E_{membrane} = \frac{U_{totale} R_{membrane}}{d(R_{membrane} + R_{anode-membrane} + R_{membrane-cathode})} \quad (86)$$

Selon cette formule on comprend qu'avec une conductivité homogène dans le dispositif, le champ électrique n'est pas modifié. En revanche le champ est modifié dès lors que l'on rentre dans un état transitoire, où une partie seulement du dispositif a une conductivité différente. Lors du rinçage final, cet état transitoire se traduit par une zone anode-membrane avec une résistivité temporairement plus importante que la solution dans la membrane. Cela se traduit par une baisse temporaire du champ électrique jusqu'au retour de l'homogénéité de résistivité. Un calcul rapide dans le cas le plus défavorable où la résistivité de la zone anode-membrane serait multipliée par 10 (cas d'une solution

de PBS 0,5x par rapport au BPTÉ 1x), la baisse transitoire de champ est de 30% dans le cas d'un système avec membrane 2-123 10⁵.

Les sels présents dans la solution d'ADN sont effectivement éliminés du dispositif : le courant revient à son niveau d'origine qui correspond à un dispositif rempli de solution tampon BPTÉ 1x. Le temps de rinçage sur cette expérience est d'environ 250 s, ce qui correspond à un volume de 800 μ L (1,6 fois le volume effectif de la cavité entre l'anode et la cathode). Durant ce processus, et comme le montre la Figure 84 A, l'ADN est gardé à la membrane durant le rinçage : l'échantillon récupéré à 0 V est à une concentration équivalente (ou 2 fois plus importante) à la solution initiale d'ADN pour les tailles au-dessus du cut-off, et elle ne contient plus les sels initiaux. Le facteur d'enrichissement est ici assez faible et nous n'avons pas exploré davantage l'obtention de facteurs d'enrichissement importants sur un mode avec rinçage.

6.1.2. Etude sur plasma sanguin

6.1.2.1 Constituants du plasma sanguin et remarques préliminaires

L'utilisation du plasma par rapport au sang complet permet de s'affranchir des globules blancs et des globules rouges, tout en contenant l'ADN circulant d'intérêt. Le plasma est préparé par centrifugation de sang (2 000 x g à 4°C) et récupération du surnageant (deux centrifugations successives de 20 et 10 min). Le sang que nous avons utilisé était en provenance de l'établissement français du sang. Le plasma résulte finalement en une solution peu visqueuse de sels (dont ~ 140 mM de NaCl), protéines à hauteur de 6-8% (en particulier de l'albumine de sérum humain HSA >50%, mais aussi globuline 20% et fibrinogène) et autres (hormones, lipides, glucides, ...).

Pour simplifier l'étude, nous avons testé des solutions de plasma artificielles, par l'ajout de BSA (Albumine de sérum bovin) très souvent utilisée en laboratoire. La concentration normale de HSA dans le sang humain est de 35 à 50 g/L¹⁸⁷. Pour éviter les effets de collage des protéines et le bouchage des pores nous avons essayé l'ajout de protéinase K pour digérer les protéines et des détergents comme le SDS (avec incubation).

Jusqu'à présent, nous avons testé différentes concentrations de BSA ajoutées à notre solution tampon habituelle de PVP 5%. Même à concentration faible de 10 g/L et en présence de protéinase K (1 mg/mL), nous ne sommes pas parvenus à détecter de l'ADN en sortie de dispositif μ LAP. Il en est de même pour des solutions de plasma sanguin.

6.1.2.2 Caractérisation MEB du bouchage

Afin d'identifier l'origine des difficultés rencontrées dans les expériences avec protéines, nous avons caractérisé au MEB (Microscope électronique à balayage) des membranes qui ont été soumises à différentes solutions (Figure 85) puis séchées par injection d'air dans le dispositif, et enfin métallisées. On observe que le passage de notre solution habituelle de tampon avec PVP 360 kDa 5% est sans conséquence pour l'intégrité des pores. En revanche l'ajout de BSA (en concentration 40 mg/mL) montre la présence d'un tapis de particules au sein du pore. Avec l'ajout de protéinase K, le bouchage semble toujours présent. Sans surprise, le passage d'une solution de plasma donne des bouchages similaires au passage de BSA. Enfin, nous montrons que le traitement du plasma par une digestion spécifique (la recette ne peut être communiquée car propriété d'Adélis) nous permet de prévenir le bouchage sur une solution de plasma diluée de moitié avec du PVP 5%.

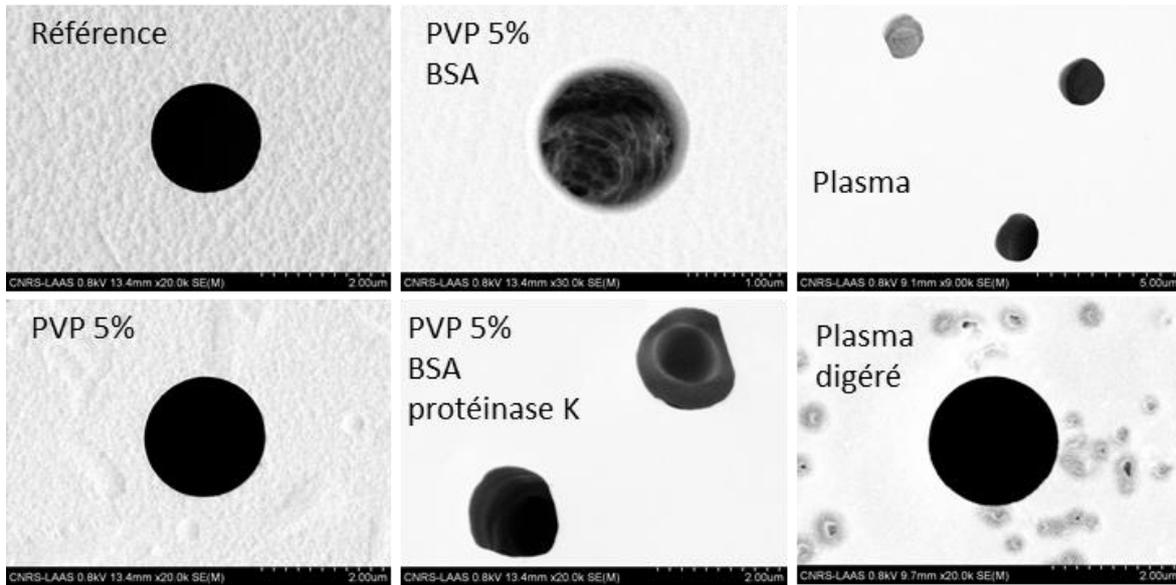


Figure 85 - Images MEB (Microscope Electronique à Balayage) de différentes membranes. La référence est la membrane nue sans passage de solutions. Les autres membranes ont subi des injections de différentes solutions filtrées (PVP 360 kDa 5% ; PVP 360 kDa 5% + BSA 40 mg/mL ; PVP 360 kDa + BSA 40 mg/mL + protéinase K 1 mg/mL; plasma sanguin seul ; plasma sanguin (50%) dans PVP 5% digéré (méthode Adélis).

L'article de Bowen et al. (1995)¹⁸⁸ décrit le phénomène de bouchage de membranes d'ultrafiltration similaires aux nôtres (de tailles de pores inférieures à $1\ \mu\text{m}$) par de la BSA. Ils décrivent le phénomène en 4 phases illustrées Figure 86 : (A) La présence d'agrégats plus gros que le pore provoque son blocage ; (B) Les molécules de BSA peuvent s'accumuler à l'intérieur du pore ; (C) des pores peuvent se boucher au fur et à mesure de l'accumulation de nouvelles molécules de BSA à l'entrée du pore ; (D) la membrane peut finalement être recouverte totalement par un « gâteau de filtration ». L'équipe caractérise ces phénomènes par des mesures de débit à pression constante et indique que ces phases peuvent être simultanées ou successives. Dans notre cas, les solutions sont filtrées à $0,22\ \mu\text{m}$ pour prévenir (A), mais des agrégats pourraient se former après préparation ou bien par accumulation (C). Les images au MEB révèlent nettement des bouchages internes ainsi que des recouvrements partiels des pores par accumulation.

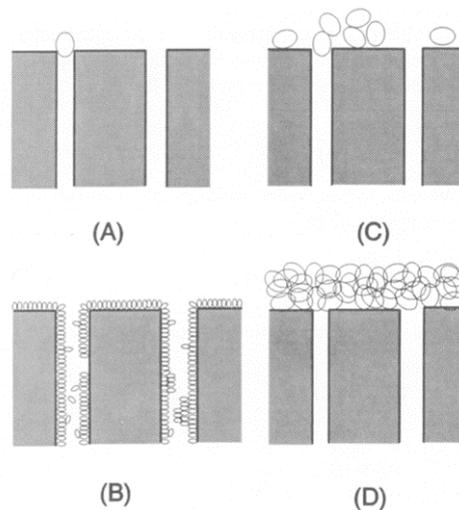


Figure 86 - Schémas des mécanismes d'"encrassement" d'une membrane poreuse : (A) blocage complet d'un pore ; (B) blocage interne des pores ; (C) blocage standard par accumulation ; (D) gâteau de filtration. (Source : Bowen et al. 1995¹⁸⁸)

Même avec la technique de prétraitement d'Adélis qui semble ne montrer aucun bouchage des pores, nous ne sommes pas parvenus à concentrer de l'ADN sur μ LAP ou sur puce par xurographie.

6.1.2.3 Conclusion sur expériences avec protéines

En conclusion, alors que l'un des objectifs d'application de cette technologie est la purification d'ADN contenu dans plasma sanguin, nous ne sommes pas parvenus à concentrer de l'ADN dans notre système μ LAP avec du plasma, et même encore avec des solutions plus simples contenant de faibles concentrations d'albumine, malgré le prétraitement de la solution. Après quelques échecs, nous avons préféré orienter la technologie sur un volet plus abordable comme le séquençage NGS pour la durée de cette thèse. Cependant, comme la technologie BIABooster est désormais fonctionnelle sur plasma sanguin à Adélis, nous restons optimistes sur l'applicabilité de μ LAP sur plasma en poursuivant les recherches d'optimisation.

6.2. Préparation pour le séquençage de 2^{ème} génération (NGS)

6.2.1. Cadre de l'étude et objectif

Dans cette dernière partie, nous appliquons notre système μ LAP à la préparation d'échantillons de séquençage. Nous avons collaboré avec la plateforme GeT-PlaGe (Génotoul) de Toulouse qui fournit à la communauté scientifique et des clients privés, ses services de génomique notamment dans le domaine du séquençage. Elle utilise ainsi un large panel d'équipements de séquençage : MiSeq d'Illumina pour du NGS par exemple, et MinION, GridION d'ONT pour du séquençage nanopore de troisième génération.

Afin de tester notre technologie sur un cas concret, nous préparons un échantillon dans une optique de séquençage NGS Illumina. L'échantillon en question est de l'ADN bovin, extrait avec un kit Gentra Puregene (Qiagen). L'ADN est fragmenté par ultrasonication (covaris M220) préalablement à la préparation, résultant en une répartition de tailles allant de 100 bp à 3 kb (Figure 87). Pour l'optimisation du séquençage NGS, cet échantillon doit être sélectionné en taille autour de 600 bp. Nous avons choisi de l'encadrer entre 200 et 700 bp (lignes rouges Figure 87), dans le cadre d'une autre collaboration avec l'Institut de Génétique Humaine de Montpellier. Nous voulions en effet vérifier que le procédé était adaptable à d'autres applications potentielles, notamment l'isolement d'ADN cytosolique autour de 200 bp.

Les expériences qui vont suivre n'ont été réalisées qu'une seule fois. Elles constituent des résultats préliminaires avec une marge de progression importante.

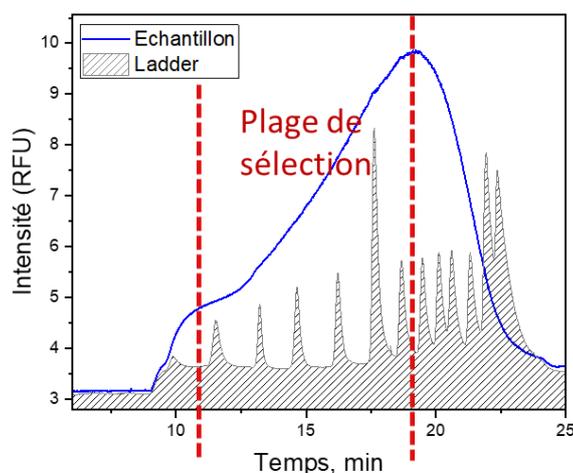


Figure 87 - Profil en taille de l'échantillon bovin à préparer (bleu) avec un ladder 100 bp pour référence de taille. Entre les deux lignes rouges est représentée notre plage de sélection.

6.2.2. Protocole

Notre protocole de sélection en taille par encadrement est réalisé en deux étapes correspondant à la borne de haut poids moléculaire puis la borne de bas poids moléculaire de l'encadrement. Chaque étape consiste en une expérience de concentration avec rinçage comme présenté Figure 88. Pour chaque expérience, on appellera « fraction bas poids moléculaires (PM) » la fraction récupérée lorsque la tension est appliquée (en dessous du cut-off) et « fraction haut PM » la fraction récupérée à 0 V (au-dessus du cut-off). Les deux étapes sont réalisées avec des tensions différentes (5 puis 25 V). La première expérience à tension basse permet de récupérer la fraction bas PM entre 0 et 700 bp. A partir

de cette fraction, la deuxième expérience est réalisée à tension élevée, permettant la purification et la concentration de la fraction d'intérêt (Figure 89).

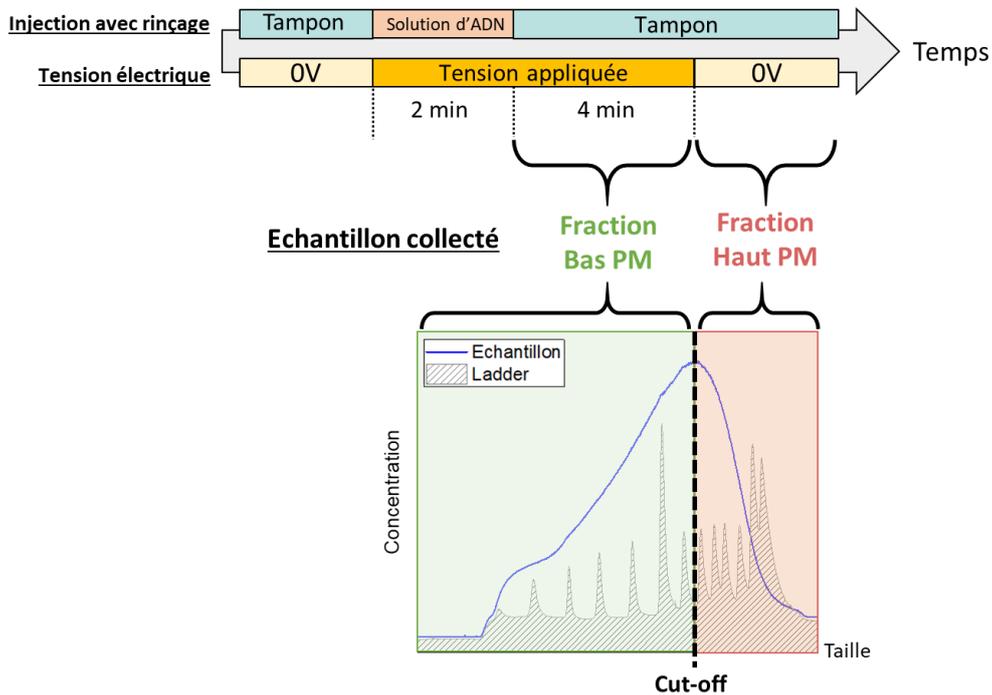


Figure 88 - Schéma de protocole d'expérience. L'échantillon collecté lorsque la tension est appliquée est la fraction bas poids moléculaire (PM) qui correspond aux tailles inférieures au cut-off. L'échantillon collecté à 0V est la fraction haut PM et correspond aux tailles supérieures au cut-off.

