



HAL
open science

Développement d'un système autonome de détection et de quantification des microARNs avec une plateforme nanofluidique pour la prise en charge du cancer du pancréas

Jean Cacheux

► To cite this version:

Jean Cacheux. Développement d'un système autonome de détection et de quantification des microARNs avec une plateforme nanofluidique pour la prise en charge du cancer du pancréas. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), 2018. Français. NNT: . tel-01922268v1

HAL Id: tel-01922268

<https://laas.hal.science/tel-01922268v1>

Submitted on 14 Nov 2018 (v1), last revised 7 Oct 2019 (v2)

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'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Jean CACHEUX

Le 12 octobre 2018

Développement d'un système autonome de détection et de quantification des microARNs avec une plateforme nanofluidique pour la prise en charge du cancer du pancréas

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :
CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par
Pierre CORDELIER et Thierry LEICHLE

Jury

M. Emmanuel Delamarche, Rapporteur
Mme Isabelle Van Seuning, Rapporteur
Mme Alice Carrier, Examineur
M. Louis Buscail, Examineur
M. Pierre CORDELIER, Directeur de thèse
M. Thierry Leichlé, Co-directeur de thèse

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Thierry et Pierre pour la confiance qu'ils m'ont donnée, leur soutien constant et, par dessus tout, leur reconnaissance qui m'a toujours permis de travailler dans des conditions idéales. Ces quatre années ont été un réel plaisir pour moi, je vous remercie encore pour ça.

Merci à mon jury de thèse d'avoir accepté de juger mon travail : Isabelle Van Seuning, Emmanuel Delamarche, Louis Buscail, Alice Carrier et Anne-Marie Gué.

Merci à Isabelle Dufour et Cécile Vindis qui m'ont accompagné dans les réunions annuelles du comité de thèse. Nos discussions ont toujours été très constructives pour le projet.

Merci à l'équipe MEMS, je pense ici plus particulièrement à Liviu, sans qui je ne serais jamais atterri au LAAS. Merci aussi à Pattamon, Denis, Yingning, Vincent, Lucien, Ali, Cécile, Valentin, Daisuke, Douglas et Dolores.

Merci à l'équipe MILE (ex-N2IS) d'avoir partagé mes pauses repas. Bien sûr, Aurélien, merci pour l'intérêt que tu as pu porter à mes travaux, et tes conseils toujours percutants, tu resteras un bel exemple. Merci aussi à Pierre (et son humour !), Olivier, Léo, Marius, Antoine, Seb, Marc, Cyril, Bayan, Nicolas, Inga, Morgan, Jeffrey, Anaïs, Marion et Marianne. Merci, enfin, à Rémi pour ces trois années passées ensemble sur la paillasse, à partager galères et jolis résultats (tu resteras toujours le patron !).

Merci à l'équipe 10 du CRCT de m'avoir accueilli lors de vos réunions hebdomadaires ainsi que pour votre ouverture d'esprit et vos conseils avisés !

Merci à toutes les personnes qui ont participé directement à ces travaux de thèse, je pense bien sûr aux stagiaires (et plus récemment collègues) avec qui j'ai pu travailler : Priscilia, Louisa et Pierre, merci pour votre aide ! Mais aussi aux équipes I2C et TEAM du LAAS qui font de ce laboratoire un environnement de travail excellent : Charline, merci vraiment pour ta disponibilité en C211, Fabrice, merci pour ton indulgence sur mes bases en électronique, Xavier, merci ! Merci enfin à Aurélie, Benjamin, Laurent, Adrian, Ludo, David, Samuel, Rémi et Fabien ! Ça a toujours été un plaisir de travailler à vos côtés en salle blanche.

Merci aux acteurs du projet Oncodevice, nos réunions ont permis d'instaurer une excellente dynamique à ce projet.

Je souhaite aussi remercier la fondation ARC qui a participé au financement de la quatrième année de doctorat.

Enfin, je voudrais remercier toutes ces personnes qui ont su être un soutien inestimable pendant ces années mais surtout une échappatoire indispensable à mon bien être. Je pense bien sûr à ma famille, merci pour tout le bien que vous me faites et le bonheur que vous m'apportez. Merci enfin à tous mes proches (de Toulouse, Normandie et ailleurs !), le manoir, « chez Monique », Fara Nazwa et la coloc du 148, merci aussi à toi, Marta, du fond du cœur. Ces années à vos côtés ont été merveilleuses.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 : challenges techniques et enjeux translationnels de l'identification et de la quantification des miARNs pour la prise en charge du cancer du pancréas.....	3
1.1. Les microARNs.....	4
1.1.1. Histoire et découverte.....	5
1.1.2. Biogenèse des miARNs	6
1.1.3. Fonction et rôle des miARNs en oncologie.....	7
1.1.4. Les miARNs et le cancer du pancréas	11
1.1.5. Notion de biomarqueur : pourquoi les miARNs ?.....	16
1.2. De l'échantillon à la détection des miARNs : standards actuels, vers une application clinique	22
1.2.1. Considérations pré-analytiques.....	22
1.2.2. Approches standards d'extraction des miARNs.....	24
1.2.3. Méthodes de quantification et de qualification des échantillons extraits	25
1.2.4. Mesure d'expression génique	28
1.2.5. Bilan	36
1.3. Les micro et nanotechnologies pour la biodétection des miARNs.....	37
1.3.1. Histoire et intérêt des micro et nanotechnologies pour la biologie.....	37
1.3.2. Vers une application clinique des micro et nanotechnologies ?	40
1.3.3. Le principe de transduction : de l'évènement biologique au signal physique.....	41
Conclusion du chapitre 1.....	56
Références du chapitre 1	57
Chapitre 2 : description de la plateforme nanofluidique et considérations théoriques sur la capture de miARNs en milieu confiné	69
2.1. Description de la plateforme nanofluidique sélectionnée pour ces études.....	70
2.1.1. Considérations générales sur la micro et nanofluidique	70
2.1.2. Effet de la réduction des échelles sur la détection de biomolécules	71
2.2. Réalisation du dispositif et modèle biologique utilisé.....	74
2.2.1. Description du dispositif.....	74
2.2.2. De la nanofluidique au bio-capteur	77
2.3. Construction d'un modèle 1D pour l'étude de la capture des miARNs.....	81
2.3.1. Description du modèle	82
2.3.2. Approximations et résolution du modèle.....	86

2.3.3.	Comparaison avec un modèle COMSOL	92
2.4.	Influence des choix expérimentaux sur la capture de miARNs	95
2.4.1.	Cas d'une analyse globale du capteur : influence du flux sur la détection.....	95
2.4.2.	Cas d'un capteur résolu spatialement : effet de la longueur de capteur analysée sur le signal détecté	99
2.4.3.	Influence de la concentration en cibles sur le niveau de détection	100
	Conclusion du chapitre 2.....	103
	Références du chapitre 2	104
Chapitre 3 : mise en place de la plateforme nanofluidique couplée à une détection en fluorescence : analyse du profil d'hybridation et étude de sélectivité sur des miARNs exogènes.....		107
3.1.	Commentaires préliminaires	108
3.2.	Spatial analysis of nanofluidic-embedded biosensors for wash-free single-nucleotide difference discrimination	109
3.2.1.	Abstract	109
3.2.2.	Introduction.....	110
3.2.3.	Results and discussion	111
3.3.	Conclusion	117
3.4.	Materials and methods.....	118
3.5.	Associated content: supporting Information.....	119
	Conclusion du chapitre 3.....	122
	Références du chapitre 3	124
Chapitre 4 : vers une détection de miARNs endogènes dans des échantillons d'origine biologique.		127
4.1.	Vers une préparation d'échantillon dédiée à la détection de miARNs et compatible avec des systèmes nano et microfluidiques.....	128
4.1.1.	Les RNases ou l'impossibilité de trouver des miARNs libres en circulation.....	128
4.1.2.	Lyse des interactions entre les protéines ou les vésicules liées aux miARNs	132
4.1.3.	Bilan	138
4.2.	Méthodes de marquage pour la détection de miARNs endogènes	140
4.2.1.	Choix de la séquence cible.....	140
4.2.2.	Marquage des cibles par réaction enzymatique.....	140
4.2.3.	Mise en place d'une détection avec des sondes marquées de types balises moléculaires	146
4.2.4.	Quelle attitude adopter pour détecter et quantifier les miARNs endogènes	156
4.3.	Dosage des miARNs dans des extraits de lignées cellulaires.....	157
4.3.1.	Gamme étalon et sensibilité de la RT-qPCR.....	157

4.3.2. Dosage du miR-21 dans des extraits de cellules	160
Conclusion du chapitre 4.....	164
Références du chapitre 4	165
Conclusion générale et perspectives.....	169
Références de la conclusion générale et des perspectives	175
Table des abréviations	177
Annexe A : biomarqueurs prédictifs en clinique	179
Annexe B : synthétisation du hard-PDMS	181
1. Quelques caractéristiques du hard-PDMS	181
2. Composants du hard-PDMS	181
3. Protocole	181
4. Dépôt du hard-PDMS	181
Annexe C : code MatLab.....	182
Annexe D : marquage Qubit	184
Annexe E : isolement des exosomes	185

Introduction

85% des patients atteints de cancer du pancréas présentent au diagnostic des formes avancées de la maladie qui empêchent une prise en charge thérapeutique efficace. Il est extrêmement urgent de mettre en évidence des marqueurs diagnostics des formes plus précoces de ces cancers, et de définir des biomarqueurs capables de prédire ou de suivre la réponse au traitement. L'équipe de Pierre Cordelier au CRCT (Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse) a été parmi les premières à rapporter l'altération de l'expression des microARNs (miARNs) au cours de la carcinogenèse pancréatique, et a récemment démontré qu'il est possible de quantifier ces acides nucléiques dans les fluides biologiques dans des modèles expérimentaux et chez les patients atteints de cancer. Les miARNs se présentent donc comme une nouvelle classe de biomarqueurs non invasifs pour le diagnostic et le suivi de patients atteints d'adénocarcinome pancréatique. Cependant les technologies utilisées actuellement sont coûteuses, chronophages et ne permettent, par ailleurs, pas un suivi au chevet du patient du fait de leur faible portabilité. De plus, et bien que les miARNs semblent avoir les caractéristiques d'un biomarqueur de qualité, les études sont parfois contradictoires : la robustesse et la reproductibilité des méthodes d'analyse utilisées ne sont donc, pour le moment, pas garanties.

Dans le même temps, le groupe MEMS dirigé par Thierry Leïchlé au LAAS – CNRS (Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes – Centre National de la Recherche Scientifique) explore les nouvelles technologies miniaturisées type nano et microsystèmes afin de détecter des molécules cibles telles que des oligonucléotides ou des protéines en offrant un haut degré de portabilité, le tout très rapidement et à bas coût.

C'est dans ce contexte et dans le cadre du projet Oncodevice qui réunit des binômes de chercheur du CRCT et du LAAS-CNRS que ce travail de thèse s'est inscrit. Ce programme, labellisé par l'IDEX, a pour objectif principal la mise à disposition de l'expertise technologique du LAAS-CNRS au service de problématiques biologiques originales et pertinentes en oncologie. Plus particulièrement au cours de cette thèse, notre objectif était de réaliser des dispositifs fluidiques sous forme de nanocanaux couplée à l'utilisation de techniques de fonctionnalisation de surface pour le greffage de molécules permettant la reconnaissance des cibles miARNs d'intérêt dans le but d'effectuer la détection biologique en milieu hyper-confiné. En intégrant ces méthodes, nous visons à développer un nouveau système de détection et de quantification absolue des miARNs, en fluorescence en temps-réel et de façon très originale afin d'aider à la prise en charge du cancer du pancréas.

Le mémoire présenté est organisé en quatre chapitres. Le premier chapitre démontre pourquoi les miARNs sont des candidats privilégiés pour la prise en charge du cancer du pancréas. Les limites des standards actuels de préparation d'échantillon et de détection sont étudiés et de nouvelles approches utilisant essentiellement les micro et nanotechnologies sont proposées. Un intérêt particulier a été donné aux publications scientifiques présentant des résultats au plus proche des problématiques biologiques et cliniques. Nous présentons, dans le deuxième chapitre, la plateforme nanofluidique couplée à une détection par microscopie en fluorescence. Nous étudions en quoi la réduction de la hauteur de canal à des échelles nanométriques limite le bruit de fond inhérent à cette méthode et discutons des implications d'une telle géométrie via un modèle de simulation par dynamique moléculaire en une dimension reproduisant ces événements. Le troisième chapitre, un article publié dans le journal *ACS sensors*, présente la capture de miARNs synthétiques et marqués en nanofluidique. Nous décrivons alors l'originalité de notre approche permettant de déterminer l'affinité du duplex mis en jeu en une seule étape d'interaction. La détection de SND (en anglais *single nucleotide difference*) est démontrée après optimisation de la séquence sonde et de la température d'interaction. Enfin, nous faisons le pari dans le dernier chapitre de nous rapprocher au plus près de la détection de miARN endogènes dans des échantillons biologiques. Dans un premier temps, la question de l'extraction des miARNs dans les échantillons biologiques est posée. Deux méthodes de détection compatibles avec une analyse en fluorescence des miARNs endogènes sont ensuite décrites. Nous terminons la présentation des résultats expérimentaux par la démonstration de notre capacité à détecter une séquence miARN spécifique extraite de lignée cellulaire modèle du cancer du pancréas. Enfin, après une conclusion générale, quelques perspectives d'avenir seront données.

Chapitre 1 : challenges techniques et enjeux translationnels de l'identification et de la quantification des miARNs pour la prise en charge du cancer du pancréas

Ce chapitre introduit l'intérêt des miARNs (micro acides ribonucléiques) comme biomarqueurs du cancer du pancréas, ainsi que l'importance de leur détection dans des biopsies solides et liquides autant pour le diagnostic de la maladie qu'en tant qu'indicateur pronostic et pour le suivi d'éventuels traitements sur les patients. Les méthodes standards d'extraction, de détection et de quantification des miARNs seront présentées, discutées, puis confrontées aux nouvelles solutions apportées par les nano et micro technologies issues et dérivées de l'industrie microélectronique. Le constat actuel fait état d'un faible transfert des nouvelles technologies en tant que tests compagnons pour une utilisation en clinique. Les limites de ces nouvelles approches seront décrites rigoureusement et nous amèneront à présenter notre plateforme nanofluidique couplée à une détection en fluorescence pour l'identification spécifique et la quantification des miARNs dans les chapitres suivants.