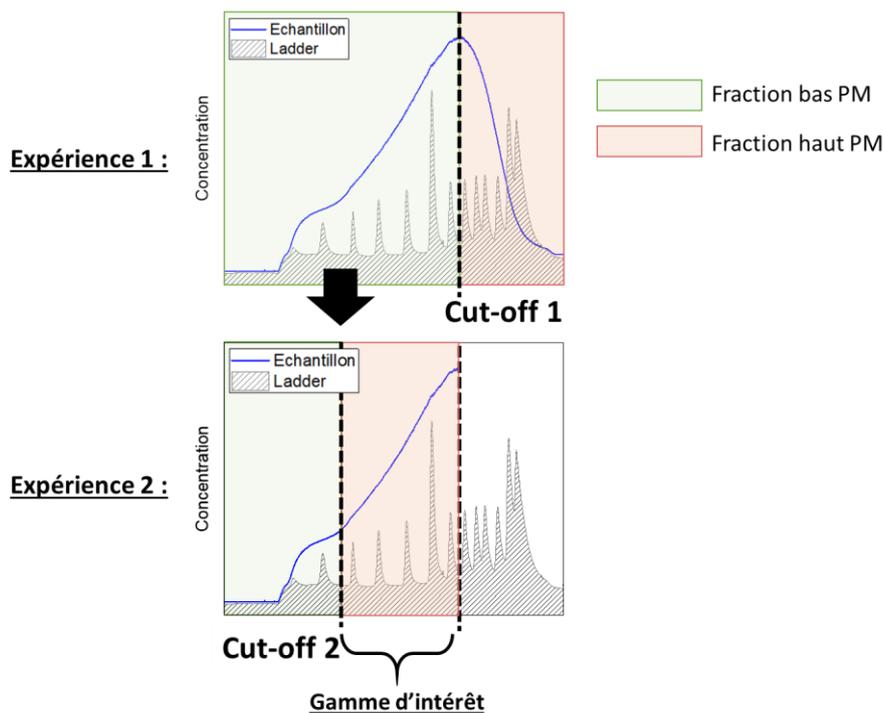


Figure 89 - Protocole de sélection en taille en deux étapes. On collecte la fraction inférieure à 700 bp lors de l'expérience 1. Puis, on en récupère la fraction supérieure à 200 bp dans l'expérience 2.

Pour les deux expériences, la membrane utilisée est $2-123 \times 10^5$. Respectivement pour la première et deuxième expérience, les champs électriques appliqués sont de 240 V/cm (5 V appliqués) et 2,1 kV/cm (25 V) et les vitesses hydrodynamiques moyennes de 9 mm/s (débit de 220 μ L/min) et 12 mm/s (300 μ L/min).

6.2.3. Résultats de la sélection en taille

La Figure 90 présente les résultats des deux étapes successives de l'expérience avec en A l'étape 1 correspondant à un cut-off de 700 bp réalisé sur l'échantillon initial. La fraction basse est récupérée et utilisée en étape 2 (Figure 90 B) avec un cut-off à 200 bp. La fraction haute de l'étape 2 est l'échantillon final obtenu.

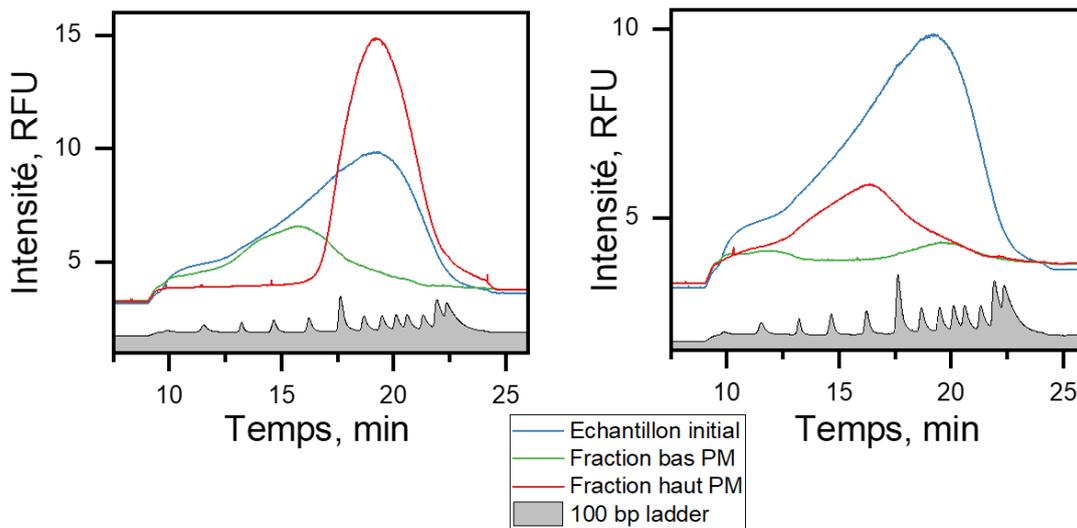


Figure 90 - Résultats des deux étapes d'expérience (A) Expérience 1, cut-off à 700 bp (B) Expérience 2, cut-off à 200 bp à partir de la fraction bas PM de l'expérience 1.

La concentration de l'échantillon initial de GeT-PlaGe est de 4,66 ng/ μ L. Nous avons dilué cet échantillon pour obtenir une solution de 50 pg/ μ L dans du tampon PVP 5% et BPTe 0,5x. Le volume injecté est de 500 μ L (~25 ng d'ADN). La fraction basse collectée suite à l'étape 1 contient 18 ng d'ADN. De cette fraction, 7 ng ont été utilisés pour l'étape 2. A l'issue de cette dernière, l'échantillon final contient 2 ng d'ADN dans un volume de 100 μ L.

6.2.4. Discussion et comparaison à une purification par billes

Notre première expérience sur échantillon réel a sélectionné en taille avec succès l'échantillon entre 200 et 600 bp. La Figure 91 compare notre échantillon final purifié avec μ LAP (rouge) et l'échantillon initial (bleu). L'échantillon vert correspond à un profil de purification par bille qui a été obtenu par GeT-PlaGe avec un autre échantillon initial cette fois-ci avec une sélection en taille consigne de 500 bp. Même si notre purification n'est pas strictement comparable à la purification par billes, étant donné les consignes différentes, on peut remarquer que notre échantillon final comporte une coupure peu nette à 700 bp. En effet, notre première sélection en taille au cut-off de 700 bp présente des fuites légères qui perdurent dans l'échantillon final.

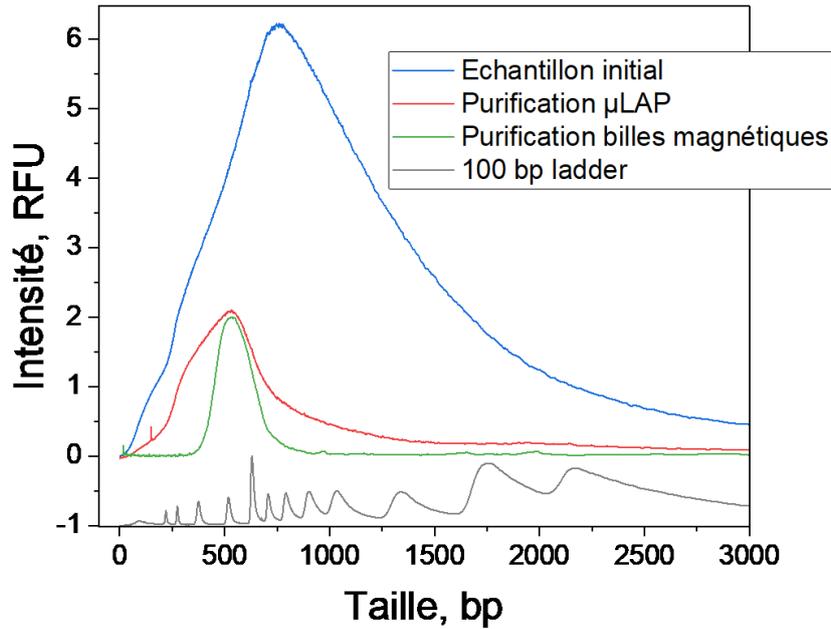


Figure 91 - Comparaison des profils de taille de l'échantillon initial, l'échantillon purifié par notre système μ LAP et un échantillon typique sélectionné par purification par billes magnétiques. Les données correspondant à l'échantillon de purification par billes ont été obtenues par GeT-PlaGe par mesure au Fragment Analyzer (Agilent), l'intensité du signal a été réajustée pour être intégrée au graphique. Les autres profils de taille ont été obtenus par BIABooster.

6.2.5. Vérification de la sélection en taille avec ladder

Comme la vérification des pertes n'a pas été effectuée sur l'échantillon de GeT-PlaGe, nous avons contrôlé l'efficacité de notre expérience en réalisant le même protocole sur un 100 bp ladder. De la même manière, la fraction bas PM de la première expérience (5 V) est utilisée pour la seconde sélection, où l'échantillon haut PM (25 V) constitue l'échantillon final. Les résultats sont exposés Figure 92. La Figure 92 A présente les rendements pour chaque taille (rapport de concentration entre l'échantillon collecté et la référence du ladder initial injecté).

Pour la première expérience à 5 V, on remarque Figure 92 A que la fraction bas PM comporte un cut-off à 600 bp mais qui présente une quantité non négligeable d'ADN de plus haut poids moléculaire. Alors que l'échantillon est dilué par le rinçage (les tailles de 100 à 500 bp sont collectées avec un rendement à 50%), l'échantillon comporte toujours 20% de la bande de 1 kb et 10% de la bande à 2 kb. Après la deuxième expérience à 25 V, la fraction haut PM résulte bien en une concentration de la fraction précédente (fraction bas PM 5 V) pour toutes les tailles au-dessus de 200 bp en particulier (la bande de 100 bp est effectivement éliminée).

Pour les deux expériences, aucune perte significative n'a été mesurée. Lors de la première étape, 80 ng d'ADN sont injectés. 30 ng collectés dans la fraction bas PM sont utilisés pour la deuxième étape.

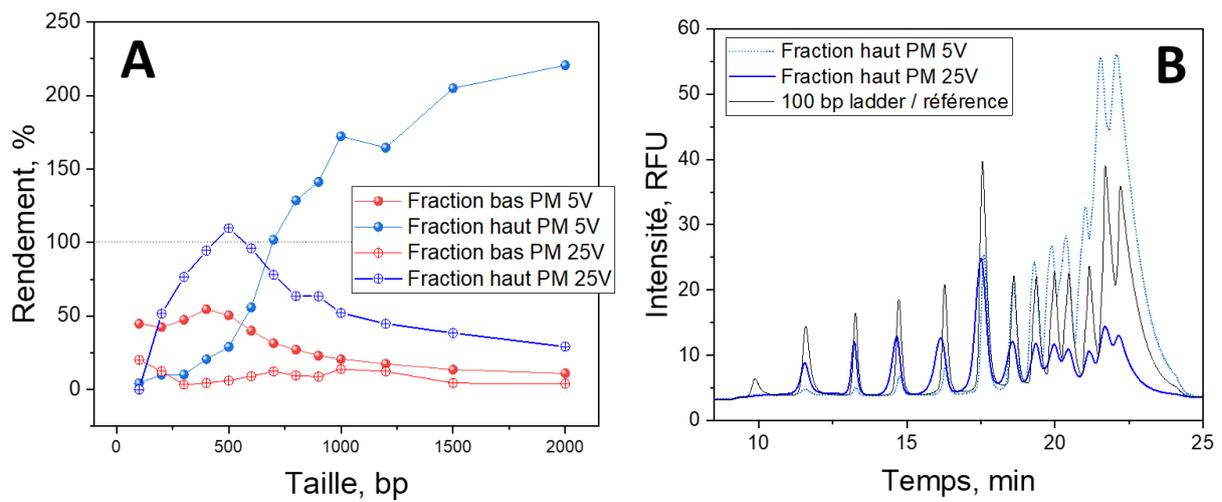


Figure 92 - Résultat de fractionnement en taille sur ladder. Les fractions bas PM sont collectées lors de l'application de la tension. Les fractions haut PM sont collectées à 0 V. Après fractionnement à 5 V, la fraction bas PM est collectée et fractionnée à 25 V. (A) Rendement (signal échantillon / signal référence) en fonction de la taille par analyse BIABooster. (B) Profils d'intensité en fonction de la taille des fractions haut PM à 5V et 25V.

Conclusion et perspectives

La génomique est une discipline très récente de la biologie moderne. Née des premiers travaux de biologie moléculaire par la découverte de la structure de l'ADN il y a à peine 70 ans, elle a bouleversé nos vies par son apport considérable à notre compréhension du vivant et notre médecine moderne. Une illustration récente de son implication dans notre quotidien est l'épidémie de COVID-19. Parmi les plus dévastatrices de notre histoire, cette pandémie a été la première à naître dans une ère post-génomique¹⁸⁹. Un mois seulement après son apparition, l'intégralité du génome du virus est connue du monde entier grâce à des techniques de séquençage NGS vieilles de moins de vingt ans¹⁹⁰. En un temps record, l'analyse du génome a permis d'en identifier l'origine¹⁹¹, les mécanismes de pénétration des cellules¹⁹², et l'ensemble des développements thérapeutiques et vaccinaux qui ont permis de lutter contre sa propagation¹⁸⁹. Pour ses applications multiples, le séquençage d'ADN nécessite une préparation d'échantillon préalable, afin de purifier et sélectionner en taille l'ADN. En fonction du type de séquençage, NGS ou 3^{ème} génération, les tailles des molécules d'ADN à concentrer sont très différentes : généralement 400 à 600 bp pour la NGS, idéalement > 10 kb pour la 3^{ème} génération. Sur un autre registre, l'ADN circulant, un biomarqueur de cancer prometteur en matière de diagnostic précoce, présent en faible concentration dans le sang, nécessite une préparation importante qui se traduit par la concentration d'un grand volume de solution complexe (sels, protéines). Il existe un certain nombre de techniques de purification et sélection en taille utilisées sur le marché : la plus populaire à l'heure actuelle utilise des billes magnétiques, du fait de sa rapidité d'exécution. Cependant, la sélection en taille avec ce procédé peut manquer de sélectivité, présenter des rendements faibles et être difficile à mettre en place pour de la purification de grands volumes. La technologie μ LAP développée au cours de cette thèse a visé à répondre à un certain nombre des besoins évoqués, avec une approche originale d'actionnement électrohydrodynamique.