1.1. Les microARNs

La description admise de l'expression génique a pendant longtemps été dogmatique, décrivant les gènes (portés par l'ADN dans le noyau de chaque cellule eucaryote) comme transcrits en ARNm (ARN messenger), qui lui-même est traduit en protéines (chaque codon de l'ARNm, c'est à dire trois nucléotides, entraîne la synthèse d'un acide aminé protéinogène). Les séquences non codantes du génome étaient alors très peu étudiées, car considérées comme un surplus inutile, on parlait de « junk DNA » pour ADN poubelle. Les microARNs (miARNs) sont cependant issus de cet ADN génomique non codant. La part de cet ADN non codant est par ailleurs majoritaire dans le génome humain et permet la transcription d'une quantité importante d'ARN que l'on distingue en fonction de leur taille et de leur fonction en différentes familles. Les miARNs sont une de ces familles mais peuvent être aussi la conséquence de lncRNA (long ARN non codant) ou de snoRNA (petit ARN nucléolaire) (cf. Figure 1-1).¹

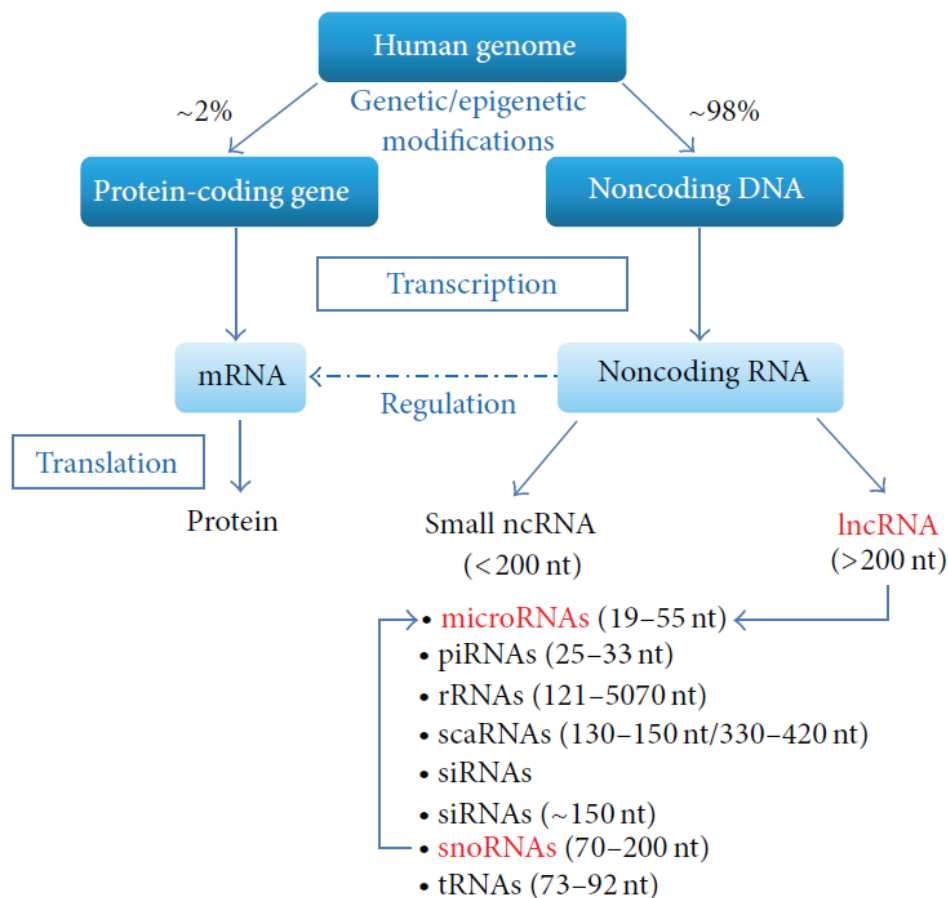


Figure 1-1 : part de l'ADN génomique non codant dans l'expression génique.¹

L'objectif de cette première partie est de mieux comprendre l'origine des miARNs et pourquoi ils sont si souvent étudiés. Leur biogenèse ainsi que leur fonction et expression dans le cancer, et plus spécifiquement dans le cancer du pancréas, sont abordées. Nous n'entendons pas ici faire une bibliographie exhaustive sur la biologie des miARNs, les causes de leur dérégulation et leurs rôles sur les processus biologiques, mais nous donnerons quelques exemples marquants de l'importance de ces molécules non codantes, notamment dans cette pathologie qui nous intéresse plus particulièrement dans ce travail de thèse.

1.1.1. Histoire et découverte

La première molécule miARN, *Lin-4*, a été découverte en 1993 chez les vers ronds *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*).² L'équipe de Victor Ambros a montré dans la revue *Cell* qu'un transcrit ARN non codant, *lin-4*, pouvait réguler un ARN messager, *lin-14*, et donc participer à des mécanismes jusqu'alors inattendus de transcriptions non codantes de protéines,³ selon ce qui avait été prédit par Watson et Crick lors de leur travaux sur la molécule d'ADN dans les années 1950. Une conséquence de la suppression de *Lin-4* chez le *C. elegans* est la perte de caractéristiques adultes comme la ponte des œufs. C'est seulement sept ans plus tard, en 2000, que le deuxième miARN, *Let-7*, a été observé chez le même animal.⁴

Dans les premières publications, les études scientifiques parlaient alors de « petits ARNs » et ce n'est qu'en 2001 que Ruvkun⁵ nomme miARN cette classe d'ARNs non codants d'environ 22 nucléotides. Aujourd'hui, l'existence de plus de trente mille séquences miARNs⁶ a été démontrée chez plus de 200 espèces eucaryotes.

On peut aussi noter que différentes espèces peuvent partager des séquences miARNs identiques. Ainsi, et contrairement à *Lin-4*, il a été démontré que *Let-7* était conservé chez de nombreuses espèces eucaryotes.⁷ On peut aussi relever que la présence de cette famille de miARNs a pu être identifiée chez l'homme dans différents organes (cerveau, estomac, colon, etc.). Ces données montrent clairement l'intérêt de la communauté scientifique pour les miARNs qui, en une dizaine d'année, est passée de la connaissance d'une séquence miARN à la découverte de tout un pan du génome non codant.

1.1.2. Biogenèse des miARNs

Les miARNs sont principalement transcrits par l'ARN polymérase II à partir de l'ADN sous la forme de long transcrits ARN de plusieurs milliers de nucléotides : les pri-miARNs.⁸ Ces molécules sont ensuite clivées par les enzymes Drosha (RNase III) couplées à la protéine DGCR8 en des séquences de plus petites tailles en structure d'épingle à cheveux allant de 60 à 110 nucléotides : les pre-miARN (précurseur-miARN).⁹ Ces séquences sont par la suite exportées du noyau cellulaire jusqu'au cytoplasme via l'Exportin-5.¹⁰ Ce changement de compartiment subcellulaire permet à l'enzyme DICER (RNase III) de cliver les pre-miARNs, donnant naissance à des miARNs double brins imparfaits contenant à la fois le miARN mature et sa séquence complémentaire. La TRBP (en anglais *transactivating response RNA-binding protein*) interagit alors avec la partie double brin du pre-miARN, ce qui amène la protéine Ago-2 (argonaute-2) à se lier sélectivement au 5' du simple brin qui est le moins stable thermodynamiquement formant alors le complexe protéique RISC (en anglais *RNA-induced silencing complex*) à se lier sélectivement au 5' du simple brin qui est le moins stable thermodynamiquement. La séquence complémentaire simple brin est, quant à elle, dégradée car non protégée (il a été cependant démontré que 10% d'entre elles pouvait tout de même être détectées et fonctionnelles chez la souris et l'humain¹¹) (cf. Figure 1-2).

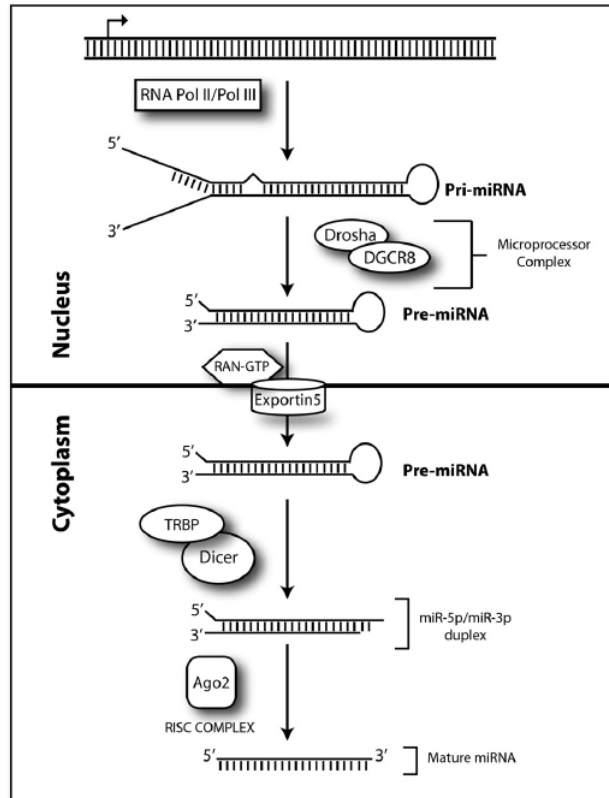


Figure 1-2 : biogenèse des miARNs.⁷

On peut souligner ici qu'il existe aussi des voies non-canoniques, c'est à dire des voies qui ne font pas intervenir le modèle décrit ci-dessus, menant à la biogénèse des miARNs, telle que la voie d'épissage dite du miRtron indépendante de l'activité de drosha et de DGCR8. Nous n'entendons pas en faire une description détaillée ici car les possibilités pour mener à un miARN sont multiples et largement décrites dans la littérature.¹²

1.1.3. Fonction et rôle des miARNs en oncologie

1.1.3.1. Fonction

Une fois lié au complexe RISC, la séquence miARN « guide » ce-dernier jusqu'à sa cible ARNm, et notamment sa partie terminale non traduite (UTR). Les mécanismes et interaction mis en jeu sont multiples, on peut noter comme conséquence principale l'inhibition de la traduction de l'ARNm (on parle de répression traductionnelle) ; cette implication des miARNs dans la régulation des gènes serait,

en effet, prépondérante car la reconnaissance est la plupart du temps imparfaite. De la même manière, cette interaction peut mener à la déadénylation de la séquence ARNm. Enfin, l'interaction miARN/ARNm peut également entraîner la dégradation de ce dernier, en cas de parfaite homologie de séquence, on parle alors de clivage endonucléolytique de la séquence ARNm en interaction avec le miARN.¹¹

De plus, l'implication des miARNs a été démontrée à tous les niveaux des processus cellulaires étudiés jusque-là. Des études récentes tendent par exemple à montrer que les miARNs peuvent activer l'expression génique^{13,14} ou encore interférer avec des fonctions de protéines ou, au contraire, être inhibés par des protéines.¹⁵ Récemment il a également été établi que les pri-miARNs pouvaient contenir des micro cadres de lectures ouverts et donc coder des peptides fonctionnels chez les plantes (mirpep).¹⁶ Via l'ensemble de ces mécanismes, il est estimé que les miARNs seraient impliqués dans la régulation de l'expression d'un tiers des gènes.

1.1.3.2. Conséquences de la dérégulation des niveaux de miARNs

Du fait de leur disparité de fonction décrite ci-dessus, les miARNs sont des régulateurs des procédés cellulaires à différents niveaux tels que l'apoptose, la différenciation, la prolifération, etc.¹⁷ La dérégulation de leur niveau a été notée chez tous les organismes lors du développement et dans des situations pathologiques. Ces molécules ont donc été perçues rapidement comme des candidats de choix en tant que biomarqueurs de maladie, notamment dans le cadre des cancers. Il apparaît que la deuxième catégorie dans laquelle sont publiés les articles sur les miARNs est l'oncologie, juste derrière la biologie moléculaire.¹⁸

Il est important de noter que les miARNs sont souvent identifiés comme biomarqueurs (et nous reviendrons sur cette notion plus tard dans ce premier chapitre) de la présence d'un cancer. En effet, un certain nombre d'études montre ainsi que l'évolution des cancers s'accompagnent de changements dans le niveau d'expression de certains miARN qui, lorsque cette régulation sera positive, seront nommés *oncomirs* pour leur tropisme tumoral.¹⁹ On peut souligner que le lien causal entre niveaux d'expression des miARNs et la croissance tumorale peut être parfois mis en évidence, notamment dans le cas de miR-21, comme indiqué plus tard dans ce chapitre.

Un défi important est donc de comprendre quels gènes sont ciblés par les séquences miARNs. Ces études peuvent se montrer laborieuses et délicates car la spécificité entre le miARN et le gène ciblé peut mettre en jeu des bases non appariées, c'est-à-dire que toutes la séquence ne participerait pas

à l'interaction, rendant alors possible le ciblage de plusieurs gènes par un seul et même miARN, et inversement : un gène peut être la cible de multiple miARNs. Il est souvent admis que seuls les nucléotides deux à huit des miARNs sont entièrement complémentaires aux gènes cibles, on parle en anglais de *seed pairing*, mais les interactions sont généralement plus complexes, démultipliant alors les possibilités.²⁰ Afin de mieux anticiper ces interactions, des algorithmes ont été développés, et sont actuellement disponible en ligne (miRwalk), afin de proposer une première base de travail pour de futures études fonctionnelles quant à la recherche de cibles.

Comme indiqué précédemment, certains miARNs présentent un rôle dans la croissance tumorale. Il a par exemple été montré que les miR-15a et miR-16-1 régulent le gène BCL2 qui s'avère être anti-apoptotique et habituellement surexprimé dans les lymphomes ou encore les leucémies.²¹ De même dans leurs travaux, Akao *et al.* décrivent comment la sous-expression des miARNs de la famille let-7 seraient impliqués dans la carcinogenèse colique. Dans cette étude, il est montré que la ré-expression de let-7 inhibe l'expression des proto-oncogènes KRAS et c-myc alors que les niveaux des ARNm restent inchangés.²² Ces différentes études nous montrent donc clairement l'influence des niveaux d'expression de miARN dans la croissance tumorale, et invitent à s'intéresser aux causes de cette dérégulation.

1.1.3.3. Origine de la dérégulation des niveaux des miARNs

Plusieurs hypothèses ont été faites pour comprendre l'origine des variations de niveaux des miARNs. Il est possible, via des phénomènes d'amplification de gènes (duplication du matériel génétique) ou alors de translocations chromosomiques (échange réciproque de matériel génétique entre deux chromosomes non homologues), d'observer une augmentation de l'expression de miARN codés par les gènes concernés. Au contraire, des miARNs localisés sur des sites fragiles des chromosomes peuvent être amenés à disparaître, du fait de délétions massives des séquences d'ADN. Les facteurs épigénétiques régulent les niveaux d'expression des miARNs, par modulation du niveau de méthylation de l'ADN codant pour ces ARNs, en raison de l'ajout ou de la suppression d'un groupe méthyle sur les nucléotides de type cytosine, dans le contexte d'îlots qu'on dénommera CpG. Ainsi, la sous-expression de miR-137, considéré comme un suppresseur de tumeur, est liée à l'hyperméthylation de sa séquence d'ADN.²³ Le lien entre ces altérations au niveau du génome et l'expression des miARNs tiendrait dans le fait que 13 et 28% des gènes codant les miARNs seraient hébergées dans des zones du génome riches en îlots CpG, c'est-à-dire dans une partie du génome où les méthylations peuvent être importantes.²⁴ Il a aussi été renseigné que l'utilisation d'inhibiteurs des histones déacétylases présente

un impact certain sur les niveaux d'expression des miARNs, ce qui montre indirectement que déacétylation des histones peut aussi déréguler les niveaux de miARN.²⁵

Certains ARNm cibles des miARNs ont pris certaines « contre-mesures » évolutives, par des modifications de leur séquence 3'-UTR afin d'échapper à la régulation des miARNs ; c'est notamment le cas de l'oncogène KRAS vis-à-vis du miARN Let-7.²⁶ Au contraire, des SNP dans la séquence codante des miARNs sont aussi associés à une altération des niveaux de miARNs et, par conséquent, à l'augmentation ou la diminution de la croissance tumorale.²⁷

Enfin, une troisième voie indirecte est possible : les protéines peuvent elles aussi être impliquées dans l'altération des niveaux cellulaires des miARNs matures. Cette régulation peut prendre effet lors de la biogenèse des miARNs, comme cela est le cas pour DICER qui, lorsqu'elle montre des niveaux d'expressions importants peut-être associée à des cancers comme le cancer de la bouche.²⁸ Sans participer directement à la formation de miARNs matures mais plutôt à leur formes primaires nucléaires, certaines protéines à activité de facteur de transcription peuvent se lier aux séquences promotrices de ces derniers et intervenir au niveau de la transcription, entraînant alors une dérégulation comme on peut l'observer avec la protéine c-myc, qui est capable d'induire ou de réprimer l'expression des miARNs.²⁹

Ainsi, l'expression des miARNs est régulée selon de multiples voies et processus, entraînant des conséquences fonctionnelles par l'altération des ARNm qu'ils ciblent. Un miARN sur-exprimé qui cible un ARNm oncogène entrainera une réduction de la masse tumorale. Si ce même miARN cible au contraire un gène suppresseur de tumeur, alors les risques de prolifération augmenteront (cf. Figure 1-3).

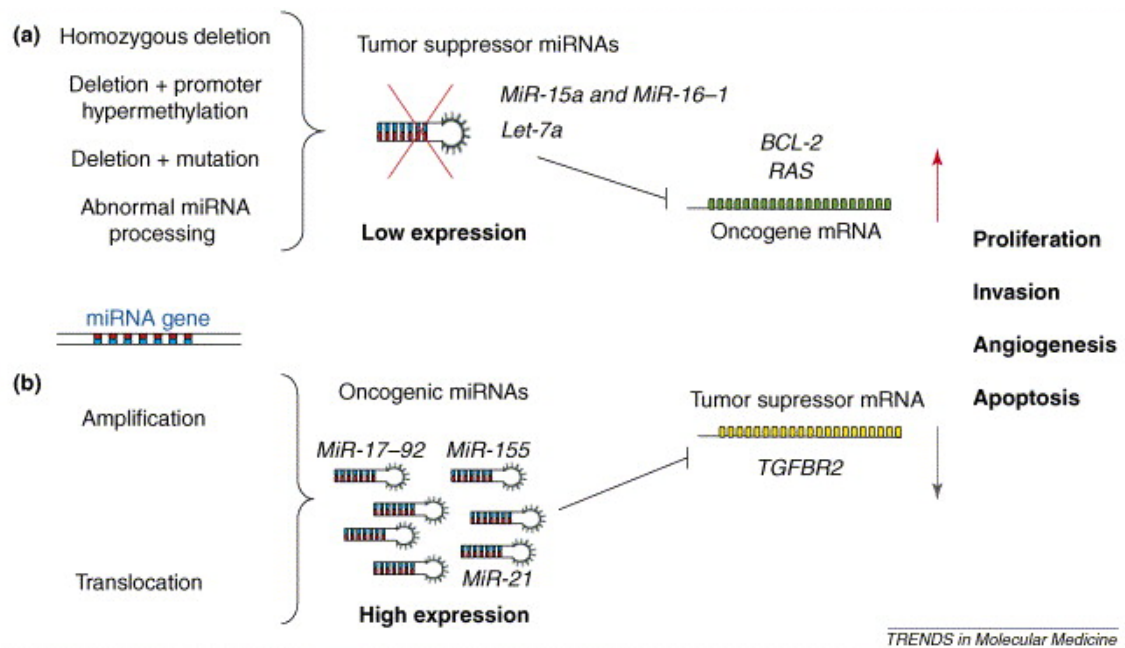


Figure 1-3 : origine de la sous-expression ou de la sur-expression et implication selon l'ARNm ciblé.²⁴

1.1.4. Les miARNs et le cancer du pancréas

1.1.4.1. Le cancer du pancréas

Le cancer du pancréas fait partie des cancers pour lesquels le pronostic de survie est le plus mauvais. Selon les chiffres du GLOBOCAN 2012,³⁰ le cancer du pancréas cause 331 000 morts par an pour 338 000 cas recensés dans 184 pays ou territoires du monde (cf. Figure 1-4). Cependant, on observe une hétérogénéité des cas en fonction des régions d'origines. L'incidence est en effet trois fois plus faible dans les pays les moins développés. Plusieurs facteurs peuvent être mis en avant, comme le taux de fumeurs dans la population,³¹ mais aussi la consommation d'alcool, l'obésité ou encore le manque d'activité physique.³² On sait, de plus, que l'âge est un facteur important avec 90% des cas diagnostiqués après 55 ans.³³

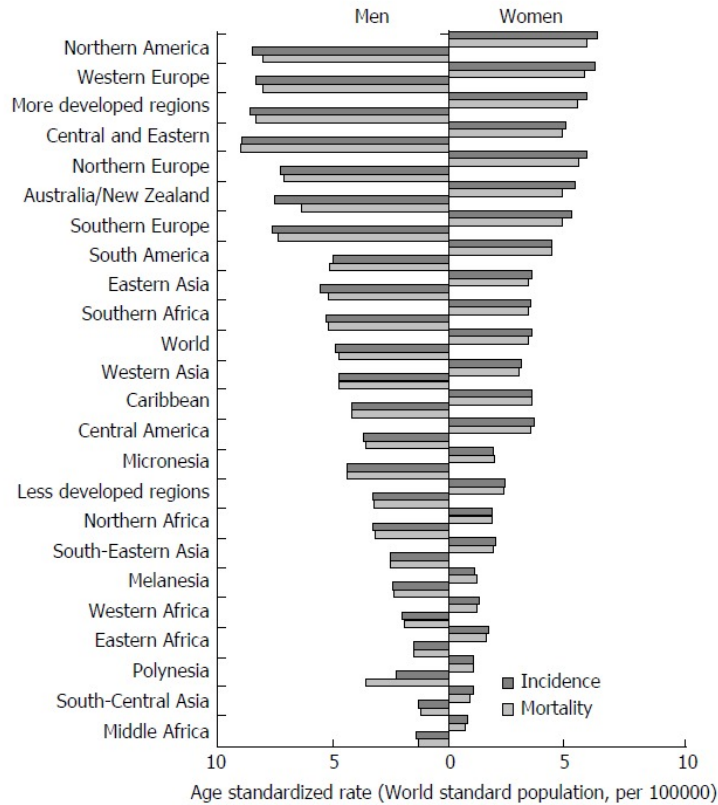


Figure 1-4 : fréquence et taux de mortalité liés au cancer du pancréas pour les hommes et les femmes en fonction de la région d'origine.³³

On peut alors souligner que le ratio entre mortalité et incidence du cancer est de 98% avec, plus précisément, un taux de survie à 5 ans de l'ordre de 6% en moyenne, tous stades confondus. On peut noter qu'il est possible de réduire les risques de cancer du pancréas, mais de manière non spécifique, en changeant certaines habitudes de vie, il a par exemple été démontré qu'après 5 ans d'arrêt de la cigarette, le risque de cancer est comparable à celui des personnes n'ayant jamais fumées.³⁴

Bien que le taux de survie varie très peu d'une région à l'autre, on remarque que la prise en charge chirurgicale des lésions (on entend ici que la tumeur soit bien localisée et que le patient n'ait pas développé de lésions métastatiques) du cancer du pancréas permet d'augmenter le taux de survie à 5 ans à près de 30%. Cette prise en charge rapide concerne malheureusement moins de 20% des cas aux Etats-Unis et en Europe.³⁵ Ce constat peut s'expliquer par le fait qu'il n'existe aucun test validé à ce jour pour détecter les formes précoces de cancer du pancréas. La question d'un dépistage massif peut également se poser, surtout compte tenu du faible nombre relatif de cancer diagnostiqué par an, sachant d'autant plus que l'absence de symptômes spécifiques n'améliore en rien la situation (dans la plupart des cas, les tumeurs pancréatiques sont découvertes de façon fortuite lors d'examens cliniques

pratiqués pour d'autres maladies). Des recherches sont cependant en cours dans des populations dites à risque, c'est-à-dire présentant des prédispositions génétique (famille de cancer) ou pathologiques (pancréatite). Le professeur Buscail fait par ailleurs état d'amélioration sur la prise en charge clinique du cancer du pancréas, cependant une marche importante reste à franchir en terme de diagnostic précoce.³⁶ Ce point est très important et apparaît comme une des motivations principales de ces travaux de thèse qui visent à proposer un test de détection et de suivi de la maladie. Nous allons donc dans la suite du manuscrit discuter des méthodes de détection actuellement utilisées en clinique courante. Nous verrons ensuite en quoi les miARNs semblent être une cible intéressante dans la mise en place d'un test diagnostique ou pronostic permettant une meilleure prise en charge du cancer du pancréas, c'est-à-dire un test permettant la détection de la maladie mais aussi son suivi en fonction du traitement prescrit, selon une approche de médecine personnalisée.³⁷

1.1.4.2. Méthodes de diagnostic en clinique du cancer du pancréas

Il existe des symptômes physiques (liés à des perturbations des fonctions endocrines et exocrines de l'organe) repérables tels que l'apparition d'un ictère (ou jaunisse), des douleurs gastriques et abdominales ou encore la perte de poids. Ces symptômes sont principalement présents lorsque la tumeur se situe dans la tête du pancréas et présente une masse suffisamment importante. Ces changements physiques sont en revanche beaucoup moins présents lorsque la tumeur est localisée dans le corps ou la queue du pancréas.

Dans la majorité des cas, ces symptômes mèneront le clinicien à poser son diagnostic sur la base de l'imagerie médicale. Plusieurs techniques d'imagerie sont utilisées lors du diagnostic telles que la tomodensitométrie (ou scanographie) ou l'échographie. La première permet la mesure du taux d'absorption des rayons X par les tissus. Une mesure sur plusieurs tranches assistée par un traitement informatique permet d'obtenir des images 2D ou 3D des structures anatomiques. Pour la seconde, la mesure se base sur la transmission et la réflexion d'ultrasons et permet l'observation des organes internes à travers la barrière abdominale. Si aucune de ces méthodes ne permet de poser le diagnostic avec certitude, il est alors possible de pratiquer une échographie endoscopique par voie transdudodénale au plus proche de la tumeur, pratique souvent accompagnée d'une biopsie à l'aiguille fine qui permet une analyse des tissus ainsi prélevés et donc une confirmation histologique du diagnostic.³⁸ Cette méthode peut aussi être utilisée dans le but d'effectuer une analyse génétique, ou de l'expression génique, comme nous l'avons démontré dans l'équipe.^{39,40}

Malgré l'existence de ces méthodes d'imagerie et d'analyse médicale, on peut noter plus de 50% des patients ont déjà développé des métastases lors de leur prise en charge. Il est important de souligner que l'imagerie médicale n'est pas limitante ici pour permettre la détection de la tumeur (même petite), mais plutôt l'arrivée tardive des patients en consultation. Les limitations sont donc d'ordres physiopathologiques, et sont essentiellement dues au fait que lorsque les premiers symptômes apparaissent, la tumeur est dans la plupart des cas avancée. Il apparaît donc urgent, dans ce contexte, de définir des biomarqueurs qui pourraient permettre une meilleure prise en charge du cancer du pancréas que ce soit en tant qu'outil de diagnostic ou pronostic pour le suivi de l'évolution de la maladie en fonction du traitement administré.

1.1.4.3. MiARNs et cancer du pancréas

Les premières études qui traitent de l'expression et du rôle des miARNs dans le cancer du pancréas datent de 2007, c'est-à-dire moins de 10 ans après leur découverte. Historiquement, c'est le groupe du Dr Schmittgen qui pour la première fois fait état de l'altération de l'expression des miARNs dans le cancer du pancréas, par la démonstration de la surexpression des miR-376a et miR-301 par rapport au tissu sain chez les patients atteints de ce cancer.⁴¹ S'en suit alors une multitude d'études avec des résultats qui vont dans la même direction et permettent d'identifier des miARNs souvent dérégulés dans ce cancer. C'est ce que montre, par exemple, Bloomston *et al.* en 2007 dans une étude qui conclut que 21 miARNs sont surexprimés et 4 sous-exprimés dans le cas d'un cancer du pancréas en comparaison avec une pancréatite chronique, une maladie inflammatoire qui augmente le risque de cancer comme indiqué précédemment. Ils montrent aussi que des sous-groupes peuvent être déterminés en fonction des risques de décès dans les 24 mois. Ces études ouvrent la voie à l'identification de niveaux d'expression de miARN pour le diagnostic et le pronostic de la maladie.⁴²

Plus récemment, c'est le groupe du Dr Tsongalis, collaborateur de longue date de notre groupe de recherche, qui a validé un ensemble de miARNs couplé à l'évaluation histologique des tissus, méthode de diagnostic la plus sûre actuellement, afin de permettre l'identification de cancer du pancréas.³⁷ Les auteurs annoncent notamment que leur méthode permettrait un diagnostic précoce mais aussi, en fonction du miARN considéré, de dégager une valeur pronostique en termes de survie ou de résistance au traitement permettant une meilleure prise en charge du patient et une réduction des risques de décès. Pour ce faire, 5 miARNs rigoureusement sélectionnés à partir de la littérature, ont été dosés (cf. Figure 1-5). Bien que le suivi de ces miARNs n'ait pas permis de prédire le développement de

métastases, on relève, en revanche, que les niveaux en miARN chez des groupes de 19 patients avec ou sans cancer du pancréas étaient en accord avec les prédictions.