Principaux résultats

Dans ce manuscrit, nous avons décrit la méthode de concentration et de sélection en taille d'ADN sur laquelle repose notre technologie. Par l'actionnement hydrodynamique et électrique dans un fluide viscoélastique, l'ADN subit une force transverse dépendante du poids moléculaire. Par une parallélisation à l'aide d'une membrane isopore, la concentration et la sélection en taille est réalisée sur une technologie à haut débit ($\sim 300 \mu\text{L}/\text{min}$) permettant ainsi le traitement de plusieurs mL de solution en quelques minutes. Il en résulte un système μ LAP robuste, composé d'une structure imprimée en 3D et intégrant des électrodes de platine. Le système est adaptable, notamment par l'utilisation de différentes membranes.

Nous avons décrit toutes les difficultés qui peuvent être rencontrées dans notre système (notamment la présence de bulles, l'échauffement, l'altération de la viscosité, les variations de pH, la dispersion) et les réponses que nous y avons apportées grâce à des efforts de design (refroidissement, structure fractale) et de composition de tampon. Nous avons également abordé le phénomène de fuite d'ADN, intrinsèque à la géométrie de la membrane, et nous en avons donné un modèle analytique, en accord avec les résultats expérimentaux. Un autre phénomène évoqué est la perte d'ADN, problématique à tensions élevées, nécessaires à la concentration de fragments de bas poids moléculaire (< 200 bp). Nous avons apporté des éléments de réponse quant à l'origine des pertes, notamment dans la dépurination de l'ADN par acidification à l'anode.

Nous présentons finalement un outil capable de concentrer l'ADN de 200 bp à plus de 150 kb avec des facteurs d'enrichissement jusqu'à 10 fois. La taille peut être sélectionnée au-delà d'un seuil de taille

adaptable, que nous avons calibré sur une gamme de 200 à 700 bp. Nos expériences ne nous ont pas exposé de problème de saturation, montrant une concentration effective de près de 500 ng d'ADN pour une expérience de quelques minutes.

Enfin, nous avons montré l'applicabilité de notre système à des solutions salées, et la possibilité de purifier ces sels. Aussi, nous avons exposé des résultats préliminaires de préparation d'échantillon de séquençage NGS, en collaboration avec la plateforme GeT-PlaGe.

Perspectives

Un verrou important pour le développement de notre système est la perte d'ADN. Alors qu'elle semble avoir des conséquences négligeables sur nos performances pour concentrer de l'ADN de taille modérée (> 300 bp) en raison des courants faibles utilisés, elle est particulièrement critique pour concentrer les petits fragments qui nécessitent un champ électrique élevé. Une compréhension plus approfondie du mécanisme de perte est donc nécessaire afin d'orienter notre système vers la concentration d'ADN de bas poids moléculaire, comme c'est le cas pour l'application sur ADN circulant prise en exemple dans le chapitre 1. Pour prévenir ces pertes, une possibilité évoquée est la modification géométrique illustrée Figure 93. En agrandissant l'échelle du système, par un diamètre de membrane effective passant de 12 mm à 200 mm et un éloignement de l'anode, passant d'une distance membrane-anode de 2 mm à 3 mm. Ce faisant, le volume entre la membrane et l'anode passerait de 225 μL sur notre géométrie actuelle à un volume d'1 mL. L'idée de ce nouveau format est de procéder à la concentration d'un volume fini. Ce volume anode-membrane est rempli de solution ADN avant l'application de tension, évitant le passage de l'ADN aux abords de l'anode, prévenant ainsi sa perte. Un volume d'1 mL semble raisonnable pour une première étape de test sur de l'ADN de bas poids moléculaire.

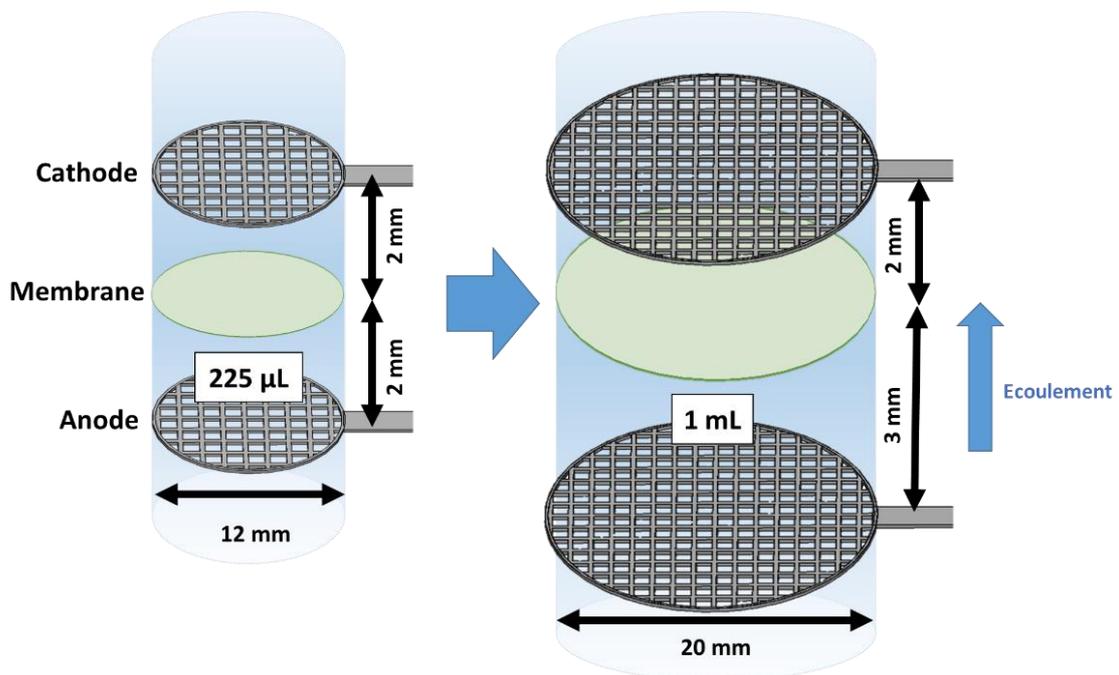


Figure 93 - Augmentation du volume anode- membrane (de 225 μL à 1 mL) par agrandissement de la section (diamètre passé de 12 mm à 20 mm) et éloignement de l'anode (de 2 mm à 3 mm).

Afin d'orienter notre système sur la préparation d'ADN circulant, un travail poussé doit également être entrepris sur les protéines. Les résultats préliminaires sur plasma sanguin ont révélé que les pores ont

tendance à se boucher en présence d'albumine. Il nous faudra donc résoudre ce problème, probablement en prétraitant la solution pour diminuer l'influence des protéines.

D'un point de vue applicatif, nous devons optimiser les performances du système pour la préparation d'ADN en NGS. Nos premiers résultats encourageants avec la plateforme de séquençage GeT-Plage indiquent que le profil de sélection doit être resserré afin de se positionner de manière concurrentielle avec les autres outils de préparation d'échantillons disponibles sur le marché. L'optimisation du protocole, par une sélection en taille en une seule expérience sans perte importante, serait une réelle plus-value par rapport aux protocoles de sélection par billes réalisés en deux étapes. Ce procédé est illustré Figure 94. Au lieu de passer d'une certaine tension à 0 V, générant un cut-off unique, l'idée est d'appliquer une tension plus basse créant un second cut-off. L'application de la tension élevée dans un premier temps, fixe la borne inférieure de l'intervalle de tailles souhaité : les fragments en-dessous du cut-off fuient. Lors de l'application d'une tension moins élevée, le cut-off est déplacé vers les tailles d'ADN de plus haut poids moléculaire pour fixer la borne supérieure de l'intervalle. L'ADN retenu à la membrane est de taille supérieure à l'intervalle, de sorte que la fraction intermédiaire, qui fuit lors de l'abaissement de tension, correspond exactement aux tailles de l'intervalle souhaité.

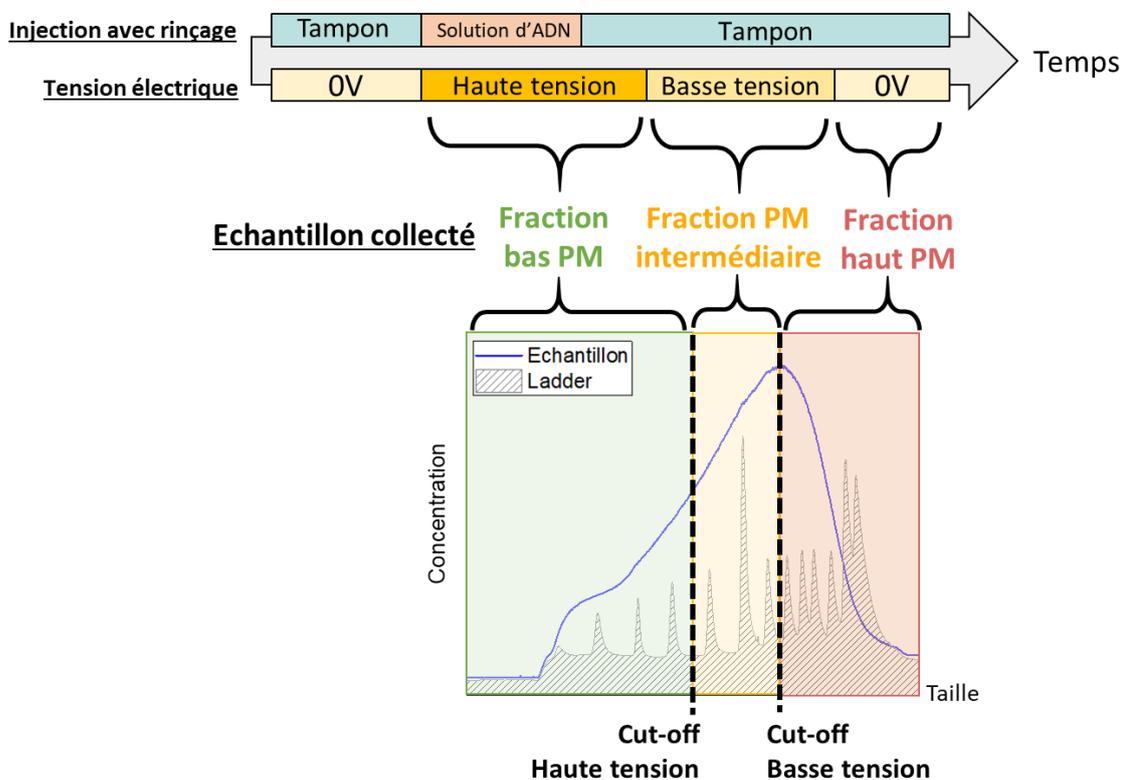


Figure 94 – Protocole de sélection en taille en une seule étape par application d'une tension intermédiaire.

Par ailleurs, nous envisageons de collaborer avec l'IGH de Montpellier dans le cadre de l'étude de l'ADN cytosolique comme marqueur d'inflammation¹⁹³ dans le but d'améliorer les immunothérapies. Afin de caractériser cet ADN, l'IGH doit séquencer cet ADN cytosolique. Notre technologie μ LAP peut préparer les échantillons avant leur séquençage, qui nécessite une concentration de 20 ng d'ADN dans 20 μ L et une sélection en taille entre 200 et 600 bp. Nos résultats préliminaires avec GeT-PlaGe confirment que notre système est applicable sur cette gamme de taille.

Nous pouvons également étendre notre système vers les hauts poids moléculaires comme le confirment nos résultats de concentration d'ADN lambda et d'ADN T4. Nous devons confirmer

Conclusion et perspectives

l'adaptabilité du seuil de taille sur cette gamme de haut-poids moléculaire. La préparation pour le séquençage de 3^{ème} génération nécessite une sélection grossière des plus grands fragments de l'échantillon. Nous ignorons l'influence que peut avoir le PVP sur le colmatage des pores sur un séquenceur Nanopore. GeT-PlaGe nous propose de tester notre procédé sur une technologie PacBio en remplacement du Nanopore. Cette technologie, elle aussi de 3^{ème} génération, nécessite une sélection en taille entre 15 et 20 kb. Cette plage semble facilement abordable pour μ LAP.

Technologiquement, notre système est robuste et très répétable, mais il gagnerait à être automatisé. La collecte des fractions est pour le moment manuelle et pourrait être réalisée automatiquement avec un carrousel. Le format du système μ LAP peut être adapté en fonction de l'application : traitement de plus ou moins grands volumes, nécessité de travailler à volume fini pour de l'ADN de bas poids moléculaire. L'utilisation de membranes poreuses à bas coût comme élément central de μ LAP est par ailleurs un avantage pour sa potentielle maturation industrielle. Une étude de marché doit être envisagée pour valider l'applicabilité de notre technologie industriellement et orienter son développement futur.

Références

1. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
2. Weissenbach, J. [The human genome project in the year 2000]. *Bull Acad Natl Med* **184**, 1371–1378; discussion 1379-1382 (2000).
3. Nurk, S. *et al.* The complete sequence of a human genome. *Science* **376**, 44–53 (2022).
4. Lunshof (Co-first author), J. E. *et al.* Personal genomes in progress: from the Human Genome Project to the Personal Genome Project. *Dialogues in Clinical Neuroscience* **12**, 47–60 (2010).
5. Lianidou, E. & Pantel, K. Liquid biopsies. *Genes, Chromosomes and Cancer* **58**, 219–232 (2019).
6. Trigg, R. M., Martinson, L. J., Parpart-Li, S. & Shaw, J. A. Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: A systematic review of the methodology literature. *Heliyon* **4**, e00699 (2018).
7. Hashad, D., Sorour, A., Ghazal, A. & Talaat, I. Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *J Clin Lab Anal* **26**, 467–472 (2012).
8. Delgado, P. O. *et al.* Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. *Tumour Biol* **34**, 983–986 (2013).
9. Tissot, C. *et al.* Circulating free DNA concentration is an independent prognostic biomarker in lung cancer. *European Respiratory Journal* **46**, 1773–1780 (2015).
10. Ranchon, H. Développement d'outils analytiques par et pour la microfluidique : caractérisation d'écoulements d'objets dissous et intégration d'un système de séparation sans matrice de biomolécules. (Toulouse 3, 2013).
11. Bancaud, A. & Ranchon, H. Method for Separating Biological Molecules and Cells in Solution. (2014).
12. Bancaud, A., MALBEC, R., Chami, B. & NELYTE, I. Method for nucleic acid detection. (2020).

Références

13. Malbec, R. Système microfluidique μ LAS pour l'analyse de l'ADN résiduel : application au diagnostic de la maladie de Huntington et à l'analyse de l'ADN circulant. (Université de Toulouse, 2018).
14. Poulet, G. *et al.* Characterization of Plasma Cell-Free DNA Integrity Using Droplet-Based Digital PCR: Toward the Development of Circulating Tumor DNA-Dedicated Assays. *Frontiers in Oncology* **11**, (2021).
15. Milon, N. Technologie μ LAS pour l'analyse et la purification d'ADN de haut poids moléculaire. (Université de Toulouse, 2019).
16. Dairawan, M. & Shetty, P. J. The Evolution of DNA Extraction Methods. *AJBSR* **8**, 39 (2020).
17. Tan, S. C. & Yiap, B. C. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *J Biomed Biotechnol* **2009**, 574398 (2009).
18. Shehadul Islam, M., Aryasomayajula, A. & Selvaganapathy, P. R. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines (Basel)* **8**, 83 (2017).
19. Ebeling, W. *et al.* Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry* **47**, 91–97 (1974).
20. Meselson, M., Stahl, F. W. & Vinograd, J. Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **43**, 581–588 (1957).
21. Radloff, R., Bauer, W. & Vinograd, J. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**, 1514–1521 (1967).
22. Jasinski, D., Schwartz, C., Haque, F. & Guo, P. Large Scale Purification of RNA Nanoparticles by Preparative Ultracentrifugation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1297**, 67–82 (2015).
23. Lueders, T., Manefield, M. & Friedrich, M. W. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology* **6**, 73–78 (2004).

Références

24. Martineau, C., Whyte, L. G. & Greer, C. W. Development of a SYBR safe™ technique for the sensitive detection of DNA in cesium chloride density gradients for stable isotope probing assays. *Journal of Microbiological Methods* **73**, 199–202 (2008).
25. Gao, J. *et al.* Application of GelGreen™ in Cesium Chloride Density Gradients for DNA-Stable Isotope Probing Experiments. *PLOS ONE* **12**, e0169554 (2017).
26. Garger, S. J., Griffith, O. M. & Grill, L. K. Rapid purification of plasmid DNA by a single centrifugation in a two-step cesium chloride-ethidium bromide gradient. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **117**, 835–842 (1983).
27. McKiernan, H. E. & Danielson, P. B. Chapter 21 - Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. in *Molecular Diagnostics (Third Edition)* (ed. Patrinos, G. P.) 371–394 (Academic Press, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-802971-8.00021-3.
28. Berensmeier, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 495–504 (2006).
29. M. Carpi, F., Di Pietro, F., Vincenzetti, S., Mignini, F. & Napolioni, V. Human DNA Extraction Methods: Patents and Applications. *DNAG* **5**, 1–7 (2011).
30. St John, J. & Quinn, T. W. Rapid capture of DNA targets. *Biotechniques* **44**, 259–264 (2008).
31. Melzak, K. A., Sherwood, C. S., Turner, R. F. B. & Haynes, C. A. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* **181**, 635–644 (1996).
32. Ingram, L. O. Mechanism of lysis of *Escherichia coli* by ethanol and other chaotropic agents. *J Bacteriol* **146**, 331–336 (1981).
33. Boom, R. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 495–503 (1990).
34. Vandeventer, P. E. *et al.* Multiphasic DNA adsorption to silica surfaces under varying buffer, pH, and ionic strength conditions. *J Phys Chem B* **116**, 5661–5670 (2012).

Références

35. Smerkova, K. *et al.* Investigation of interaction between magnetic silica particles and lambda phage DNA fragment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **86**, 65–72 (2013).
36. Nguyen, T. H. & Elimelech, M. Plasmid DNA Adsorption on Silica: Kinetics and Conformational Changes in Monovalent and Divalent Salts. *Biomacromolecules* **8**, 24–32 (2007).
37. Shin, J. H. Nucleic Acid Extraction Techniques. in *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (eds. Tang, Y.-W. & Stratton, C. W.) 209–225 (Springer US, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-3970-7_11.
38. Chacon-Cortes, D. & Griffiths, L. R. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *BSAM* **2**, 1–9 (2014).
39. Smith, D. E., Perkins, T. T. & Chu, S. Dynamical Scaling of DNA Diffusion Coefficients. *Macromolecules* **29**, 1372–1373 (1996).
40. Dorfman, K. D. DNA electrophoresis in microfabricated devices. *Rev. Mod. Phys.* **82**, 2903–2947 (2010).
41. Manghi, M. & Destainville, N. Physics of base-pairing dynamics in DNA. *Physics Reports* **631**, 1–41 (2016).
42. Yamaguchi, Y. *et al.* Polyethylene Oxide (PEO) and Polyethylene Glycol (PEG) Polymer Sieving Matrix for RNA Capillary Electrophoresis. *PLOS ONE* **10**, e0123406 (2015).
43. Viovy, J.-L. Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms. *Rev. Mod. Phys.* **72**, 813–872 (2000).
44. Lerman, L. S. & Frisch, H. L. Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule? *Biopolymers* **21**, 995–997 (1982).
45. Herschleb, J., Ananiev, G. & Schwartz, D. C. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc* **2**, 677–684 (2007).
46. Bronner, I. F., Quail, M. A., Turner, D. J. & Swerdlow, H. Improved Protocols for Illumina Sequencing. *Curr Protoc Hum Genet* **0 18**, 10.1002/0471142905.hg1802s62 (2009).

Références

47. How short inserts affect sequencing performance.
<https://emea.support.illumina.com/bulletins/2020/12/how-short-inserts-affect-sequencing-performance.html>.
48. Stortchevoi, A., Kamelamela, N. & Levine, S. S. SPRI Beads-based Size Selection in the Range of 2-10kb. *J Biomol Tech* **31**, 7–10 (2020).
49. Liu, L., Guo, Z., Huang, Z., Zhuang, J. & Yang, W. Size-selective separation of DNA fragments by using lysine-functionalized silica particles. *Scientific Reports* **6**, 22029 (2016).
50. Ó'Fágáin, C., Cummins, P. M. & O'Connor, B. F. Gel-Filtration Chromatography. *Protein Chromatography* **1485**, 15–25 (2016).
51. Wu, R., Seah, Y. & Wang, Z. Microfluidic chip for stacking, separation and extraction of multiple DNA fragments. *Journal of Chromatography A* **1437**, 219–225 (2016).
52. Chen, X., Cui, D., Liu, C., Li, H. & Chen, J. Continuous flow microfluidic device for cell separation, cell lysis and DNA purification. *Analytica Chimica Acta* **584**, 237–243 (2007).
53. H. Wunsch, B. *et al.* Gel-on-a-chip: continuous, velocity-dependent DNA separation using nanoscale lateral displacement. *Lab on a Chip* **19**, 1567–1578 (2019).
54. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463–5467 (1977).
55. Hagemann, I. S. Chapter 1 - Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. in *Clinical Genomics* (eds. Kulkarni, S. & Pfeifer, J.) 3–19 (Academic Press, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-404748-8.00001-0.
56. Shendure, J. *et al.* DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature* **550**, 345–353 (2017).
57. Ahmadian, A., Ehn, M. & Hober, S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta* **363**, 83–94 (2006).
58. Behjati, S. & Tarpey, P. S. What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice* **98**, 236–238 (2013).

Références

59. Płoski, R. Chapter 1 - Next Generation Sequencing—General Information about the Technology, Possibilities, and Limitations. in *Clinical Applications for Next-Generation Sequencing* (eds. Demkow, U. & Płoski, R.) 1–18 (Academic Press, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-801739-5.00001-5.
60. Treangen, T. J. & Salzberg, S. L. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat Rev Genet* **13**, 36–46 (2012).
61. An, N., Fleming, A. M., White, H. S. & Burrows, C. J. Nanopore Detection of 8-Oxoguanine in the Human Telomere Repeat Sequence. *ACS Nano* **9**, 4296–4307 (2015).
62. Rang, F. J., Kloosterman, W. P. & de Ridder, J. From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy. *Genome Biol* **19**, 90 (2018).
63. Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y. & Au, K. F. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol* **39**, 1348–1365 (2021).
64. Hu, T., Chitnis, N., Monos, D. & Dinh, A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology* **82**, 801–811 (2021).
65. Comparison of Nanopore Sequencing Protocols and Real-Time Analysis for Phytopathogen Diagnostics | Plant Health Progress. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHP-02-20-0013-RS>.
66. Mandel, P. & Metais, P. [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *C R Seances Soc Biol Fil* **142**, 241–243 (1948).
67. Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I. & Kunkel, H. G. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* **45**, 1732–1740 (1966).
68. Shapiro, B., Chakrabarty, M., Cohn, E. M. & Leon, S. A. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* **51**, 2116–2120 (1983).

Références

69. Stroun, M., Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C. & Maurice, P. A. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* **23**, 707–712 (1987).
70. Thierry, A. R. *et al.* Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* **20**, 430–435 (2014).
71. Lo, Y. M. *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* **350**, 485–487 (1997).
72. Taylor-Phillips, S. *et al.* Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* **6**, e010002 (2016).
73. Knight, S. R., Thorne, A. & Lo Faro, M. L. Donor-specific Cell-free DNA as a Biomarker in Solid Organ Transplantation. A Systematic Review. *Transplantation* **103**, 273–283 (2019).
74. Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Gahan, P. B., Anker, P. & Stroun, M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* **35**, 347–376 (2016).
75. Henry, N. L. & Hayes, D. F. Cancer biomarkers. *Molecular Oncology* **6**, 140–146 (2012).
76. Gorin, M. A. *et al.* Circulating tumour cells as biomarkers of prostate, bladder, and kidney cancer. *Nat Rev Urol* **14**, 90–97 (2017).
77. Jeffrey, S. S. Cancer biomarker profiling with microRNAs. *Nat Biotechnol* **26**, 400–401 (2008).
78. Tai, Y.-L., Chen, K.-C., Hsieh, J.-T. & Shen, T.-L. Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Science* **109**, 2364–2374 (2018).
79. Cohen, J. D. *et al.* Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* **359**, 926–930 (2018).
80. Campos-Carrillo, A. *et al.* Circulating tumor DNA as an early cancer detection tool. *Pharmacol Ther* 107458 (2019) doi:10.1016/j.pharmthera.2019.107458.

Références

81. Sanz-Garcia, E., Zhao, E., Bratman, S. V. & Siu, L. L. Monitoring and adapting cancer treatment using circulating tumor DNA kinetics: Current research, opportunities, and challenges. *Sci Adv* **8**, eabi8618.
82. Woof, V. G., Lee, R. J., Lorigan, P. & French, D. P. Circulating tumour DNA monitoring and early treatment for relapse: views from patients with early-stage melanoma. *Br J Cancer* **126**, 1450–1456 (2022).
83. Garcia-Murillas, I. *et al.* Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med* **7**, 302ra133 (2015).
84. Nikolaou, M., Pavlopoulou, A., Georgakilas, A. G. & Kyrodimos, E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin Exp Metastasis* **35**, 309–318 (2018).
85. Oliveira, K. C. S. *et al.* Current Perspectives on Circulating Tumor DNA, Precision Medicine, and Personalized Clinical Management of Cancer. *Mol Cancer Res* **18**, 517–528 (2020).
86. Dang, D. K. & Park, B. H. Circulating tumor DNA: current challenges for clinical utility. *J Clin Invest* **132**, e154941.
87. Hu, Z., Chen, H., Long, Y., Li, P. & Gu, Y. The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **157**, 103166 (2021).
88. Nabet, B. Y. *et al.* Exosome RNA Unshielding Couples Stromal Activation to Pattern Recognition Receptor Signaling in Cancer. *Cell* **170**, 352-366.e13 (2017).
89. Zhang, H. *et al.* Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis. *Nat Commun* **8**, 15016 (2017).
90. Elazezy, M. & Joosse, S. A. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput Struct Biotechnol J* **16**, 370–378 (2018).
91. Baghban, R. *et al.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal* **18**, 59 (2020).

Références

92. Deng, J. *et al.* Cell-Free DNA Promotes Inflammation in Patients With Oral Lichen Planus via the STING Pathway. *Frontiers in Immunology* **13**, (2022).
93. Korabecna, M. *et al.* Cell-free DNA in plasma as an essential immune system regulator. *Sci Rep* **10**, 17478 (2020).
94. Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F. & Bardelli, A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* **10**, 472–484 (2013).
95. Husain, H. *et al.* Monitoring Daily Dynamics of Early Tumor Response to Targeted Therapy by Detecting Circulating Tumor DNA in Urine. *Clin Cancer Res* **23**, 4716–4723 (2017).
96. Wang, Y. *et al.* Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 9704–9709 (2015).
97. Ehrlich, M. DNA hypermethylation in disease: mechanisms and clinical relevance. *Epigenetics* **14**, 1141–1163 (2019).
98. Ehrlich, M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* **1**, 239–259 (2009).
99. Liu, P., Wang, Y. & Li, X. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **9**, 871–879 (2019).
100. Timar, J. & Kashofer, K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer Metastasis Rev* **39**, 1029–1038 (2020).
101. Besaratinia, A., Cockburn, M. & Tommasi, S. Alterations of DNA methylome in human bladder cancer. *Epigenetics* **8**, 1013–1022 (2013).
102. Lo, Y. M. D., Han, D. S. C., Jiang, P. & Chiu, R. W. K. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies. *Science* **372**, eaaw3616 (2021).
103. Liu, M. C. *et al.* Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Annals of Oncology* **31**, 745–759 (2020).
104. Snyder, M. W., Kircher, M., Hill, A. J., Daza, R. M. & Shendure, J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell* **164**, 57–68 (2016).

Références

105. Sozzi, G. *et al.* Quantification of Free Circulating DNA As a Diagnostic Marker in Lung Cancer. *JCO* **21**, 3902–3908 (2003).
106. Khier, S. & Lohan, L. Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature. *Future Science OA* **4**, FSO295 (2018).
107. Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T. & Grinshpun, A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther* **20**, 1057–1067 (2019).
108. Bettgowda, C. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* **6**, 224ra24 (2014).
109. Underhill, H. R. *et al.* Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet* **12**, (2016).
110. Mouliere, F. & Thierry, A. R. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert Opinion on Biological Therapy* **12**, S209–S215 (2012).
111. Cristiano, S. *et al.* Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature* **570**, 385–389 (2019).
112. Chan, K. C. A. *et al.* Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* **50**, 88–92 (2004).
113. Liu, Y. *et al.* Increased detection of circulating tumor DNA by short fragment enrichment. *Translational Lung Cancer Research* **10**, (2021).
114. Ding, S. C. & Lo, Y. M. D. Cell-Free DNA Fragmentomics in Liquid Biopsy. *Diagnostics (Basel)* **12**, 978 (2022).
115. Tan, G., Opitz, L., Schlapbach, R. & Rehrauer, H. Long fragments achieve lower base quality in Illumina paired-end sequencing. *Sci Rep* **9**, 2856 (2019).
116. Kumar, P. *et al.* Normal and Cancerous Tissues Release Extrachromosomal Circular DNA (eccDNA) into the Circulation. *Mol Cancer Res* **15**, 1197–1205 (2017).
117. Mouliere, F. *et al.* Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med* **10**, eaat4921 (2018).