DHMC miRNA panel	Role	Target genes	Biological function	Signaling pathway	Clinical significance	Expression literature findings	Expression DHMC findings
mir-10b	Oncogenic	<i>TIP30, HOX</i> family	Cell proliferation, apoptosis, differentiation, invasion	PIK3/AKT	Diagnosis, Prognosis	PainIN: ↑ PDAC: ↑	PainIN: ↑
mir-21	Oncogenic	<i>BCL2, FASLG, PDCD4, PTEN, RECK</i>	Cell proliferation, invasion, apoptosis, chemoresistance	Apoptosis, PIK3/AKT	Diagnosis, Prognosis, Therapy	PainIN: ↑ PDAC: ↑	PDAC: ↑
mir-196a	Oncogenic	<i>NFKBIA, ING5</i>	Cell proliferation, invasion, apoptosis	Cell cycle, apoptosis	Diagnosis, Prognosis	PainIN: ↑ PDAC: ↑	PainIN: ↑ PDAC: ↑
mir-217	Tumor suppressor	<i>KRAS, SIRT1</i>	Cell growth, invasion	KRAS signaling	Diagnosis	PainIN: ↓ PDAC: ↓	PainIN: ↓ PDAC: ↓
mir-148a	Tumor suppressor	<i>DNMT1, CCKBR, BCL2, CDC25B</i>	Cell proliferation, cell growth, apoptosis, invasion	Cell cycle, apoptosis	Diagnosis, Prognosis, Therapy	PainIN: ↓ PDAC: ↓	PainIN: ↓ PDAC: ↓

Red arrows represent overexpression, and green arrows represent underexpression.

Figure 1-5 : exemples de miARNs impliqués dans le cancer du pancréas, fonction biologique et importance clinique.⁴³

Aussi, le groupe du Dr Van Seuningen a démontré le rôle de miR-29a et miR-330-5p qui agissent comme suppresseurs tumoraux via le ciblage de l'oncogène MUC1 dans le cadre du cancer du pancréas. Les expériences *in vitro* font état d'une réduction de la prolifération, de la migration et de l'invasion cellulaire lors d'une sur-expression de ces séquences. Des expériences *in vivo* ont, de plus, permis d'observer une réduction de la croissance tumorale lors de l'injection intra-tumorale de ces miARNs.⁴⁴ De la même manière, le rôle de la séquence miR-219-1-3p en tant que régulateur négatif de l'expression de l'oncogène MUC4 et suppresseur tumoral ont été mis en évidence dans des lignées cellulaires modèles et des tissus humains du cancer du pancréas.^{45,46}

Notre équipe de recherche s'est intéressée très tôt à l'expression et au rôle des microARNs aux cours de la carcinogénèse pancréatique. Dès 2009, nous avons démontré la perte d'expression du miARN let-7a dans le cancer du pancréas, que cela soit dans les tumeurs opérées ou dans le matériel de cytoponction à l'aiguille fine, à l'échelle du pri-miARN, une première à l'époque.⁴⁷ Autant la réexpression de ce miRNA contrecarre la prolifération cellulaire, autant réintroduire Let-7 dans des tumeurs expérimentales s'avère inefficace. Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'expression d'un panel de microARN dans des lésions préneoplasiques de ce cancer, et ce pour la première fois, avec comme objectif de déterminer un marqueur très précoce dans l'évolution de la maladie. Nous

avons ainsi pu démontrer que le miARN miR-21 est surexprimé très tôt dans les lésions issues de modèles animaux transgéniques, et cela avant même de détecter des changements morphologiques, mais également dans des échantillons de patients.⁴⁸ Ce travail a été suivi de près par la démonstration de la perte d'expression du miARN suppresseur de tumeur miR-148 dans nos modèles en raison d'une hyperméthylation de sa séquence codante, et de l'intérêt diagnostique de la méthylation de l'ADN codant pour ce miARN chez les patients.⁴⁹ De façon étonnante, une fois de plus, restaurer miR-148a dans nos modèles n'impacte pas la progression des tumeurs expérimentales.⁵⁰ Plus récemment, nous avons démontré l'intérêt du ciblage de miR-21 dans des modèles de cancer du pancréas. Pour ce faire, nous avons procédé pour la première fois à l'invalidation de miARNs in vivo à l'aide de vecteurs lentiviraux codant pour des « éponges moléculaires » afin de titrer miR-21 et de le détourner de ses fonctions pro-oncogéniques.⁵¹ Le transfert intratumoral de ces vecteurs se traduit par une diminution drastique de la progression tumorale et d'une chimiosensibilisation des tumeurs. Plus récemment, nous avons été les premiers à démontrer l'intérêt diagnostique des miARNs salivaires pour la prise en charge du cancer du pancréas,⁵² et défini une signature en partie composée de miARNs permettant de prédire l'efficacité d'une thérapie génique anticancéreuse innovante.⁵³ Depuis, notre équipe a démontré à l'aide de modèles transgéniques murins que miR-21 accélère la cancérogenèse pancréatique (manuscrit en préparation), que DGCR8, qui est normalement impliquée dans la biogenèse des miARNs, est surexprimée dans le cancer du pancréas et favorise la progression des tumeurs expérimentales (manuscrit en préparation), et que les microARNs de la famille de miR-200 régulent la transition épithélio-mésenchymateuses et contrôlent la progression métastatiques dans ces tumeurs (Diaz-Riascos *et al.*, en révision). Ces différents travaux ont fait l'objet de nombreuses revues de la littérature.⁵⁴⁻⁵⁹

1.1.5. Notion de biomarqueur : pourquoi les miARNs ?

Notre équipe a donc largement participé à la démonstration de l'altération d'expression et de l'implication des miARNs dans le cancer du pancréas. Il reste cependant à déterminer la valeur clinique de ces molécules comme biomarqueurs de cette maladie.

1.1.5.1. Définition

Dans un premier temps, il nous apparaît important de définir ici, et avec soin, la notion de biomarqueur. Un biomarqueur est une caractéristique d'utilité clinique objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur des processus biologiques et pathogéniques (c'est-à-dire qui concerne la cause ou l'évolution d'une maladie), ainsi que des réponses pharmacologiques d'une intervention thérapeutique.⁶⁰ Il peut alors permettre d'expliquer des améliorations ou détériorations de l'état de santé d'un patient, habituellement abordé de manière empirique à l'aide d'études cliniques antérieures qui ne sont pas forcément adaptées aux nouveaux besoins en termes de médecine personnalisée. Les biomarqueurs peuvent être utilisés dans l'intention d'un diagnostic mais aussi d'un pronostic, c'est-à-dire qu'ils peuvent permettre la détection de la maladie mais aussi aider à prédire son évolution. On comprend donc que leur mesure peut également mener à un ajustement du traitement donné au patient de par sa valeur prédictive. Leur avantage certain est qu'ils permettent de s'enquérir de l'évolution de la maladie à l'instant t de la mesure (c'est-à-dire du prélèvement biologique) alors que les effets cliniques mesurés habituellement sont obtenus sur des temps plus longs (survie, récurrence, etc.). Il est important de noter que les biomarqueurs ne peuvent se substituer aux critères cliniques (cf. Figure 1-6).

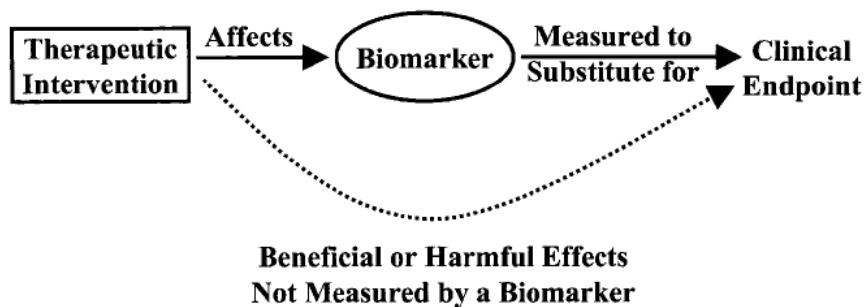


Figure 1-6 : effet d'une intervention thérapeutique sur les biomarqueurs et les données cliniques. Il est capital de relever qu'un biomarqueur donné pourra ne pas être affecté par une thérapie, qu'elle soit bénéfique ou non sur le plan clinique (ce point est représenté par la flèche en pointillée) : les biomarqueurs ne peuvent donc pas se substituer aux données cliniques.⁶⁰

1.1.5.2. Les différents types de biomarqueurs et leur utilisation en clinique

Plusieurs espèces biologiques peuvent faire office de biomarqueurs, tel que les acides nucléiques (ADN, ARN), les protéines, les peptides, les anticorps, les cellules tumorales circulantes (CTCs) ou encore des modifications chimiques sur des molécules (méthylation, déacétylation, etc.) (cf. Figure 1-7). On parle aussi de biomarqueurs si on étudie un ensemble d'altérations génétiques, protéomiques ou encore des signatures métaboliques. Comme décrit par le *National Cancer Institute* on peut retrouver ces biomarqueurs dans nombre de fluides corporels (sang, salive, urine, etc.) ou dans des tissus biologiques,⁶¹ impliquant alors, respectivement, des biopsies liquides ou solides.

Nous nous intéresserons par la suite aux biomarqueurs qu'il est possible de retrouver dans les biofluides. L'avantage certain de la possibilité d'une biopsie liquide est que l'intervention médicale est beaucoup moins invasive par rapport à une biopsie classique. Cette intervention est de plus rapide et répétable dans le temps sans engendrer de conséquences lourdes sur le patient contrairement à la biopsie classique qui peut mener à des complications cliniques, et qui entraîne des coûts supplémentaires.^{62,63} De plus, la biopsie liquide est considérée comme étant représentative de l'entière de la tumeur, au contraire de la biopsie classique dont la valeur clinique peut être biaisée par la topologie du prélèvement. La conservation des échantillons issus de biopsie classique peut elle aussi s'avérer problématique. Ces derniers doivent être congelés ou en blocs fixés au formol et inclus en paraffine.

Les CTCs, par exemple, peuvent être retrouvés en périphérie et indicatrices d'un éventuel cancer. Cependant il a été montré que ces cellules étaient limitées en terme de suivi pronostic d'un éventuel traitement.⁶⁴ Les niveaux de CTCs mesurés sont aussi très dépendants du cancer étudié, ce qui ne fait pas d'elles des biomarqueurs génériques.⁶⁵ Enfin, malgré les développements récents, la caractérisation physique et robuste de ces cellules demeure problématique.

L'ADN circulant est aujourd'hui de plus en plus étudié et tend à devenir un standard de la détection et de suivi des cancers. Cependant, son temps de demi-vie est extrêmement court ($\sim 2h$),⁶⁶ et une maîtrise parfaite de la chaîne préparatoire et analytique est requise pour son utilisation en tant que biomarqueur.

Enfin la mesure d'expression protéique dans les fluides biologiques a été abordée, cependant la corrélation avec les taux mesurés au niveau des tissus cancéreux est peu décrite, même si elle n'est pas forcément nécessaire. Ceci est dû principalement au fait que le signal issu des cellules tumorales peut être largement bruité par les niveaux d'expression protéique des cellules saines en absence de

microdissection, rendant alors difficile la validation d'une protéine circulante liée au cancer.⁶⁷ On note, tout de même que l'antigène prostatique spécifique (PSA) est utilisé pour le diagnostic du cancer de la prostate.⁶⁸ De même des antigènes tels que le CEA ont été proposés pour le suivi des cancers des ovaires, du pancréas et du colon.⁶⁹ Enfin, il est important de souligner l'utilisation de CA 19.9 dans le cadre du suivi clinique des adénocarcinomes pancréatiques. Ce biomarqueur affiche, selon une étude de 2007, une sensibilité et une sélectivité toutes deux comprises entre 70% et 90%.⁷⁰ Son utilisation reste cependant limitée au suivi de l'évolution de la maladie.

De plus en plus d'études tentent de multiplier le nombre de cibles ainsi que leur nature sur un même capteur.⁷¹⁻⁷³ On comprend aisément que si le cancer est validé via plusieurs biomarqueurs à la fois alors les risques d'erreur concernant le diagnostic ou le pronostic sont considérablement amoindris.⁷⁴

Cependant, et malgré le nombre conséquent de biomarqueurs, leur utilisation en clinique est encore limitée. La première cause est que les essais qui mènent à la validation d'un biomarqueur sont longs et onéreux. De plus, dans la plupart des cas, la méthodologie des essais cliniques n'est pas compatible avec l'analyse de tels biomarqueurs. Parmi tous les biomarqueurs décrits dans la littérature, seulement sept ont été approuvés par la *Food and Drug Administration* aux Etats-Unis.⁷⁵ De plus, les biomarqueurs utilisés sont rarement circulants et nécessitent donc la collecte de tissus par biopsie. Parmi eux se trouvent essentiellement des mutations ou altérations génétiques (e.g. mutation BRCA, mutation KRAS, méthylation BMP3, aneuploïdie du chromosome 3, etc.) (un tableau récapitulatif et détaillant l'utilité de ces biomarqueurs se trouve dans l'Annexe A). Les cancers concernés sont les cancers du sein, de la prostate, de la vessie et les leucémies pour la plus grande partie. Concernant le cancer du pancréas, la mise en place de tests en clinique est compliquée, notamment en raison de la grande hétérogénéité de présentation clinique de ce cancer, et du peu d'agents thérapeutiques efficaces disponibles à ce jour. Cela limite d'autant l'impact des biomarqueurs sur la prise en charge des patients. Les travaux de Bournet *et al.* dans notre équipe laissent cependant espérer l'arrivée de biomarqueurs reconnus pour le diagnostic tel que l'oncogène KRAS pour le diagnostic différentiel cancer du pancréas vs. pancréatite pseudotumorale, déjà utilisé en clinique.⁷⁶⁻⁷⁹ On peut cependant retenir que de multiples biomarqueurs associés à un agent thérapeutique sont actuellement évalués en phases II ou III clinique. On remarque de plus des redondances en termes de cibles biomarqueurs étudiées d'un cancer à l'autre. Ces deux indicateurs permettent de présager un futur plus prometteur pour les biomarqueurs du cancer en clinique.