Références

118. Chen, M. & Zhao, H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics* **13**, 34 (2019).
119. Gao, M. *et al.* Next Generation-Targeted Amplicon Sequencing (NG-TAS): an optimised protocol and computational pipeline for cost-effective profiling of circulating tumour DNA. *Genome Medicine* **11**, 1 (2019).
120. Li, Y. & Tollefsbol, T. O. DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Mol Biol* **791**, 11–21 (2011).
121. He, Z. *et al.* Based on magnetic beads to develop the kit for extraction of high-quality cell-free DNA from blood of breast cancer patients. *Materials Express* **9**, 956–961 (2019).
122. Jen, J., Wu, L. & Sidransky, D. An Overview on the Isolation and Analysis of Circulating Tumor DNA in Plasma and Serum. *Annals of the New York Academy of Sciences* **906**, 8–12 (2000).
123. Kopecká, J., Matoulková, D., Němec, M., Jelínková, M. & Felsberg, J. Comparison of DNA Extraction Methods in Terms of Yield, Purity, Long-Term Storage, and Downstream Manipulation with Brewer's Yeast Chromosomal DNA. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **72**, 1–5 (2014).
124. Pérez-Barríos, C. *et al.* Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl Lung Cancer Res* **5**, 665–672 (2016).
125. Yuan, H. *et al.* A modified extraction method of circulating free DNA for epidermal growth factor receptor mutation analysis. *Yonsei Med J* **53**, 132–137 (2012).
126. Warton, K., Graham, L.-J., Yuwono, N. & Samimi, G. Comparison of 4 commercial kits for the extraction of circulating DNA from plasma. *Cancer Genet* **228–229**, 143–150 (2018).
127. Verdier, C. Cours de rhéologie, Université Grenoble Alpes. at <https://www-liphy.univ-grenoble-alpes.fr/pagesperso/verdier/>.

Références

128. Oldroyd, J. G. Non-Newtonian effects in steady motion of some idealized elastico-viscous liquids. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* (1958) doi:10.1098/rspa.1958.0083.
129. Bird, R. B. & Wiest, J. M. Constitutive Equations for Polymeric Liquids. *Annual Review of Fluid Mechanics* **27**, 169–193 (1995).
130. Macosko, C. W. *Rheology: Principles, Measurements, and Applications*. (Wiley-VCH, 1996).
131. Giesekus, H. A simple constitutive equation for polymer fluids based on the concept of deformation-dependent tensorial mobility. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* **11**, 69–109 (1982).
132. Ho, B. P. & Leal, L. G. Migration of rigid spheres in a two-dimensional unidirectional shear flow of a second-order fluid. *Journal of Fluid Mechanics* **76**, 783–799 (1976).
133. Leshansky, A. M., Bransky, A., Korin, N. & Dinnar, U. Tunable Nonlinear Viscoelastic “Focusing” in a Microfluidic Device. *Phys. Rev. Lett.* **98**, 234501 (2007).
134. Graham, M. D. Fluid Dynamics of Dissolved Polymer Molecules in Confined Geometries. *Annu. Rev. Fluid Mech.* **43**, 273–298 (2011).
135. Perkins, T. T., Smith, D. E. & Chu, S. Single polymer dynamics in an elongational flow. *Science* **276**, 2016–2021 (1997).
136. Smith, null & Chu, null. Response of flexible polymers to a sudden elongational flow. *Science* **281**, 1335–1340 (1998).
137. Teixeira, R. E., Babcock, H. P., Shaqfeh, E. S. G. & Chu, S. Shear Thinning and Tumbling Dynamics of Single Polymers in the Flow-Gradient Plane. *Macromolecules* **38**, 581–592 (2005).
138. Usta, O. B., Butler, J. E. & Ladd, A. J. C. Transverse Migration of a Confined Polymer Driven by an External Force. *Phys. Rev. Lett.* **98**, 098301 (2007).
139. Fang, L., Hu, H. & Larson, R. G. DNA configurations and concentration in shearing flow near a glass surface in a microchannel. *Journal of Rheology* **49**, 127–138 (2005).

Références

140. Jendrejack, R. M., Schwartz, D. C., de Pablo, J. J. & Graham, M. D. Shear-induced migration in flowing polymer solutions: simulation of long-chain DNA in microchannels [corrected]. *J Chem Phys* **120**, 2513–2529 (2004).
141. Serhatlioglu, M., Isiksacan, Z., Özkan, M., Tuncel, D. & Elbuken, C. Electro-Viscoelastic Migration under Simultaneously Applied Microfluidic Pressure-Driven Flow and Electric Field. *Anal. Chem.* **92**, 6932–6940 (2020).
142. Zheng, J. & Yeung, E. S. Anomalous Radial Migration of Single DNA Molecules in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **74**, 4536–4547 (2002).
143. Arca, M., Butler, J. E. & Ladd, A. J. C. Transverse migration of polyelectrolytes in microfluidic channels induced by combined shear and electric fields. *Soft Matter* **11**, 4375–4382 (2015).
144. Arca, M., Ladd, A. J. C. & Butler, J. E. Electro-hydrodynamic concentration of genomic length DNA. *Soft Matter* **12**, 6975–6984 (2016).
145. Montes, R. J., Butler, J. E. & Ladd, A. J. C. Trapping DNA with a high throughput microfluidic device. *ELECTROPHORESIS* **40**, 437–446 (2019).
146. Socol, M. *et al.* Contraction and Tumbling Dynamics of DNA in Shear Flows under Confinement Induced by Transverse Viscoelastic Forces. *Macromolecules* **52**, 1843–1852 (2019).
147. Chami, B., Socol, M., Manghi, M. & Bancaud, A. Modeling of DNA transport in viscoelastic electro-hydrodynamic flows for enhanced size separation. *Soft Matter* **14**, 5069–5079 (2018).
148. Chami, B. Development of a Lab-on-Chip Technology (μ LAS) for the Analysis of Nucleic Acids: Modeling and Optimization. (Université de Toulouse, 2019).
149. Tijunelyte, I. *et al.* Hybridization-based DNA biosensing with a limit of detection of 4 fM in 30 s using an electrohydrodynamic concentration module fabricated by grayscale lithography. *Biomicrofluidics* **16**, 044111 (2022).
150. Malbec, R. *et al.* μ LAS: Sizing of expanded trinucleotide repeats with femtomolar sensitivity in less than 5 minutes. *Sci Rep* **9**, 23 (2019).

Références

151. Tijunelyte, I. *et al.* micro-RNA 21 detection with a limit of 2 pM in 1 min using a size-accordable concentration module operated by electrohydrodynamic actuation. *Biosensors and Bioelectronics* **178**, 112992 (2021).
152. Baker, M. B., Bao, G. & Searles, C. D. In vitro quantification of specific microRNA using molecular beacons. *Nucleic Acids Research* **40**, e13 (2012).
153. Andriamanampisoa, C.-L. *et al.* BIABooster: Online DNA Concentration and Size Profiling with a Limit of Detection of 10 fg/ μ L and Application to High-Sensitivity Characterization of Circulating Cell-Free DNA. *Anal. Chem.* **90**, 3766–3774 (2018).
154. Milon, N. *et al.* A tunable filter for high molecular weight DNA selection and linked-read sequencing. *Lab Chip* **20**, 175–184 (2019).
155. Milon, N. *et al.* μ LAS technology for DNA isolation coupled to Cas9-assisted targeting for sequencing and assembly of a 30 kb region in plant genome. *Nucleic Acids Res* **47**, 8050–8060 (2019).
156. Track-etched membrane filters - manufacturing and worldwide supply. *it4ip*
<https://www.it4ip.eu/>.
157. Legras, R. & Jongen, Y. Realisation De Perforations Dans Un Matériau Solide En Feuille Par Bombardement De Particules. (1991).
158. Thakar, C. M. *et al.* 3d Printing: Basic principles and applications. *Materials Today: Proceedings* (2021) doi:10.1016/j.matpr.2021.06.272.
159. Singamneni, S. *et al.* Additive Manufacturing for the Aircraft Industry: A Review. *Research Article1J Aeronaut Aerospace Eng* **08**, (2019).
160. Kim, G. B. *et al.* Three-Dimensional Printing: Basic Principles and Applications in Medicine and Radiology. *Korean J Radiol* **17**, 182–197 (2016).
161. Vanderploeg, A., Lee, S.-E. & Mamp, M. The application of 3D printing technology in the fashion industry. *International Journal of Fashion Design, Technology and Education* **10**, 170–179 (2017).

Références

162. Hull, C. W. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. (1986).
163. Ngo, T. D., Kashani, A., Imbalzano, G., Nguyen, K. T. Q. & Hui, D. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B: Engineering* **143**, 172–196 (2018).
164. Lu, Y., Mapili, G., Suhali, G., Chen, S. & Roy, K. A digital micro-mirror device-based system for the microfabrication of complex, spatially patterned tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **77A**, 396–405 (2006).
165. Zhang, J., Hu, Q., Wang, S., Tao, J. & Gou, M. Digital Light Processing Based Three-dimensional Printing for Medical Applications. *Int J Bioprint* **6**, 242 (2019).
166. Quan, H. *et al.* Photo-curing 3D printing technique and its challenges. *Bioactive Materials* **5**, 110–115 (2020).
167. Mwema, F. M. & Akinlabi, E. T. Basics of Fused Deposition Modelling (FDM). in *Fused Deposition Modeling: Strategies for Quality Enhancement* (eds. Mwema, F. M. & Akinlabi, E. T.) 1–15 (Springer International Publishing, 2020). doi:10.1007/978-3-030-48259-6_1.
168. *Encyclopedia of Electrochemistry*. (Wiley-VCH, 2007).
169. Feynman, R. The Feynman Lectures on Physics Vol II Electromagnetism and Matter.
170. Rapp, B. E. *Microfluidics: Modeling, Mechanics and Mathematics* - 1st Edition.
<https://www.elsevier.com/books/microfluidics-modeling-mechanics-and-mathematics/rapp/978-1-4557-3141-1> (2016).
171. Zoulias, E., Varkaraki, E., Lymberopoulos, N., Christodoulou, C. N. & Karagiorgis, G. N. A REVIEW ON WATER ELECTROLYSIS.
172. World of biology. Le chargement et La migration d'ADN sur gel d'agarose - YouTube.
<https://youtu.be/2Z2bAN8nCI8?t=190>.

Références

173. Saias, L., Autebert, J., Malaquin, L. & Viovy, J.-L. Design, modeling and characterization of microfluidic architectures for high flow rate, small footprint microfluidic systems. *Lab Chip* **11**, 822–832 (2011).
174. Teillet-Deborde, J. Intégration et optimisation de procédés de séparation d'ADN. (2020).
175. Van den Broeck, C. Taylor dispersion revisited. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **168**, 677–696 (1990).
176. Zwanzig, R. *Hydrodynamic fluctuations and Stokes' law friction*. (National Bureau of Standards, 1964).
177. Ray, T., Weaden, J. & Dyson, P. Tris-dependent site-specific cleavage of *Streptomyces lividans* DNA. *FEMS Microbiology Letters* **96**, 247–252 (1992).
178. Ray, T., Mills, A. & Dyson, P. Tris-dependent oxidative DNA strand scission during electrophoresis. *Electrophoresis* **16**, 888–894 (1995).
179. Liesegang, A. & Tschäpe, H. Short Communication - Modified pulsed-field gel electrophoresis method for DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains. *International Journal of Medical Microbiology* **291**, 645–648 (2002).
180. An, R. *et al.* Non-Enzymatic Depurination of Nucleic Acids: Factors and Mechanisms. *PLOS ONE* **9**, e115950 (2014).
181. Suzuki, T., Ohsumi, S. & Makino, K. Mechanistic studies on depurination and apurinic site chain breakage in oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Research* **22**, 4997–5003 (1994).
182. Abe, Y. S. & Sasaki, S. DNA cleavage at the AP site via β -elimination mediated by the AP site-binding ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **24**, 910–914 (2016).
183. Morani, M., Taverna, M. & Mai, T. D. A fresh look into background electrolyte selection for capillary electrophoresis-laser induced fluorescence of peptides and proteins. *ELECTROPHORESIS* **40**, 2618–2624 (2019).
184. Qiao, Y., Ma, Z., Onyango, C., Cheng, X. & Dorfman, K. D. DNA fragmentation in a steady shear flow. *Biomicrofluidics* **16**, 054109 (2022).

Références

185. Klingström, T., Bongcam-Rudloff, E. & Pettersson, O. V. *A comprehensive model of DNA fragmentation for the preservation of High Molecular Weight DNA*. 254276
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/254276v3> (2018) doi:10.1101/254276.
186. Lund, R. D. Analyzing the Effect of Pipette Tip Geometries on Fluid Velocity and Shear Strain Rate | SelectScience. <https://www.selectscience.net/application-articles/analyzing-the-effect-of-pipette-tip-geometries-on-fluid-velocity-and-shear-strain-rate/?artid=46318> (2018).
187. Wang, R. E., Tian, L. & Chang, Y.-H. A Homogeneous Fluorescent Sensor for Human Serum Albumin. *J Pharm Biomed Anal* **63**, 165–169 (2012).
188. Bowen, W. R., Calvo, J. I. & Hernández, A. Steps of membrane blocking in flux decline during protein microfiltration. *Journal of Membrane Science* **101**, 153–165 (1995).
189. Saravanan, K. A. *et al.* Role of genomics in combating COVID-19 pandemic. *Gene* **823**, 146387 (2022).
190. Lu, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet* **395**, 565–574 (2020).
191. Wu, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265–269 (2020).
192. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H. & Thiel, V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* **19**, 155–170 (2021).
193. Miller, K. N. *et al.* Cytoplasmic DNA: sources, sensing, and role in aging and disease. *Cell* **184**, 5506–5526 (2021).
194. Paabo, M. & Bates, R. C. Dissociation constant of protonated 2,2-bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol (bis-tris) and related thermodynamic functions from 0 to 50.deg. *J. Phys. Chem.* **74**, 702–705 (1970).