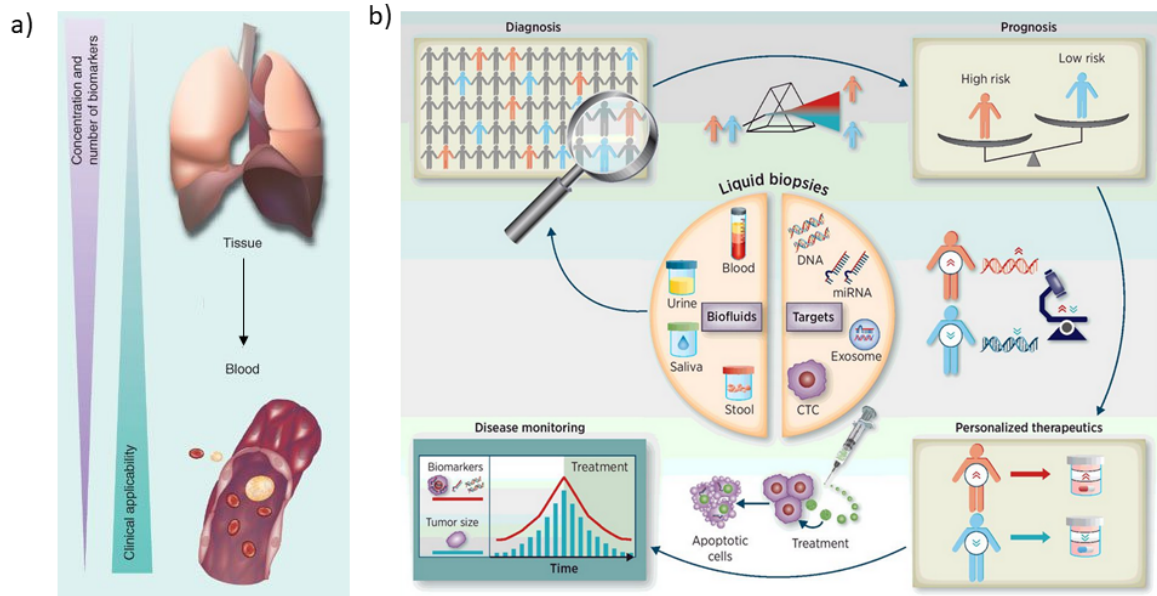


Figure 1-7 : a) les biomarqueurs sont présents autant dans les tissus que dans la circulation, l'intérêt clinique est très fort dans le cas des biopsies liquides car l'étape de collection est moins intrusive, cependant les concentrations peuvent chuter drastiquement. b) Les biomarqueurs sont variés (ADN, miARNs, exosome, CTCs, etc.) et leur présence dans les différents biofluides (sang, urine, salive, etc.) permet de les utiliser comme outil de diagnostic de la maladie, de pronostic (afin d'adapter le traitement) et de suivi d'évolution de la maladie. Figure adaptée de Shigeyasu *et al.* et Cho *et al.*^{80,81}

1.1.5.3. Biomarqueurs en biopsie liquide : avantages des miARNs

Avant de rentrer dans les détails analytiques de la détection de miARN, interrogeons-nous quelques instants sur le choix de ce biomarqueur. Nous n'allons pas ici reprendre la description des fonctions et expressions des miARNs mais essayer de comprendre en quoi ces molécules peuvent être des biomarqueurs intéressants.

Le premier point est que les miARNs sont impliqués très tôt dans la carcinogenèse.^{82,83} De plus, dans certains cas bien définis, leur niveau d'expression reflète clairement le stade tumoral du patient. C'est ce qu'ont montré Lu *et al.* en étudiant l'expression de près de 217 miARNs dans plusieurs cancers humains.⁸⁴ Ces deux points font des miARNs un candidat très intéressant en tant que marqueur biologique pour la prise en charge du cancer mais aussi le suivi d'éventuels traitements. En plus d'être impliqués dans de multiples processus cancéreux, les miARNs sont retrouvés dans de nombreux fluides corporels tels que la salive, le sérum, le plasma et l'urine (cf. Figure 1-8).⁸⁵⁻⁸⁷ Ceci est en partie dû à la très grande stabilité des miARNs qui ont des temps de dégradation très longs. Chen *et al.* ont supposé que leur résistance aux RNases (ribonucléases), une classe de nucléases qui catalyse la dégradation de

l'ARN, était plus importante que les autres types d'ARNs.⁸⁸ L'analyse de la dégradation de miARNs synthétiques a cependant démontré qu'elle avait bien lieu, comme le démontreront les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Il a été découvert par la suite que les miARNs étaient, entre autre, protégés par des complexes lipidiques ou lipoprotéiques.⁸⁹ Une multitude d'études a aussi montré la présence de miARNs dans des microvésicules et les exosomes, qui sont sécrétés par les cellules et retrouvés dans la circulation générale.⁹⁰⁻⁹³ Cependant, il est plutôt admis aujourd'hui que si les miARNs sont si résistants, c'est parce qu'ils se lient essentiellement à la protéine Ago2, qui permet aux miARNs d'éviter une interaction avec les RNases présentes en solution.^{94,95}

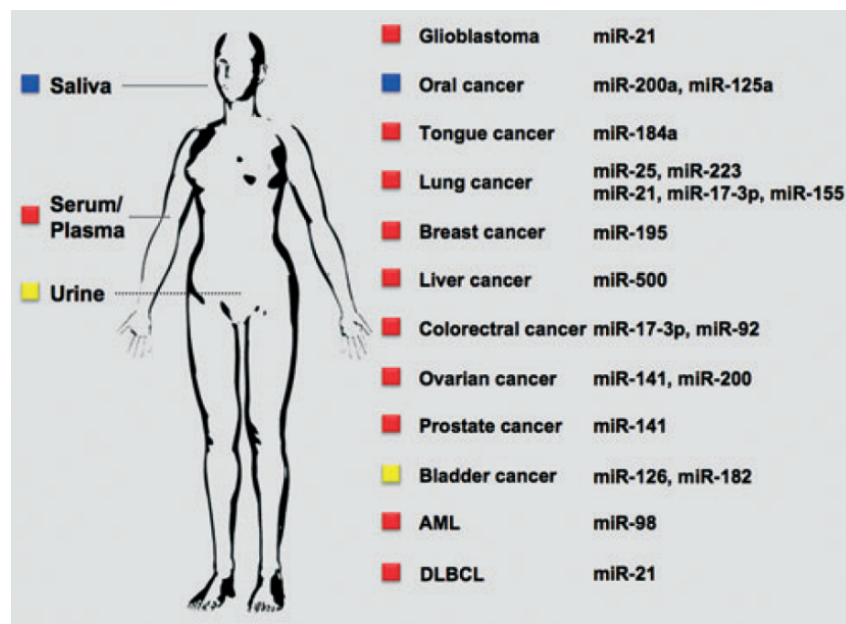


Figure 1-8 : exemples de miARNs présents dans les fluides corporels pour différents cancers.⁸⁵

1.2. De l'échantillon à la détection des miARNs : standards actuels, vers une application clinique

L'étude de l'implication des miARNs dans de nombreux cancers à l'aide des standards de détection actuels ont permis de qualifier ces molécules de biomarqueurs. Nous allons décrire ces méthodes basées sur les miARNs, et nous intéresserons particulièrement à leur champ d'application, de performance, ainsi que leurs limitations en tant que tests à visée diagnostique, pronostique, ou de suivi permettant ainsi de décider du meilleur traitement à appliquer mais en se réservant la possibilité de le faire évoluer en cas de résistance ou de rechute. Il est à noter qu'aujourd'hui, les miARNs ne sont pas encore utilisés en clinique pour la prise en charge des patients atteints de cancers.

1.2.1. Considérations pré-analytiques

Les différentes variables pré-analytiques sont importantes dans l'extraction d'un échantillon. Elles peuvent, en effet, être la source de nombreuses erreurs répercutées lors de l'étape de détection. Il est donc indispensable de définir des standards dans le prélèvement d'échantillon pour permettre, ensuite, la comparaison et la reproductibilité des résultats obtenus d'un laboratoire à l'autre. L'absence de consensus complique, naturellement, aussi la qualification des miARNs en tant que biomarqueurs. Outre les facteurs liés au patient, tel que l'âge, le fait d'avoir fait de l'exercice, le régime alimentaire, la région de provenance ou encore la prise de médicaments, il existe de multiples étapes dans la préparation de l'échantillon qui peuvent altérer la quantité de miARN extrait.⁹⁶ Nous allons dans la suite de cette partie nous intéresser aux limitations et challenges liés à la manipulation d'échantillon provenant de fluides biologiques.

Dans le cas des miARNs circulants, nous allons baser notre analyse sur la préparation d'échantillon à partir des produits de sang complet tels que le plasma et le serum.⁹⁷ Comme nous l'avons déjà évoqué, les miARNs sont retrouvés dans tous les fluides corporels,^{98,99}. L'exemple du sang nous semble pertinent car il permet, de par sa complexité, d'aborder les différentes questions posées par les autres fluides biologiques.

On remarque par exemple que le tube utilisé pour le prélèvement peut avoir une influence forte sur la quantité finale de miARN. Kim *et al.* ont comparé des tubes contenant de l'EDTA, de l'héparine, du citrate de sodium, du fluorure de sodium et de l'oxalate de potassium (NaF/KOx) ou encore sans

anticoagulant. Le dosage des miARNs (miR-16 et miR-223) était ensuite fait via RT-qPCR (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*), méthode de détection qui sera décrite plus loin dans le mémoire.¹⁰⁰ Leurs conclusions montrent que le niveau d'expression des miARNs peut être amélioré d'un facteur deux dans le plasma et d'un facteur trois dans le sérum en utilisant le couple NaF/KOx.

On peut noter que la stabilité des miARNs, déjà abordée, est un avantage clé par rapport par exemple aux ARNm. Des études ont montré que le stockage à température ambiante pendant 24h a un effet minime sur la stabilité des miARNs endogènes dans du plasma humain.⁸⁶ Un stockage à -80°C après extraction ne semblerait pas affecter les miARNs après une période de 10 mois.¹⁰¹ De même, d'autres équipes ont montré qu'un stockage pendant 2 à 4 ans à -20°C affecte très faiblement les miARNs. En revanche, après 6 ans de conservation, les échantillons sont dégradés, cet effet est encore plus prononcé après 10 ans de stockage.¹⁰² Cependant toutes ces données laissent une marge de manœuvre très large dans le stockage des miARNs, sauf dans le cas d'études rétrospectives qui doivent être abordées avec attention.

La composition en cellules sanguines a elle aussi une influence importante sur la mesure. En effet, il a pu être montré que 60% des molécules (protéines, ARN, ADN, etc.) présentes à l'intérieur d'une cellule tumorale peuvent aussi être trouvées dans les cellules sanguines (typiquement les leucocytes).¹⁰³ Ainsi les auteurs de l'étude montrent qu'un facteur 50 peut intervenir dans la mesure de miARN suite à une hémolyse des cellules sanguines. Ceci est dû au fait que les cellules sanguines relarguent des miARNs en circulation, la mesure ne sera donc plus juste l'image des miARNs provenant de cellules tumorales mais la somme des miARNs présents dans les cellules sanguines et tumorales. C'est pour cela qu'il est essentiel de traiter le sang par un anticoagulant, tel l'EDTA, afin de collecter par centrifugation le plasma tout en se débarrassant des cellules sanguines avant d'entreprendre le dosage des miARNs circulants. Concernant la détection de miARNs à partir de cellules, les limitations sont beaucoup moins importantes. Les tissus prélevés par biopsie sont souvent fixés au formol et inclus en paraffine, ou alors congelés, ce qui permet dans les deux cas de conserver l'intégrité des cellules d'intérêt pendant des années. Un paramètre important reste le temps entre prélèvement des tissus et fixation. Il peut aussi arriver que les échantillons soient mal fixés, comme ça peut être le cas avec des cellules d'os qui sont difficiles à manipuler. Néanmoins si la fixation est faite correctement alors aucune différence ne peut être établie entre des échantillons fixés et ceux fraîchement congelés.¹⁰⁴

1.2.2. Approches standards d'extraction des miARNs

Après récolte de l'échantillon, il est important d'isoler les miARNs des autres composants présents dans les fluides corporels ou bien des débris cellulaires et tissulaires. Ces étapes d'extraction sont relativement standardisées et reposent essentiellement sur une extraction par séparation de phase et/ou une purification à l'aide de colonnes de silice qui permettent d'adsorber spécifiquement les ARNs. Ces contraintes de purification sont liées aux méthodes de détection standards (que nous décrirons dans la suite du manuscrit) qui impliquent des réactions enzymatiques et nécessitent donc un matériel d'une grande pureté et l'absence de contaminants pouvant entraver la détection et la quantification des analytes.

1.2.2.1. Extraction par séparation de phases selon le protocole phénol-chloroforme

L'extraction à l'aide de phénol et de chloroforme, aussi appelés TRIzol-chloroforme ou Qiazol selon le fournisseur, a pour la première fois été mise en place en 1987 par Chomczynski et Sacchi.¹⁰⁵ Cette méthode d'extraction couple du phénol ($C_6H_5O_5$) et du chloroforme ($CHCl_3$) avec un agent chaotropique, c'est-à-dire un agent qui permet de casser les structures 3D des protéines (plus particulièrement les RNases et les RBPs, pour *RNA binding protein* en anglais). Il en existe différents types dont le thiocyanate de guanidinium ($[CH_6N_3]^+SCN^-$). Cet agent permet, de plus, de dénaturer les différentes molécules d'intérêts. Cette méthode présente l'avantage de permettre la séparation des protéines, de l'ADN et de l'ARN en une seule et même étape. En effet, alors que les protéines s'accumulent dans la phase organique, les molécules d'ARN se retrouvent, quant à elles, dans la phase aqueuse. Habituellement, les protéines sont elles aussi solubles dans l'eau, cependant l'ajout de phénol vient perturber la polarité de ces molécules (de par leur dénaturation) et rend leur solubilité meilleure dans une phase organique. L'ADN demeure à l'interface des deux phases ainsi formées après centrifugation à 4°C et 12 000 xg. Cette méthode permet aussi d'isoler les courtes séquences d'ARN. Les séquences d'ARN sont ensuite précipitées par ajout d'isopropanol, qui sera éliminé après un lavage à l'aide d'éthanol. Cependant il peut parfois être difficile de récupérer le culot d'ARN alors formé en cas de concentration très faible (typiquement < 10 µg/mL).¹⁰⁶ Certaines équipes rapportent des temps de précipitation très longs (« overnight ») couplés à des centrifugations (20 000 xg pendant 1h à 4°C) afin de permettre la récupération du matériel.¹⁰⁷ Il est possible d'améliorer la précipitation de ce dernier en ajoutant des « transporteurs » tels que le glycogène.¹⁰⁸

Il a cependant pu être montré qu'une extraction au TRIzol pouvait engendrer des rendements différents selon la séquence des miARNs étudiés,¹⁰⁹ cette découverte a engendré la rétraction d'un précédent article de Kim *et al.* qui avaient associé des variations en niveau de miARN à des origines biologiques.¹¹⁰ Des tentatives de simplification de cette étape de séparation ont récemment été réalisées, afin de limiter les erreurs de manipulation. On note, par exemple, l'arrivée sur le marché du kit Direct-zol™ (Zymo Research), qui pourrait permettre une meilleure répétabilité de cette étape d'extraction compliquée.

1.2.2.2. Purification basée sur des colonnes en silice

Il est aussi possible d'utiliser des kits d'extraction dédiés aux miARNs, ces derniers sont toujours d'origine commerciale et il en existe une multitude : miRNeasy® (Qiagen), miRCURY™ (Exiqon) ou encore miRVana™ PARIS™ (Thermo Fisher). Le principe de ces kits repose sur une colonne de filtration en silice sur laquelle les miARNs s'adsorbent par interactions électrostatiques. Ces kits peuvent permettre d'éviter l'étape de séparation de phase mais ceci n'est pas le cas pour certains d'entre eux tels que miRNeasy® ou le miRVana™ PARIS™ qui reposent sur elle, alors que les autres méthodes utilisent des tampons de lyse classiques. Après filtration, la méthodologie préconisée par les différents fabricants est souvent similaire : des étapes de rinçage sont nécessaires afin de purifier efficacement l'échantillon. La concentration d'alcool des solutions de rinçage est ici très critique car elle est déterminante afin d'obtenir un rendement maximal de récolte de miARNs. Ces protocoles sont de plus parfois modifiés par les différentes équipes de recherche qui proposent alors des optimisations souvent dédiées à leur application (volume d'échantillon, solution de rinçage, solution d'élution, etc.). On comprend alors que la comparaison des résultats devient très critique et les disparités observées deviennent naturelles, car liées fortement au protocole d'extraction. L'évaluation et la comparaison de ces kits est parfois faite par la communauté scientifique mais les voies vers la standardisation sont toujours très limitées.^{111,112} Cet effort de standardisation sera, en revanche, inévitable pour une utilisation clinique des miARNs, et dépendra de l'activité des services cliniques de biologie.

1.2.3. Méthodes de quantification et de qualification des échantillons extraits

Nous allons présenter dans cette partie les différentes manières de caractériser l'échantillon biologique après extraction. Cette étape est primordiale, elle permet notamment de qualifier la pureté

et l'intégrité de l'échantillon, cette dernière aura des conséquences directes sur les étapes de détection. Cette caractérisation permet de plus de connaître la concentration en ARN total, permettant ensuite une détection à quantité d'ARN total constante d'un échantillon à l'autre. Certaines méthodes de caractérisation permettent d'aller plus loin en évaluant le profil en taille des ARNs de l'extrait.

1.2.3.1. ARN total

Dans le cas de l'ARN total (ARN messenger, ARN de transfert, miARN, etc.), l'intérêt de la mesure est de d'accéder à la quantification la plus exacte possible de l'échantillon avant l'étape de détection. En effet, les standards de mesures biologiques tels que la RT-qPCR détecte un taux de miARNs par rapport à une quantité d'ARN total constante dans l'échantillon de départ généralement de l'ordre de 10 ng (ou plusieurs centaines de ng dans le cas d'analyse des ARNm). Ces méthodes sont néanmoins remises en question pour des quantités faibles d'ARN total (c'est-à-dire des quantités typiquement inférieures au ng/ μ L), tel qu'on peut l'observer après extraction à partir de plasma, car leur sensibilité ne permet pas une quantification robuste.¹¹³ Certaines études procèdent donc « à l'aveugle », en utilisant un volume constant de plasma extrait pour la détection de miARN plutôt qu'une quantité constante d'ARN après extraction (pour éviter de diluer un matériel déjà présent en trop faible concentration).^{88,114}

La première méthode pour qualifier l'ARN total est la spectrophotométrie comme le Nanodrop qui a une sensibilité de l'ordre du ng/ μ L. Cette méthode consiste en la mesure du spectre d'absorbance de l'échantillon à partir duquel il est possible de déterminer la concentration en ARN total. Dans le cas des acides nucléiques, l'absorbance maximum est à 260 nm, d'après la loi de Beer-Lambert on peut alors calculer la quantité d'acide nucléique en solution. Il sera alors difficile de faire une différence entre les ADNs double ou simple brin et les ARNs. Cependant des informations sur le manque de pureté de l'échantillon dû à la persistance de traces de phénol sont observables sous forme d'un spectre anormal entre 220 et 240 nm ou un décalage du pic d'absorbance des acides nucléiques (cf. Figure 1-9).¹¹⁵ De même, le ratio entre les absorbances à 260 nm/280 nm permet de qualifier la contamination en protéines de l'échantillon extrait.

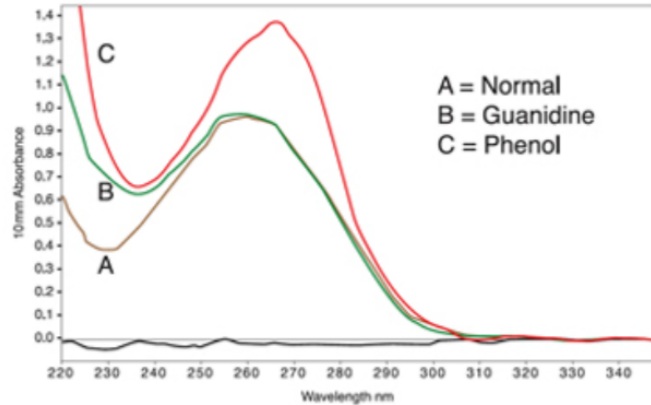


Figure 1-9 : exemple de spectres d'absorbance pouvant être obtenus avec un instrument tel que le Nanodrop : dans le cas de la mesure A, le pic à 260 nm est caractéristique de la présence d'acides nucléiques en solution, dans les cas B et C on observe un décalage du spectre dû à la présence d'impuretés en solution.¹¹⁵

Une autre approche est de marquer en fluorescence les séquences d'ARN total. Le marquage des acides nucléiques et la mesure de la fluorescence associée à un échantillon permettent de déterminer, en comparaison à une échelle de calibration, la concentration d'acides nucléiques présents dans la solution. Il existe un grand nombre de marqueurs fluorescents plus ou moins spécifiques, aux acides nucléiques (ADN simple ou double brin, ARN, miARN), comme discuté par El-Khoury *et al.*¹¹⁶ Ces marqueurs fluorescents sont en interaction électrostatique avec les chaînes d'acide nucléiques, et émettent seulement lorsqu'ils sont liés à une séquence. L'avantage certain de la mesure par fluorescence est la sensibilité accrue de l'ordre de la centaine de ng/mL comme c'est le cas pour le marquage type Qubit® qui est utilisé dans de nombreuses études^{117,118} ou encore le RiboGreen®.¹¹⁹ Cependant, aucune information sur la pureté de l'échantillon n'est accessible avec ces méthodes de caractérisation.

De plus, les deux méthodes mentionnées ici ne caractérisent pas le rendement en fonction de la taille des chaînes. Ainsi, si les séquences courtes ne sont pas présentes ou ont été moins bien extraites que les longues séquences, alors l'analyse sur 10 ng d'ARN total sera erronée car elle sera faite sur un nombre important de longs ARNs (tels que les ARNs ribosomiques non codants qui sont très présents alors que les ARNm ne représentent que 5% des extraits) et peu de courtes séquences. Afin de caractériser la qualité de l'extraction en taille, on parle alors d'index d'intégrité. Cette variable correspond la plupart du temps au ratio entre l'expression des ARN ribosomiques 28S et 18S qui sont très fortement exprimés dans les cellules et qui, par conséquent, sont indicatifs d'un état général de préservation/dégradation des ARN cellulaires sans plus d'information concernant chaque sous classe d'ARN.

1.2.3.2. Profil en taille des ARNs

Il a été montré dans le cas des ARNs que le degré d'intégrité pouvait affecter fortement la détection par RT-qPCR contrairement à une PCR classique.¹²⁰ Des efforts doivent donc être menés pour que cette caractéristique soit connue lors de détection des miARNs. Il a par ailleurs été démontré que la dégradation des plus longs fragments d'ARN pouvait mener à une surestimation du niveau de miARNs.¹²¹

Afin de pouvoir mesurer individuellement la quantité d'ARNs de différentes tailles, il est indispensable de les séparer. Pour ce faire, on utilise le principe de l'électrophorèse qui consiste à la migration des acides nucléiques dans un gel (aussi appelé matrice solide) contenant des pores dans lesquels les plus courtes séquences vont migrer plus vite. La migration dépend d'une forte tension qui, de par la présence de charges négatives sur l'atome phosphate des nucléotides composant les séquences ADN ou ARN, s'accompagne du déplacement des séquences vers le pôle positif imposé par le champ électrique. Un détecteur en fluorescence ou UV permet d'évaluer le temps de passage d'une molécule devant le détecteur, ce temps étant directement relié à sa taille.

Ce type de séparation peut être implémenté sur capillaire ou bien sur puce microfluidique. Contrairement aux électrophorèses classiques, la réduction des dimensions avec ce type de technologies présente l'avantage de permettre une meilleure dissipation thermique, et donc l'application de champs électriques plus importants, poussant les limites de détection à la dizaine de ng/mL.

Plusieurs technologies telles que le Fragment Analyzer (AATI) en électrophorèse capillaire ou le Bioanalyzer (Agilent) en format puce microfluidique sont aujourd'hui utilisées en routine dans les laboratoires de recherche et de biologie clinique afin de caractériser les échantillons extraits.

1.2.4. Mesure d'expression génique

Une fois l'échantillon purifié, quantifié et validé, il est possible de détecter une séquence spécifique. Plusieurs méthodes sont bien connues, nous allons les aborder dans la suite par ordre chronologique d'apparition. Notons cependant que la RT-qPCR reste le standard le plus utilisé dans les laboratoires de biologie depuis son arrivée dans les années 1990.

1.2.4.1. Northern Blot

Le Northern Blot est une adaptation à la détection d'ARN du Southern Blot mis en place par Edwin Southern en 1975,¹²² qui permettait la détection spécifique de séquence ADN. Aussi appelé transfert d'ARN, il consiste en un gel d'électrophorèse qui permet dans un premier temps la séparation des ARNs en fonction de leur taille, comme décrit dans la section précédente, en condition dénaturante. Le formaldéhyde utilisé en routine peut être remplacé par de l'urée pour améliorer la dénaturation des ARNs de courte taille.¹²³ Après séparation des ARNs, ces derniers sont transférés sur une membrane en nylon par capillarité et pression. Cette étape de report est nécessaire afin de pouvoir effectuer la révélation avec des sondes spécifiques aux séquences ARNs à détecter. L'étape de détection est réalisée à l'aide d'une sonde complémentaire ADN, ARN ou encore incorporant des nucléotides de type LNA (Locked Nucleic Acid) marquée de façon radioactive, ou plus récemment, avec un fluorophore.^{124,125} Malgré sa bonne sélectivité, cette méthode contient beaucoup de limites telles que l'utilisation de produits dangereux (formaldéhyde), la faible sensibilité ainsi que le nombre important d'étapes pour arriver aux résultats menant à un temps de détection très long (~ 4 jours).¹²⁶ Elle est, par conséquent, de moins en moins utilisée de nos jours car très contraignante malgré l'avantage d'être une méthode quantitative qui permet également de connaître la taille des ARNs détectés.

1.2.4.2. La RT-qPCR

La PCR, pour *polymerase chain reaction* en anglais, a été pour la première fois mise en place en 1985 par Mullis,¹²⁷ qui recevra le prix Nobel de chimie huit ans plus tard pour cette découverte. Cette méthode de détection se base sur l'amplification de séquences d'oligonucléotides via des réactions enzymatiques. Une solution de PCR est généralement composée des séquences à amplifier, d'amorces ADN complémentaires à la cible, de nucléotides libres (qui permettront la réplication des nouvelles séquences) et, bien sûr, de l'enzyme polymérase qui permet l'élongation des nouvelles séquences ADN dans le sens 3' vers 5'. Des concentrations en ions bivalents (e.g. Mg^{2+} ou Mn^{2+}) et monovalents (K^+) sont nécessaires afin d'obtenir une réaction enzymatique optimale. Une fois le matériel en solution, la PCR se base sur des cycles en température afin d'actionner l'amplification. Une étape de dénaturation à une température de 95°C est tout d'abord effectuée afin de casser les structures secondaires et d'ouvrir ainsi la matrice, les amorces sont ensuite hybridées à leur séquence d'ADN cible à une température comprise entre 50 et 65°C (température d'hybridation) pour finalement se placer à 72°C,

température optimale de fonctionnement de la polymérase et permettre ainsi l'élongation de la chaîne naissante (température d'élongation) (cf. Figure 1-10).

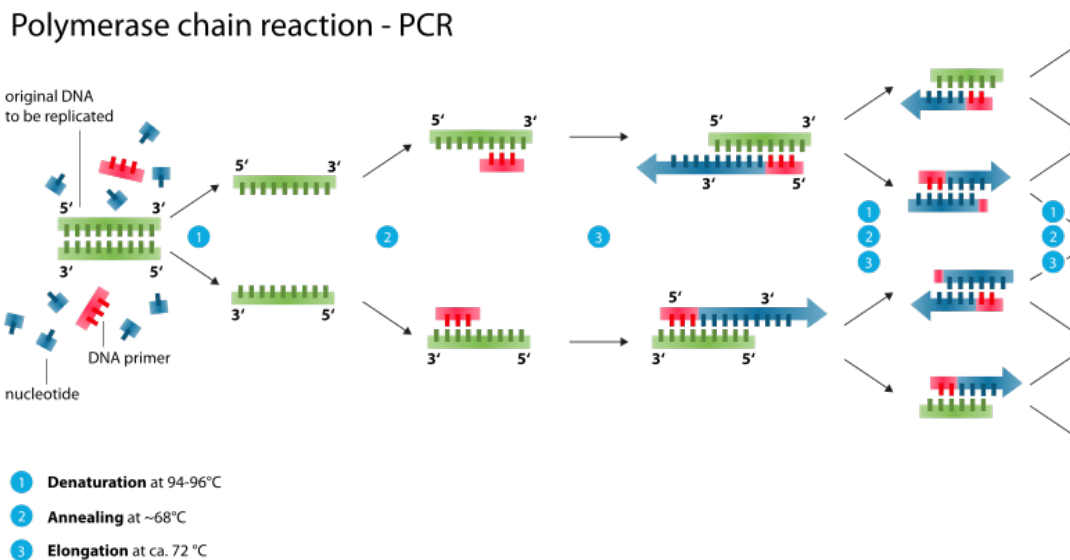


Figure 1-10 : principe de l'amplification par PCR, les séquences cibles (en vert) sont d'abord dénaturées (étape 1) puis appariées avec les séquences d'amorce (en rouges) (étape 2) et enfin leur élongation est effectuée à l'aide des nucléotides présents dans le mix de réaction (en bleus) (étape 3), ces étapes sont répétées pendant un nombre de cycle fixé par l'expérimentateur.¹²⁸

Dans le cas de la détection d'ARN, l'étape de PCR doit être précédée d'une RT (transcription inverse ou *reverse transcriptase* en anglais), c'est-à-dire d'une transcription inverse des ARNs en séquences d'ADNs complémentaires (ANDc). Cette conversion des ARNs en ANDc rencontre des limitations dans le cas des miARNs, de par leur petite taille mais également en raison de la présence dans l'extrait de pre-miARNs et pri-miARNs qui peuvent entrer en compétition.⁴¹ Pour permettre cette transcription inverse il est possible d'utiliser des amorces spécifiques aux miARNs, ou alors d'ajouter une queue de nucléotides aux miARNs à l'aide d'une ligase à laquelle l'amorce sera spécifique. La première méthode permet de réduire le bruit de fond, alors que la seconde, plus universelle, laisse plus de place à la détection de plusieurs cibles en même temps. On peut noter cependant qu'Ozsolak *et al.* ont montré en 2009 la possibilité d'une PCR adaptée à la détection directe d'ARN.¹²⁹

Des améliorations technologiques ont permis par la suite le développement de la qPCR (PCR quantitative), le suivi de la détection s'est fait dans un premier temps par incorporation de bromure d'éthidium.¹³⁰ La qPCR se distingue ici de la PCR classique (aussi appelée PCR point final) où la mesure était déterminée à la fin des n cycles. Dans le cas de la qPCR une mesure en fluorescence est réalisée

automatiquement après chaque cycle d'amplification, on parle donc de PCR en temps réel. Aujourd'hui, deux technologies sont principalement utilisées. La première consiste à utiliser un intercalant, comme le SYBR Green, dont la fluorescence est multipliée par 100 lorsqu'il est lié à une séquence double brin d'ADN. On comprend que le SYBR Green n'est pas spécifique à une séquence, il peut donc détecter des produits d'ADN double brin non spécifiques de la qPCR, ou même des dimères d'amorces. L'analyse de la courbe de fusion en fin de détection permet de s'assurer de la spécificité de l'amplification.