Table des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 - Représentation de la structure d'une molécule d'ADN | 4 |
| Figure 2 - Schéma de principe de séparation par gradient CsCl..... | 6 |
| Figure 3 - Processus d'extraction d'ADN par technique Phénol-chloroforme. | 6 |
| Figure 4 - Processus d'extraction par phase solide-liquide sur billes magnétiques..... | 7 |
| Figure 5 - Représentation de l'ADN en solution libre..... | 10 |
| Figure 6 – Illustration du phénomène de reptation de l'ADN lors d'une électrophorèse sur gel, Image d'un résultat de migration d'un 100 bp ladder sur gel d'agarose..... | 12 |
| Figure 7 - Principe de fonctionnement de la technologie Pippin..... | 13 |
| Figure 8 - Electrophérogramme en fonction de la taille, pour des échantillons d'ADN purifiés avec différents ratios volume de billes SPRIselect / volume d'échantillon..... | 14 |
| Figure 9 - Illustration de la sélection en taille par variation de la force ionique lors de l'adsorption d'ADN sur surface de Lysine-SiO ₂ | 15 |
| Figure 10 - Coût du séquençage (\$) par mégabase depuis 2001 | 17 |
| Figure 11 - Principe de fonctionnement du séquençage de 1ère génération (Sanger) | 18 |
| Figure 12 - Principe de fonctionnement du séquençage de 2ème génération (NGS Illumina)..... | 19 |
| Figure 13 – Principe de fonctionnement du séquençage de 3 ^{ème} génération Nanopore | 20 |
| Figure 14 - Amélioration des séquençages ONT au cours du temps..... | 21 |
| Figure 15 - Nombre de publications par an faisant référence à l'ADN circulant dans l'étude de cancers entre 1995 et 2017 | 23 |
| Figure 16 – Charge tumorale dans les différentes phases de développement d'un cancer | 24 |
| Figure 17 – Répartition en taille de l'ADN circulant en fonction de son origine. Schéma représentatif des nucléosomes..... | 26 |
| Figure 18 - Principe de la technologie μ LAS..... | 30 |
| Figure 19 - Schéma de cisaillement simple.. | 31 |
| Figure 20 – Résultats expérimentaux de la distribution de billes dans un canal sous actionnement hydrodynamique dans un fluide Newtonien ou viscoélastique..... | 34 |
| Figure 21 - Comportement de l'ADN dans un microcanal, dans un régime co-courant et un régime contre-courant | 35 |
| Figure 22 - Illustration de la migration d'un polyélectrolyte par la combinaison d'un cisaillement et d'un champ électrique dans un fluide Newtonien..... | 36 |
| Figure 23 –Principe de la technologie μ LAS sur puce microfluidique. | 38 |
| Figure 24 – Diagramme de phase des paramètres d'actionnement..... | 39 |
| Figure 25 - Principe de concentration d'ADN dans un système capillaire BIABooster | 40 |
| Figure 26 – Analyse BIABooster d'un 1kb extend ladder d'ADN..... | 41 |
| Figure 27 - Principe de fractionnement en taille sur système capillaire..... | 43 |
| Figure 28 - fractionnement en taille sur monocapillaire d'un 1 kb ladder extend. Chromatogramme obtenu sur analyse BIABooster. (tiré de Milon et al. 2019 ¹⁵⁴) | 44 |
| Figure 29 - Saturation du système BIABooster..... | 45 |
| Figure 30- Procédé de fabrication de membrane isopore | 48 |
| Figure 31 - Schéma de fonctionnement d'une imprimante 3D par stéréolithographie inversée..... | 49 |

Table des figures

| | |
|---|----|
| Figure 32- Représentation 3D d'une opération de soustraction sur FreeCAD..... | 50 |
| Figure 33 – Images à la loupe binoculaire de la corrosion des grilles en nickel..... | 52 |
| Figure 34 - Image en loupe binoculaire d'une électrode en Platine | 52 |
| Figure 35 - Dispositif fluïdique μ LAP | 54 |
| Figure 36 - Montage classique d'expérience..... | 55 |
| Figure 37 - Puce par xurographie | 56 |
| Figure 38 - Modèle résistif équivalent du dispositif..... | 58 |
| Figure 39 - Représentation des surfaces équipotentielles au-dessus d'une grille chargée | 59 |
| Figure 40 – photo de bulles d' H_2 produites sur une cathode en Nickel..... | 66 |
| Figure 41 – Comportement du courant sous la présence de bulles | 66 |
| Figure 42 - Modèle électrique du dispositif avec présence de bulles d' H_2 | 67 |
| Figure 43 – Electroampérométrie lors de l'application d'échelons de tensions et Caractéristique courant-tension du système avec des électrodes Pt ou Ni. | 68 |
| Figure 44 - Modèle électrique simplifié du système prenant en compte la capacité | 69 |
| Figure 45 - Schéma de l'augmentation de la température par échauffement dans les différents éléments de volume. | 71 |
| Figure 46 - Mesures de viscosité et résistivité d'une solution de PVP 5% BPTe 1x en fonction de la température. | 71 |
| Figure 47 - Suivi de courant et de température suite à l'échauffement dans un dispositif sous tension et sans refroidissement..... | 72 |
| Figure 48 - Photographies du dispositif 3D avec mise en valeur des canaux de refroidissement | 72 |
| Figure 49 - Suivi de courant et de température suite à l'échauffement dans un dispositif avec et sans refroidissement | 73 |
| Figure 50 - Simulation COMSOL représentant le gradient de température dans le dispositif | 74 |
| Figure 51 - Simulation COMSOL de la vitesse hydrodynamique avec ou sans structure fractale en entrée de dispositif..... | 75 |
| Figure 52 – Structure fractale..... | 76 |
| Figure 53 – Ancien dispositif horizontal avec évacuation de bulles à la cathode. | 78 |
| Figure 54 - Schéma récapitulatif des influences des paramètres expérimentaux sur le système lors de l'application d'un champ électrique..... | 79 |
| Figure 55 – Procédé de concentration en flux continu | 82 |
| Figure 56 - Procédé de concentration avec rinçage..... | 83 |
| Figure 57 - Procédure de prélèvement classique pour l'analyse de concentration d'ADN au Qubit ... | 84 |
| Figure 58 - Profil de concentration d'ADN comparatif entre une injection en flux continu et avec rinçage. | 84 |
| Figure 59 – Profil de masse d'ADN cumulée en fonction du volume pour des expériences de concentration | 85 |
| Figure 60 - Schéma explicatif de la dispersion de Taylor | 86 |
| Figure 61 - comparaison des résultats de concentration d'ADN λ entre deux dispositifs à différents volumes de sortie | 87 |
| Figure 62 – Observation de la concentration d'ADN sur puce xurographique | 88 |
| Figure 63 - Schéma de la trajectoire de l'ADN à travers le pore | 89 |
| Figure 64 – Modèle de fuite en fonction des paramètres du système | 92 |
| Figure 65 - Représentation des échantillons analysés sur BIABooster à partir d'un profil de concentration obtenu au Qubit..... | 93 |

Table des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 66 – Exemple de résultats d’analyse en taille et concentration d’échantillons sur technologie BIABooster..... | 94 |
| Figure 67 - Résultats de variation du cut-off en fonction du champ électrique appliqué. | 95 |
| Figure 68 - Caractérisation de la perte dans une expérience de concentration d'ADN avec rinçage... .. | 96 |
| Figure 69 – Comparaison de l’évolution des pertes avec et sans DTT | 98 |
| Figure 70 - Etude des pertes pour des solutions d’ADN 500 bp avec tampons HAE ou BPE à différentes concentrations (0,05x ; 0,1x ; 0,5x ; 1x)..... | 99 |
| Figure 71 - Récapitulatif des différents tampons..... | 100 |
| Figure 72 - Comparaison des électrodes à maille courte (500 μ m) et maille large (1 mm)..... | 101 |
| Figure 73 – Profils de concentration en fonction de la maille d’électrode | 101 |
| Figure 74 - Contournement d’électrode par grille à piliers..... | 102 |
| Figure 75 – Etude de l’intégrité d’une bande unique d’ADN (500 bp) sous l’action d’un champ électrique dans le système μ LAP en fonction de la nature et de la quantité de tampon..... | 103 |
| Figure 76 - Concentration d'ADN λ avec différentes tensions | 106 |
| Figure 77 - Phénomène d'agrégation d'ADN λ observé au microscope..... | 106 |
| Figure 78 - Concentration d’ADN T4 avec rinçage de solution. | 106 |
| Figure 79 – Analyses de profils en taille par BIABooster d’échantillons d’ADN λ et T4 à différentes étapes de l’expérience | 107 |
| Figure 80 - Comparaison de concentrations de bandes uniques : 100, 200 et 500 bp..... | 109 |
| Figure 81 - Comparaison des profils en taille et concentration de ladders de petites tailles (100 ; 150 ; 200 ; 500 bp) sur BIABooster avec un temps de concentration de 2 ou 4 min..... | 110 |
| Figure 82 - Synthèse des pistes d'amélioration des performances d'expériences de concentration. | 111 |
| Figure 83 - Résultats de concentration d'ADN avec trois solutions salées de concentrations différentes..... | 114 |
| Figure 84 - purification des sels d'une solution d'ADN | 115 |
| Figure 85 – Observation du bouchage des pores par les protéines (MEB) | 117 |
| Figure 86 - Schémas des mécanismes d'encrassement" d'une membrane poreuse | 117 |
| Figure 87 - Profil en taille de l'échantillon de GeT-PlaGe..... | 119 |
| Figure 88 - Schéma temporel de protocole d'expérience de sélection en taille (encadrement)..... | 120 |
| Figure 89 - Protocole de sélection en taille en deux étapes.. .. | 120 |
| Figure 90 - Résultats des deux étapes d'expérience | 121 |
| Figure 91 - Comparaison des profils de taille de l'échantillon initial, l'échantillon purifié par notre système μ LAP et un échantillon typique sélectionné par purification par billes magnétiques..... | 122 |
| Figure 92 - Résultat de fractionnement en taille sur ladder. | 123 |
| Figure 93 – Perspective d’agrandissement du volume anode- membrane | 125 |
| Figure 94 – Protocole de sélection en taille en une seule étape | 126 |
| Figure 95 – Image complète de la face avant du programme LabVIEW | 151 |
| Figure 96 - Détail de l'interface manuelle du programme LabVIEW..... | 152 |
| Figure 97 - Détail de l'interface automatique du programme LabVIEW..... | 153 |
| Figure 98 - Représentations chimiques du Bis-Tris et du PIPES et leurs conjugués..... | 154 |
| Figure 99 - Calcul du pH à 1 mA par tableau d’avancement | 155 |
| Figure 100 - Calcul du pH à 10 mA par tableau d’avancement | 155 |
| Figure 101 - Dispositif vertical haut-bas..... | 156 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1- Tableau récapitulatif de différentes méthodes d'extraction | 9 |
| Tableau 2 - Récapitulatif et comparaison de quelques techniques de sélection en taille | 16 |
| Tableau 3 – Récapitulatif des méthodes les plus communes d'extraction de cfDNA | 27 |
| Tableau 4 – Cahier des charges de préparation pour 3 applications cibles | 28 |
| Tableau 5 - Spécifications des kits commerciaux d'analyse d'ADN sur technologie BIABooster | 41 |
| Tableau 6 - Caractéristiques électriques des membranes 2-123 10^5 et 5-46 10^5 | 61 |
| Tableau 7 - Caractéristiques hydrodynamiques des membranes 2-123 10^5 et 5-46 10^5 | 62 |
| Tableau 8 - Calcul du nombre de Reynolds dans un pore et dans le volume électrode-membrane | 63 |
| Tableau 9 – Récapitulatif de différents modes d'écoulement en fonction du design | 77 |

Annexes

| | | |
|----------|--|-----|
| Annexe A | Face avant du programme LabVIEW de contrôle d'expérience | 151 |
| Annexe B | Estimation de la variation du pH par l'électrolyse de l'eau | 154 |
| Annexe C | Dispositif vertical de 1 ^{ère} génération | 156 |
| Annexe D | Plans des éléments de μ LAP (dernière version) | 157 |
| Annexe E | Séquences d'analyse BIABooster et calcul précis de rendement | 159 |

Annexe A Face avant du programme LabVIEW de contrôle d'expérience

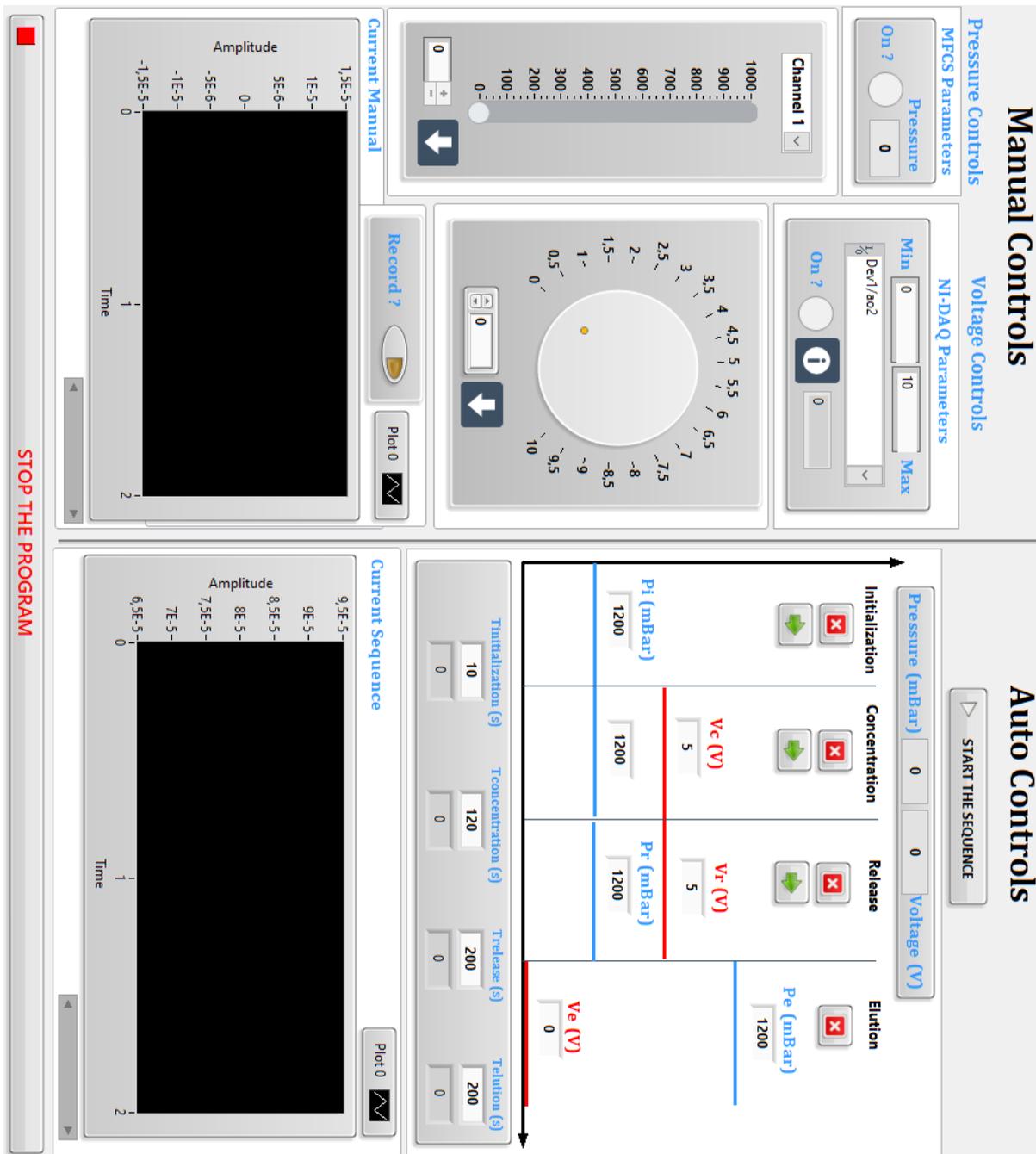


Figure 95 - Image complète de la face avant de l'interface LabVIEW de contrôle de la tension et de la pression appliquées au système. D'une part les contrôles peuvent être manuels, d'autres part le procédé peut être automatisé. Le suivi de courant est affiché en direct sur l'interface, et le courant et la tension sont enregistrés dans un fichier .txt d'export.