La détection des produits ADN par une sonde TaqMan est en revanche beaucoup plus spécifique. Cette sonde est marquée avec un fluorophore à une extrémité et un désactivateur (c'est-à-dire une molécule permettant d'absorber l'émission de lumière par le fluorophore) à l'autre extrémité de la séquence complémentaire aux cibles ADNs. Du fait de la proximité du fluorophore et du désactivateur, on mesure une absorption de la lumière émise. En revanche, lors de l'étape d'amplification, c'est l'activité de l'exonucléase qui entraîne le clivage de la séquence TaqMan lorsque cette dernière se trouve en interaction avec la séquence ADN cible. On observe alors une augmentation du signal fluorescent du fait de l'éloignement du désactivateur par rapport au fluorophore. Cette approche a l'avantage d'avoir une excellente sensibilité et autorise la détection de plusieurs cibles en même temps (cf. Figure 1-11).⁴¹

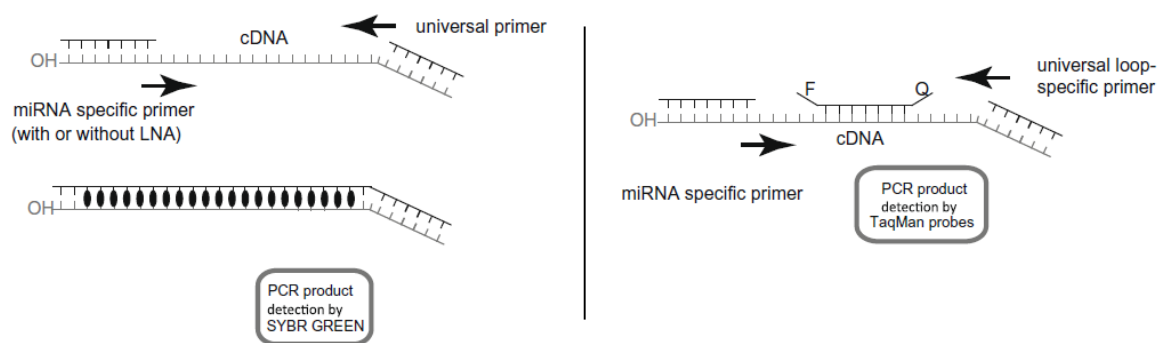


Figure 1-11 : comparaison entre les marquages au SYBR GREEN (à gauche) et avec une sonde TaqMan (à droite).⁴¹

Comme le montre la littérature, la détection par RT-qPCR est clairement identifiable comme le standard en terme de sensibilité et de sélectivité dans la détection de séquences miARNs connues. Elle est aussi largement utilisée comme référence pour la validation et la comparaison de nouvelles plateformes de détection.

1.2.4.3. Méthode de détection sans amplification

1.2.4.3.1. Les puces à ADN

Les puces à ARN, aussi appelées *microarrays* en anglais, sont des matrices de sondes complémentaires spécifiques aux miARNs étudiés. Ces sondes ADN sont greffées sur une surface généralement en verre via des groupements amine en fin de chaîne. Dans le même temps, les miARNs sont habituellement marqués avec un fluorophore (cf. Figure 1-12). Une analyse par mesure de fluorescence pour chaque spot d'ADN, dont la spécificité est connue, rend alors possible la détermination du niveau d'expression des différents miARNs. Cette technique de détection a été largement utilisée pour la détection et la quantification des miARNs¹³¹⁻¹³³ même si des étapes de validation par RT-qPCR sont souvent nécessaires.^{82,134} Le design des sondes est une étape cruciale : en effet, les affinités des différents couples ARN/ADN doivent être très proches, sans quoi les niveaux de fluorescence ne seront pas comparables car un taux d'hybridation donné ne sera pas équivalent à la même concentration de cible miARNs en solution d'un duplex à l'autre. Il est alors possible de jouer sur la longueur de la sonde ou bien d'intégrer des bases LNA dans la séquence sonde¹³⁵ pour équilibrer les constantes d'association. La méthode de marquage des miARNs est elle aussi discutable car elle peut mener à de mauvais rendements et influencer la mesure.

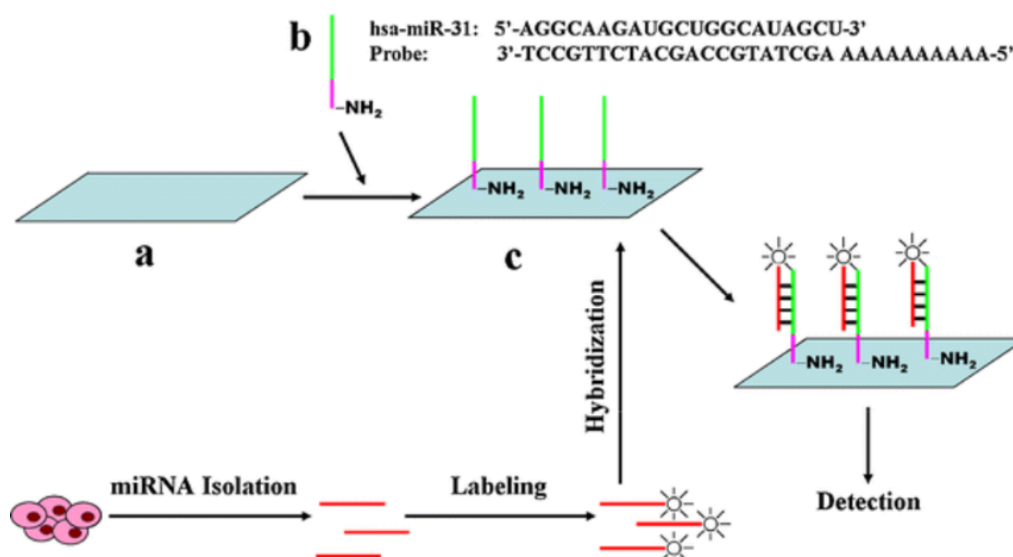


Figure 1-12 : principe de fonctionnement des microarrays. Des sondes complémentaires aux séquences cibles sont greffées chimiquement sur une surface, une étape d'interaction avec les cibles préalablement marquées permet leur capture et leur détection.¹³⁶

Bien que les approches par *microarray* soient peu coûteuses et permettent de détecter un nombre important de cibles sur une même puce, on peut relever que les temps d'incubation de ces méthodes sont très longs (~ 18h). De plus les quantités d'ARN total nécessaires à la détection des miARNs sont très importantes (de l'ordre du µg).¹³⁷

1.2.4.3.2. Le nanostring

En 2008, une nouvelle technologie similaire aux *microarrays* : le nanostring, est devenue accessible aux chercheurs pour la quantification de l'expression génique¹³⁸. La première application dédiée aux miARNs a été publiée dès 2012 par Nuovo *et al.*¹³⁹ avec la détection de plus de 700 miARNs simultanément. Cette méthode dépend de la cible recherchée et notamment de sa taille ; dans le cas des miARNs, les séquences miARNs subissent dans un premier temps une ligation avec une séquence contenant un code-barre constitué de six marqueurs fluorescents : l'ordre dans lequel ils sont disposés permet d'identifier la séquence miARN ciblée lors de l'étape d'analyse. Cette ligation s'effectue à l'aide d'une troisième séquence qui fait office de « pont » entre le code barre et la séquence miARN (cf. Figure 1-13). La première étape consiste donc à effectuer cette hybridation, précédée d'une dénaturation et succédée par une purification, via des réactions enzymatiques afin d'éliminer les codes-barres en excès. L'étape d'hybridation dure au moins 12h et se pratique à 65°C. Les codes-barres sont ensuite adsorbés sur une surface en métal via l'application d'un courant et l'analyse assistée par ordinateur permet de compter le nombre de codes-barres correspondants aux différentes séquences recherchées. Bien que souvent décrite comme plus sensible, cette technique se rapproche de la sensibilité des *microarrays*,¹⁴⁰ sa sélectivité serait en revanche nettement améliorée.¹⁴¹

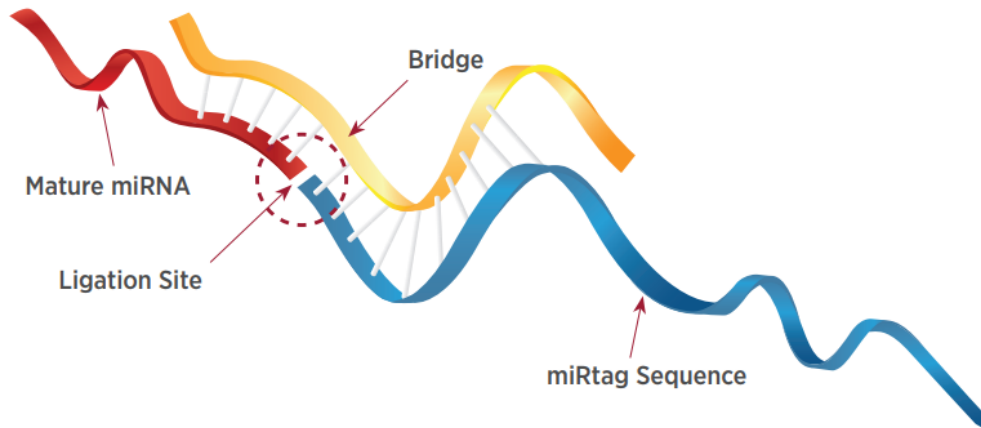


Figure 1-13 : principe de la ligation des miARNs à leur code-barre avec le protocole Nanostring : les séquences matures sont dans un premier temps liées à la séquence code-barre (miRtag) via une séquence « pont » qui permet, par la suite, la ligation enzymatique des deux séquences suivie par une étape de purification.¹⁴²

1.2.4.4. Séquençage

Afin de clore cette partie concernant les méthodes de détection des miARNs, nous allons aborder une méthode très puissante : le NGS (en anglais, *next generation sequencing*). Cette méthode est apparue il y a dix ans et ne cesse depuis de dévoiler ses larges possibilités dans le séquençage. Plus que la détection de gènes, de mutations ou, plus généralement, de séquences spécifiques, cette méthode permet la découverte de nouvelles séquences, nucléotide par nucléotide. L'histoire du NGS est longue et a débuté dès les années 1970 avec l'approche « *plus and minus* » développée par Sanger¹⁴³ dont le but ultime était de parvenir à séquencer le génome humain. Ce fut chose faite, après de multiples améliorations technologiques, en 2004.¹⁴⁴ Cette même année le *National Human Genome Project* finança un programme avec pour but de réduire le coût du séquençage d'un génome entier en dessous de 1000 dollars. C'est cette impulsion couplée à différents sauts technologiques, tels que la PCR (déjà décrite) et l'arrivée de la bio-informatique, qui ont permis de donner naissance au NGS. On peut aussi noter l'effort international fourni pour atteindre ce graal.¹⁴⁵ Nous n'avons pas pour prétention ici de décrire dans leur intégralité les différentes technologies liées au NGS, très diverses et déjà largement décrites dans la littérature.¹⁴⁶ De manière succincte, les molécules d'ARN ou d'ADN sont d'abord fragmentées en des séquences plus courtes allant de 50 à 500 nucléotides puis liguées à un adaptateur, c'est-à-dire une séquence simple brin connue. Ensuite, une sélection en taille des séquences est effectuée afin de les concentrer et de purifier la solution des séquences non incorporées. Enfin, une étape de PCR est réalisée afin d'amplifier le matériel avant lecture (cf. Figure 1-14).¹⁴⁷ Pour ce faire, les molécules à lire sont fixées sur une surface (ou des billes) via une hybridation avec la séquence

adaptée connue. Les séquences auxquelles elles se lient font alors office d'amorce pour le séquençage. Plusieurs méthodes de détection des nucléotides sont possibles comme, par exemple, une détection en fluorescence (un type de base étant lié à un fluorophore spécifique) dans le cas de plateforme Illumina.

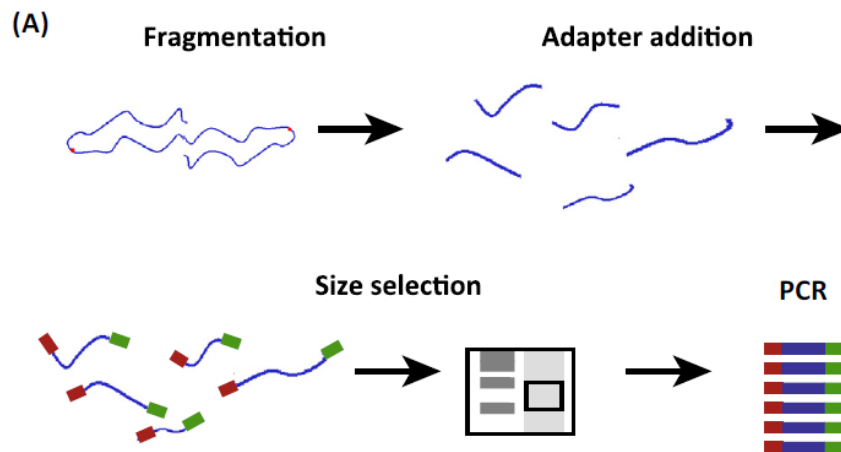


Figure 1-14 : étapes de préparation avant séquençage. Les séquences sont fragmentées puis liguées à un adaptateur qui permettra leur amplification spécifique après séparation en taille.¹⁴⁷

Cette technique a eu des répercussions significatives dans la recherche en cancérologie. Elle a pu, par exemple, permettre la détection d'environ 140 gènes (ATM, BRCA1, SMAD2, etc.) qui, s'ils subissent des mutations, peuvent être impliqués largement dans le développement des tumeurs. Il est considéré qu'une tumeur abrite en moyenne deux à huit altérations pour ces gènes.¹⁴⁸ De plus la technologie NGS a permis la validation d'un nombre important de miARNs dont les séquences n'étaient pas connues et dont l'expression était retrouvée altérée dans les tumeurs.¹⁴⁹ De nos jours, nous assistons à l'émergence d'une troisième génération de séquenceur qui présentent pour objectif principal de permettre le séquençage de cellule unique en temps réel tout en gardant une proximité technologique avec les générations précédentes.¹⁵⁰ Le coût de ces approches reste néanmoins très élevé et lié au débit d'échantillons analysés. On note, de plus, que la quantité de matériel nécessaire à la détection est très importante.