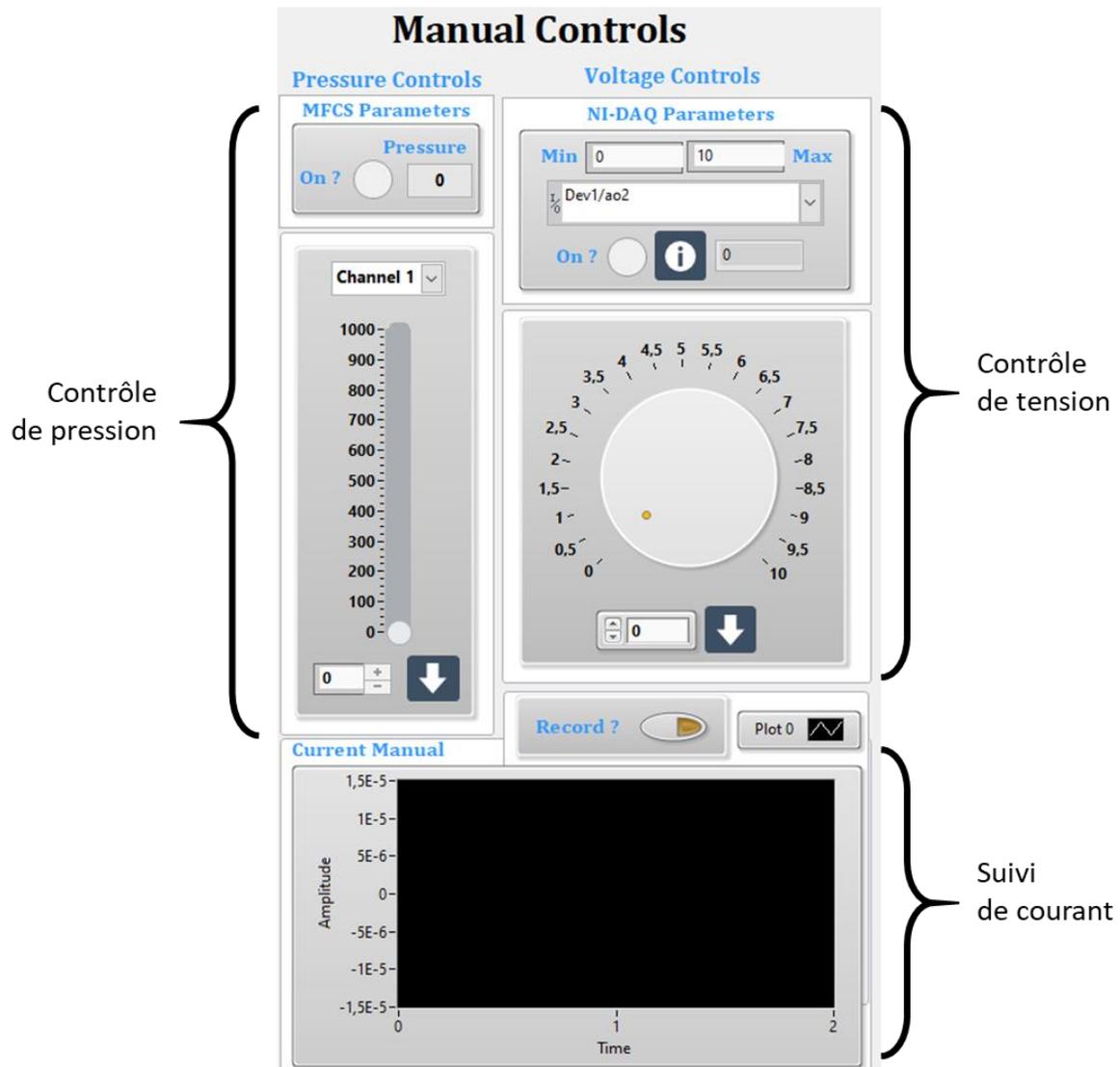
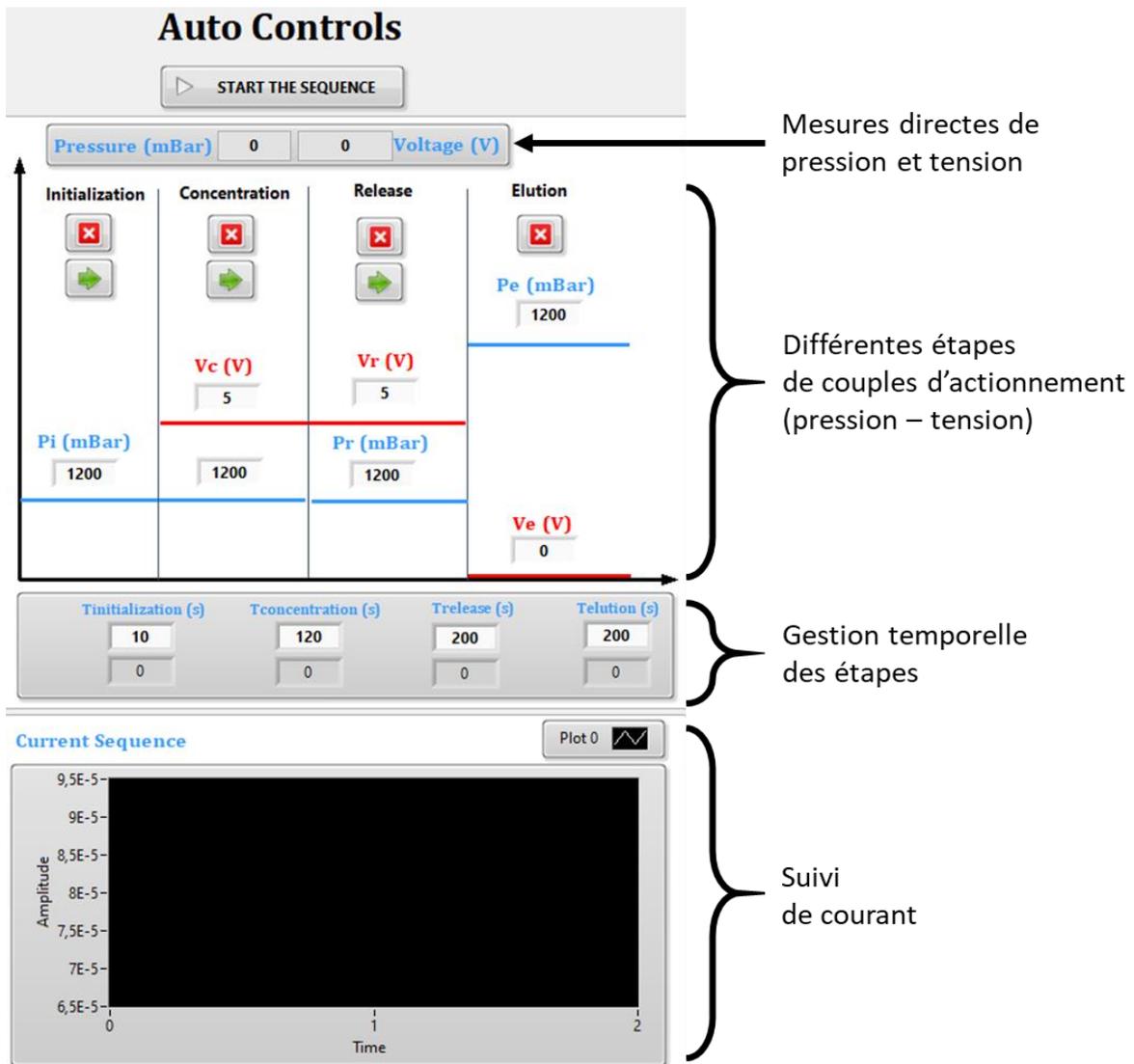


Figure 96 - Détail de l'interface manuelle du programme LabVIEW. La pression et la tension peuvent être variés en direct.



Mesures directes de pression et tension

Différentes étapes de couples d'actionnement (pression – tension)

Gestion temporelle des étapes

Suivi de courant

Figure 97 - Détail de l'interface automatique du programme LabVIEW. Une séquence permet de paramétrer les étapes successives d'actionnement avec un temps donné.

Annexe B Estimation de la variation du pH par l'électrolyse de l'eau

Dans cette annexe, nous étudions la variation du pH dans notre système dans le cas de deux courants appliqués, 1 mA et 10 mA. Nous verrons comment le pouvoir tampon d'une solution de BPTE 1x est suffisant pour un courant d'1 mA alors que ce n'est plus le cas à 10 mA.

Considérons un tampon BPTE 1x à un pH de 6,5. Les concentrations respectives de Bis-Tris et Pipes sont 30 mM et 10 mM. Les pKa respectifs du Bis-Tris et du Pipes sont 6,46 et 6,76. Autour de ces pKa, les espèces se trouvent sous les formes illustrées Figure 98. L'acide conjugué du Bis-Tris ($C_8H_{19}NO_5$) est sa forme protonée ($C_8H_{19}NO_5-H^+$)¹⁹⁴. La base conjuguée du PIPES ($C_8H_{18}N_2O_6S_2$) cède deux protons ($C_8H_{16}N_2O_6S_2^{2-}$).

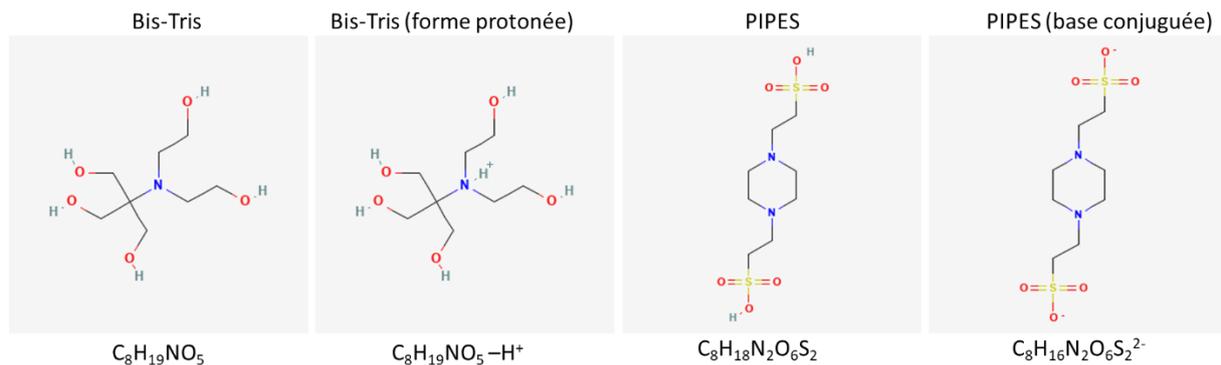


Figure 98 - Représentations chimiques du Bis-Tris et du PIPES ainsi que leurs conjugués à un pH de 6,5. (Source : PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

On va étudier la quantité de chaque composant à partir d'un calcul du flux de composants à l'anode ($\mu\text{mol}/\text{min}$), en considérant un débit de solution tampon BPTE à $300 \mu\text{L}/\text{min}$. La quantité de protons générée à l'anode est définie par le courant.

Etant donné la formule de l'oxydation à l'anode, $2H_2O \rightarrow 4H_{aq}^+ + 4e^- + O_{2,gaz}$, la quantité de protons est équivalente à la quantité d'électrons. On relie ainsi le flux de protons produits par seconde n_{H^+} et le flux d'électrons produite par seconde n_{e^-} , au courant électrique I par :

$$n_{H^+} = n_{e^-} = \frac{I}{F} \quad (87)$$

avec F la constante de Faraday.

Pour un courant de 1 mA, $n_{H^+} = 0,6 \mu\text{mol}/\text{min}$; un courant de 10 mA, $n_{H^+} = 6 \mu\text{mol}/\text{min}$

Les concentrations des formes bases et acides du Pipes et du Bis-Tris sont déduite du pH de la solution à l'état initial (6,5) et les pKa respectifs, par la formule :

$$10^{pH-pKa} = \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (88)$$

avec $[A^-]$ la concentration en base et $[AH]$ la concentration en acide.

Les avancements des expériences sont présentés Figure 99 (1 mA) et Figure 100 (10 mA). Ces calculs sont réalisés selon la règle dite du « gamma » : L'acide le plus fort (ici H_3O^+ en excès) réagit avec la base la plus forte, puis les quantités sont calculées jusqu'à équilibre. On déduit finalement le pH par :

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (89)$$

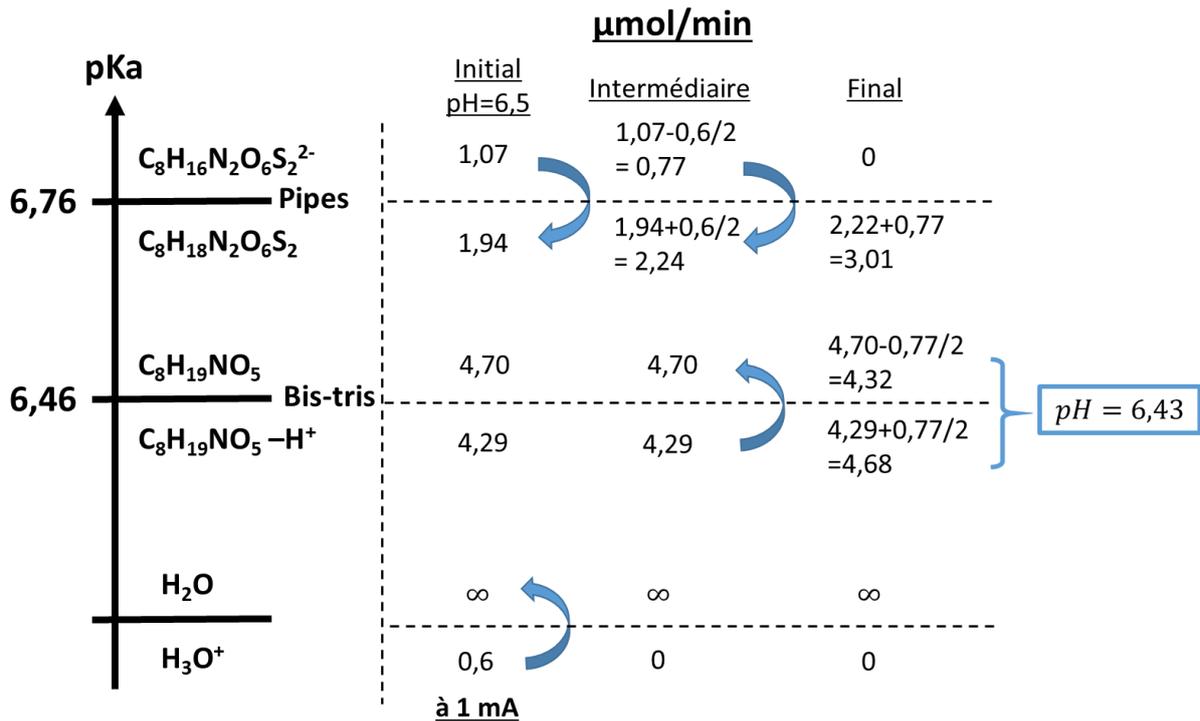


Figure 99 - Calcul du pH à 1 mA par tableau d'avancement.

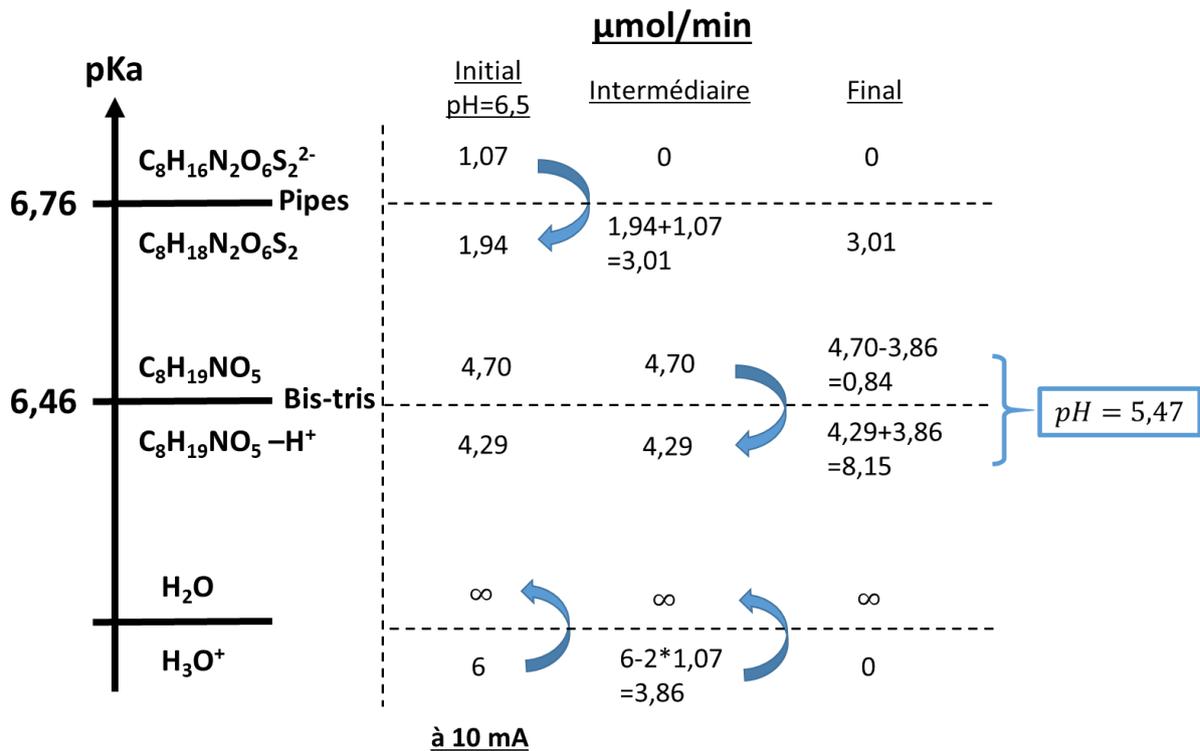


Figure 100 - Calcul du pH à 10 mA par tableau d'avancement.

Annexe C Dispositif vertical de 1^{ère} génération

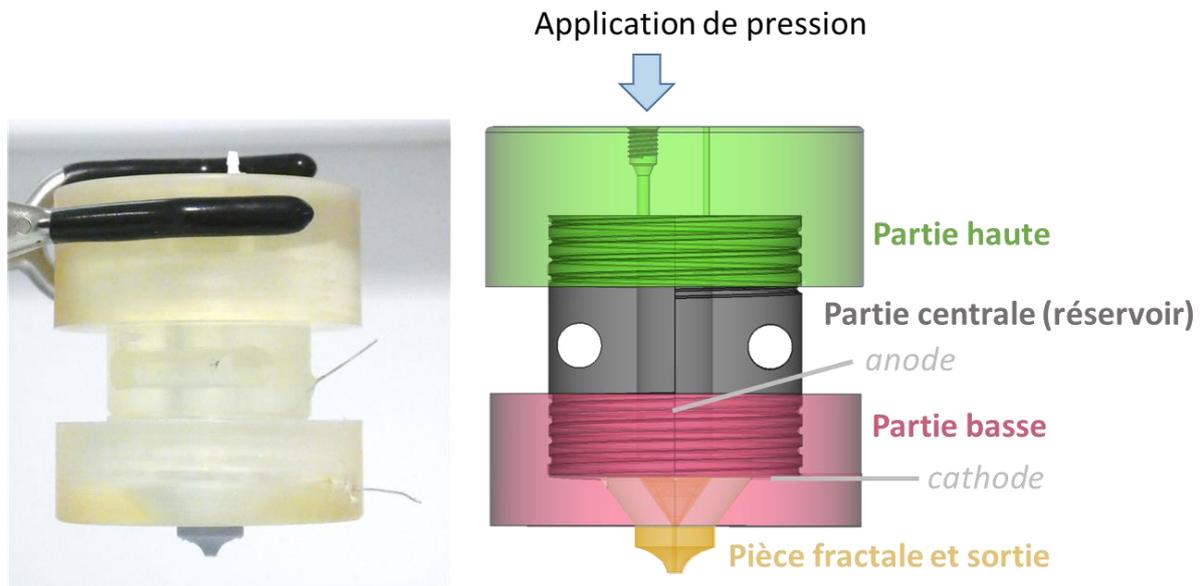
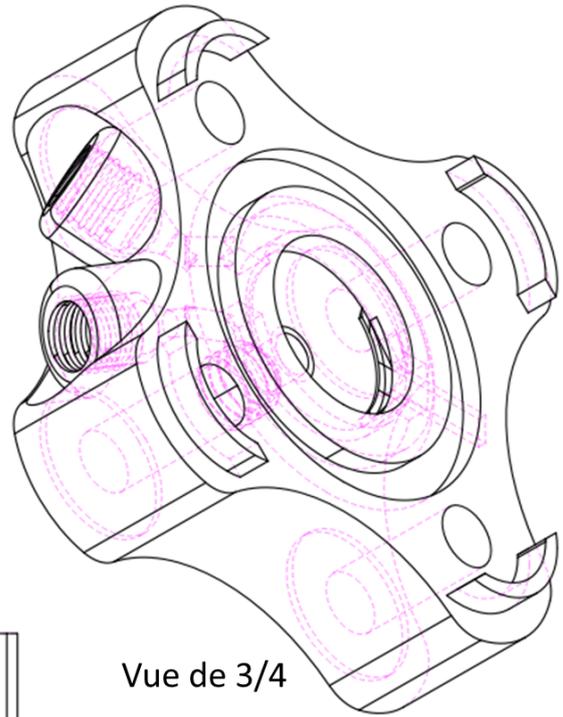


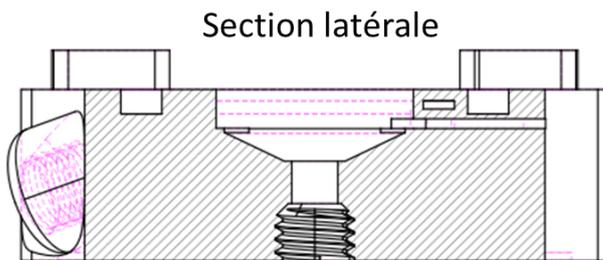
Figure 101 - Dispositif vertical haut-bas - Les différentes parties du dispositif sont vissées entre elles. La solution est préalablement placée dans le réservoir : il n'y a pas d'injection par tubes externes, après serrage de la partie supérieure, la pression est appliquée par un contrôleur de pression.

Annexe D Plans des éléments de μ LAP (dernière version)

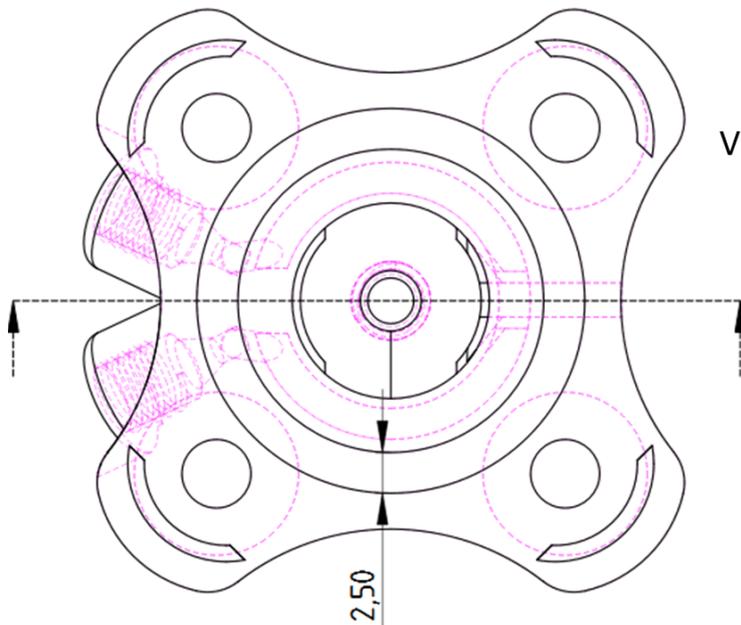
Partie anode



Vue de 3/4



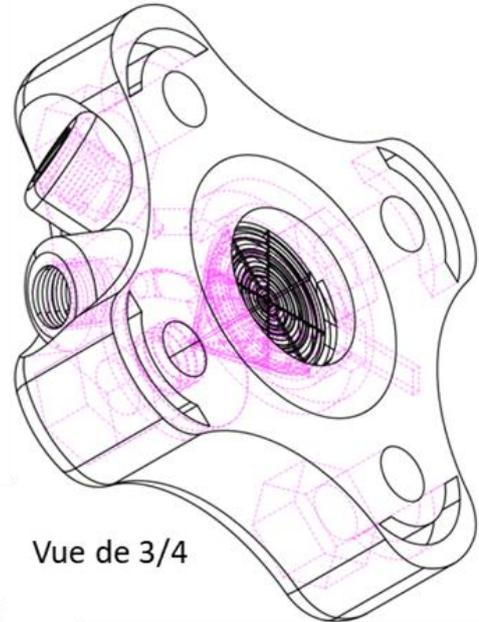
Section latérale



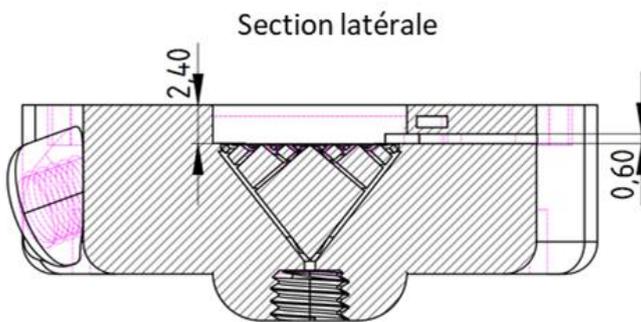
Vue de face

2,50

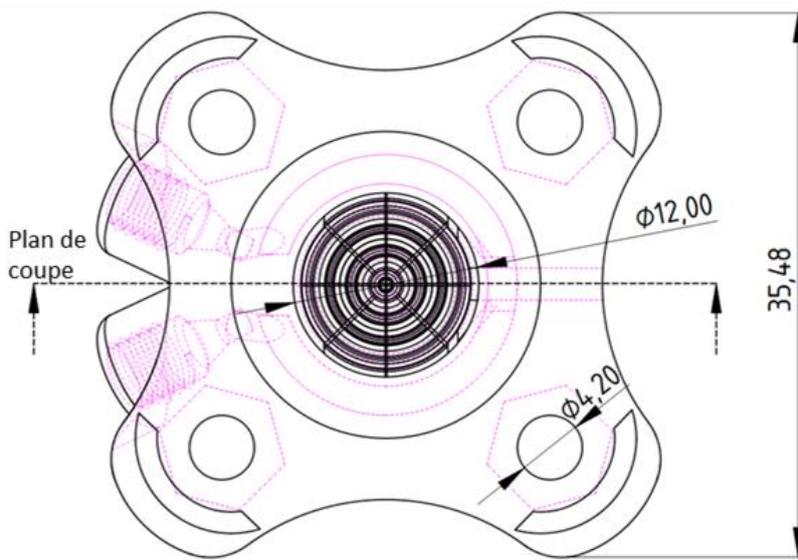
Partie cathode



Vue de 3/4



Section latérale



Plan de coupe

vue de face

Annexe E Séquences d'analyse BIABooster et calcul précis de rendement

Nos séquences d'analyse sur système BIABooster débutent toujours par une étape de lavage. Ensuite 6 analyses d'échantillons peuvent être effectuées avant un nouveau lavage, l'ensemble de ces 6 analyses est appelé série. En environ une nuit, un maximum de 3 séries de 6 échantillons peut être analysé. Dans le but de vérifier le bon déroulé des analyses et la non dégradation du capillaire, l'analyse de l'échantillon de référence est effectuée en 1^{er} et en dernier d'une série. La comparaison de ces analyses que nous appellerons « réf début » et « réf fin » rend compte de la reproductibilité de l'analyse.

Il est possible que l'analyse se dégrade au fur et à mesure de la série : le calcul standard de rendement d'un pic comme $\text{rendement pic} = \frac{\text{Aire}_{\text{pic échantillon}}}{\text{Aire}_{\text{pic référence}}} \%$ ne rend pas compte de cette dégradation.

Pour gagner en précision, on estimera la dégradation comme linéaire et on calculera le rendement des pics à partir des analyses de réf début et de réf fin selon la formule suivante :

$$\text{rendement pic n}^\circ x = \frac{\text{Aire}_{\text{pic n}^\circ x}}{\frac{6-x}{6} \text{Aire}_{\text{ref début}} + \frac{x}{6} \text{Aire}_{\text{ref fin}}} \quad \text{avec } x \in \mathbb{N} [0 ; 5] \quad (90)$$

x représente le numéro de passage de l'échantillon dans la série, allant de 0 pour le 1^{er} échantillon (réf début) à 5 pour le dernier échantillon (réf fin).