1.2.5. Bilan

La cascade d'opérations menant à la quantification d'une séquence de miARNs est très longue et peut présenter des biais à toutes les étapes du processus, de la collection d'échantillon jusqu'à la détection, en passant par des étapes d'extraction (cf. Figure 1-15).

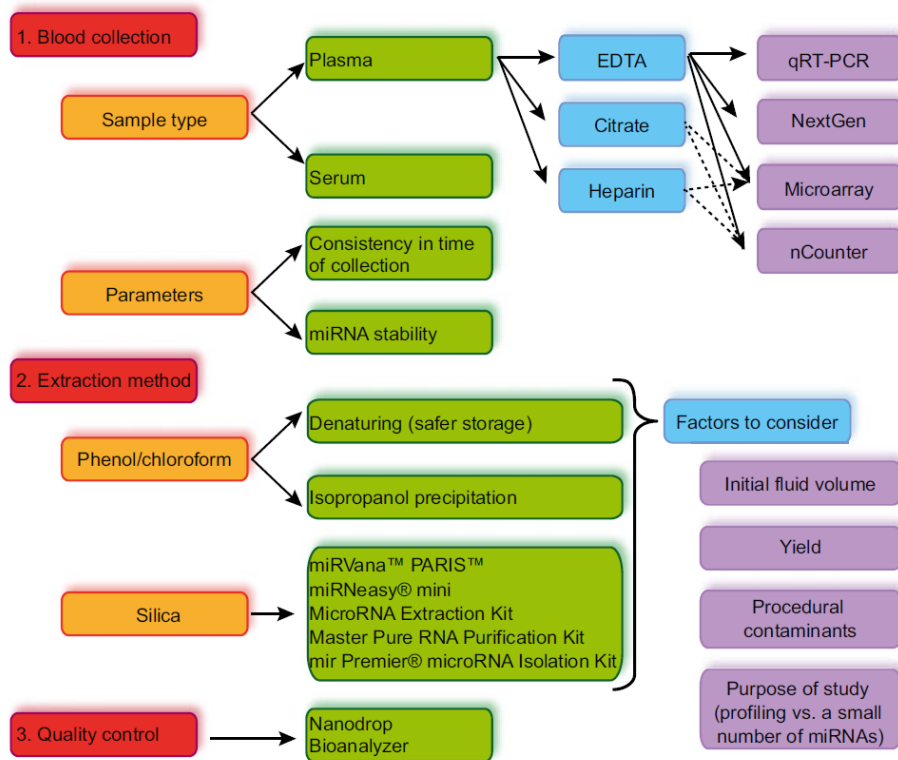


Figure 1-15 : bilan des différentes étapes de préparation des miARNs.¹⁵¹

Il nous a semblé important de souligner et d'analyser en détail les standards utilisés aujourd'hui afin de faciliter la qualification des miARNs en tant que biomarqueurs. Cette étude scrupuleuse permet de mettre en avant les limites certaines des méthodes de détection en biologie. Leur évolution est cependant très positive et s'accélère pour faire face au défi d'enjeu sociétal qu'est la détection et la prise en charge du cancer. Dans ce contexte, nous assistons depuis une dizaine d'année à l'émergence d'une science à l'interface entre la biologie et les nanotechnologies, issus des progrès phénoménaux de la technologie silicium liée à la micro et nano électronique. A la croisée de ces deux disciplines, une multitude d'approches émergent pour la détection des miARNs avec pour but ultime l'application clinique. Nous allons en faire l'analyse dans la prochaine partie de ce manuscrit.

1.3. Les micro et nanotechnologies pour la biodétection des miARNs

Nous discuterons dans cette partie des approches basées sur les micro et nanotechnologies pour la détection des miARNs. Après un bref historique et la mise en place de considérations sur le réel potentiel d'utilisation de ces technologies en clinique, un effort sera fait pour mettre en avant les applications au plus proche de l'analyse d'échantillons complexes.

1.3.1. Histoire et intérêt des micro et nanotechnologies pour la biologie

La micro-électronique se base sur l'industrie des semi-conducteurs apparue à la fin des années cinquante. Les matériaux semi-conducteurs, de par leurs propriétés uniques de conduction du courant, sont à la base des circuits électriques intégrés. En effet, il est possible de contrôler localement leurs propriétés électriques en intégrant des défauts (typiquement l'insertion d'atomes accepteurs ou donneurs d'électrons, e.g. de bore ou phosphore) dans leurs structures : on parle de dopage du matériau. Cette modification par dopage a permis la réalisation technologique des transistors bipolaires, puis MOS. Ce composant est une porte logique qui constitue la brique élémentaire de tout circuit intégré aujourd'hui. C'est la réduction des dimensions de ce composant qui fut à l'origine des premiers pas vers la miniaturisation des circuits électroniques.

On parlait déjà, dans les années soixante, d'électronique moléculaire (comme on parle de nanoélectronique aujourd'hui), technologie qui permettrait d'atteindre des niveaux de miniaturisation encore plus poussés. Depuis, l'industrie (Westinghouse, IBM ou encore AT&AT) a, conjointement avec la recherche académique, permis le développement de nouvelles approches techniques pour réduire la dimension des composants fabriqués par la filière silicium.¹⁵² On a pu observer alors un parfait respect de la loi de Moore¹⁵³ qui prévoyait dès 1965 que le nombre de transistors pour une surface donnée doublerait quasiment tous les 18 mois (cf. Figure 1-16).

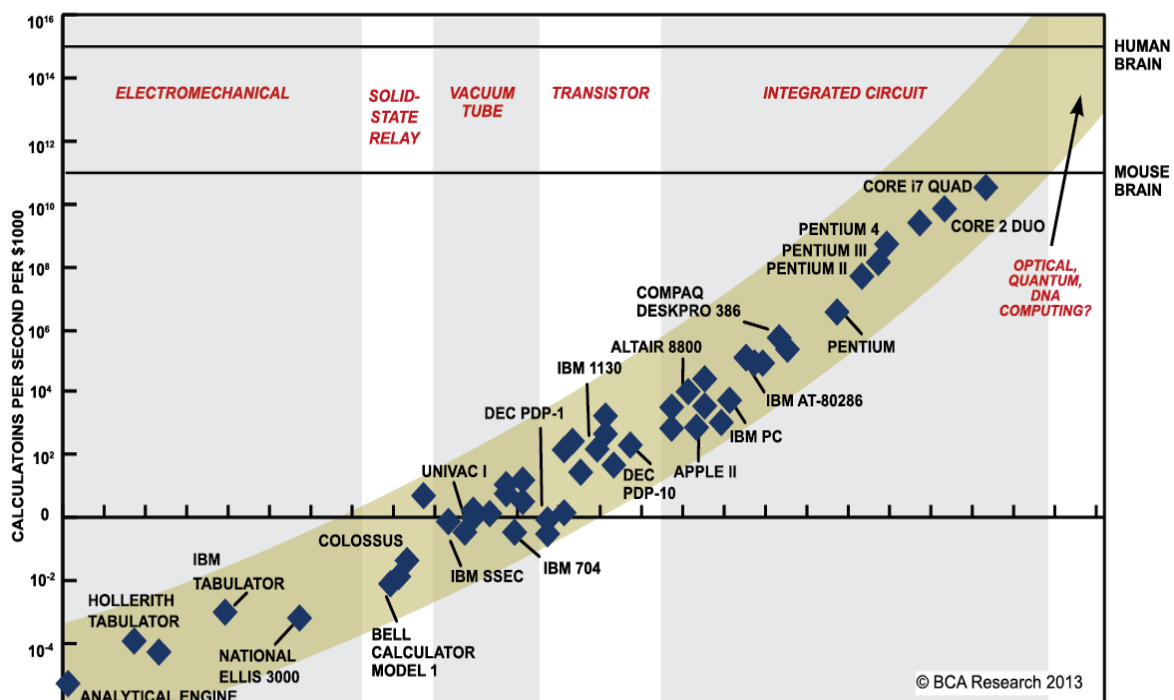


Figure 1-16 : loi de Moore qui représente l'évolution des performances atteintes en micro et nanofabrication via la mesure du nombre d'opérations logiques pouvant être réalisées par seconde à coût constant. C'est l'arrivée de nouvelles technologies, e.g. les circuits imprimés réalisés en salle blanche, qui permet de continuer encore aujourd'hui à repousser la limite atteinte.¹⁵⁴

Les progrès opérés dans la micro et nanofabrication du silicium ont permis la réduction des dimensions des dispositifs électroniques. Les conséquences directes se sont produites dans le domaine de l'informatique, mais l'intégration de plus en plus poussée de la microélectronique a aussi permis la mise en place de nouvelles générations de capteurs. Le premier pas fait vers la biologie de la part des physiciens et électroniciens a été la mesure de concentration d'espèces chimiques en solution. On parlait alors de biocapteurs pour tout instrument qui permettait de faire une mesure dans un système biologique (pH, température, etc.).¹⁵⁵ Cependant cette notion a très rapidement évoluée, et c'est au début des années soixante que Clark définit le biocapteur comme la combinaison d'une couche de reconnaissance biologique avec un capteur physique^{156,157} en fonctionnalisant des électrodes avec des enzymes permettant la mesure de la concentration d'oxygène. Les mesures étaient alors essentiellement effectuées via des capteurs électrochimiques. Les couches sensibles ont ensuite pu être couplées à des capteurs optiques, mécaniques, etc. De plus, alors que les enzymes ont un effet catalytique sur les réactions mises en jeu, il a été par la suite mis en place des couches d'éléments spécifiques (avec une grande affinité) aux cibles recherchées tels que des anticorps, des acides nucléiques ou encore des ligands synthétiques.

Outre l'émergence des biocapteurs, les méthodes de microfabrication ont permis l'émergence de la microfluidique dès les années quatre-vingt,¹⁵⁸ c'est-à-dire de la fabrication de canaux fluidiques avec des dimensions comprises entre 1 et 100 μm comme définit par Whitesides.¹⁵⁹ Cette nouvelle approche est, en effet, une conséquence directe du développement de la technologie silicium et a permis la manipulation de fluides dans des volumes réduits (nL-fL), ainsi que des niveaux d'intégrations et d'automatisations importants.

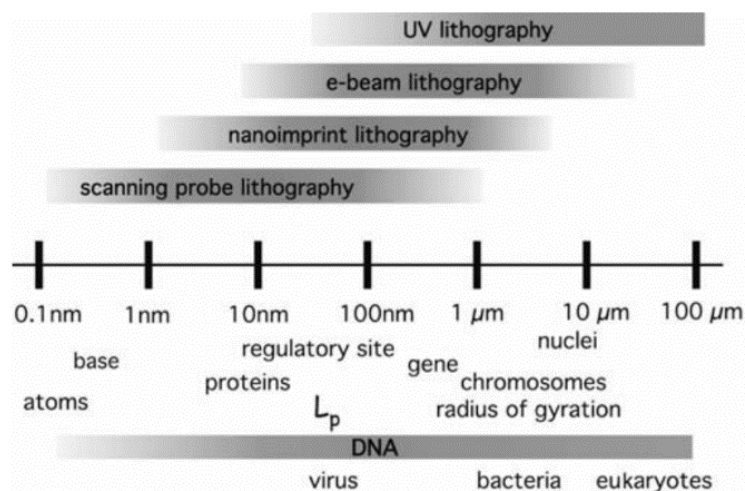


Figure 1-17 : parallèle entre les techniques de lithographie développées pour la microélectronique et la taille des objets biologiques.¹⁶⁰

On comprends alors qu'en réduisant la taille des capteurs, ainsi que des systèmes qui manipulent les objets biologiques, on se rapproche des dimensions de ces derniers, ce qui rend leur étude plus adaptée¹⁶⁰ (cf. Figure 1-17). On permet, de plus, des niveaux d'intégration très importants, c'est-à-dire la possibilité de coupler plusieurs fonctions sur un même système d'analyse. La formule « laboratoire sur puce » promet cette combinaison des fonctions multiples d'un laboratoire d'analyse, permettant alors une approche « sample-in, answer-out ».¹⁶¹ Il est difficile ici de ne pas faire l'analogie avec l'informatique : en effet, le premier ordinateur nécessitait un nombre important d'opérateurs et occupait un espace comparable à un laboratoire d'analyse médicale aujourd'hui (en 1946, le premier ordinateur occupait une surface de 137 m^2) pour des performances incomparables avec les technologies informatiques actuelles. Cependant, un tel développement dans les technologies biomédicales semble moins direct. En effet, ce développement demande des expertises dans des

domaines très variés : la microfabrication, la chimie, la biologie, la microfluidique, la bioinformatique, etc.¹⁶²

1.3.2. Vers une application clinique des micro et nanotechnologies ?

Les standards actuels utilisés en biologie pour la détection de miARNs sont rarement basés sur des technologies de micro et nano fabrication. Nous souhaitons ici démontrer les possibilités de telles approches à un niveau clinique. Nous allons nous concentrer sur les dispositifs issus des nouvelles technologies pour la détection du cancer en clinique. On peut cependant noter que les applications peuvent être déclinées à des champs cliniques vastes et variés (imagerie médicale, nanoparticules, thérapie génique, délivrance de médicament, etc.).

De manière générale, le constat en clinique démontre les limitations des méthodes *microarray* (bien que séduisantes de prime abord) qui nécessitent des marquages et des temps de manipulation longs et chers. De son côté la PCR, comme cela a déjà été décrit, repose sur une amplification et peut faire apparaître des biais qui peuvent s'avérer importants. Cette méthode reste, en revanche, très utilisée notamment dans des applications en lien avec l'oncologie, l'infectiologie et la virologie. Dans ce contexte, la demande en clinique pour des méthodes de détection plus rapides, sans marquage, directes, moins chères et fiables est constante. Mais les micro et nanotechnologies pourraient-elles satisfaire ces critères ?

Le diagnostic moléculaire et la mise en place de systèmes de détection à l'échelle de la cellule unique sont des problématiques biologiques qui intéressent de plus en plus les chercheurs et qui profitent de développements technologiques récents, comme c'est le cas de l'approche single cell 10x genomics. Ces approches permettraient, en effet, d'appréhender plus efficacement l'hétérogénéité tumorale, pour pouvoir mettre en place un diagnostic personnalisé au chevet du patient prenant ainsi la suite de la médecine de masse qui a montré certaines limitations, notamment dans la prise en charge oncologique.¹⁶³ D'autres indicateurs sont très positifs : on peut noter dans une étude de 2013 de Etheridge *et al.*¹⁶⁴ l'arrivée des nouvelles technologies en clinique. En effet, 247 études cliniques impliquent actuellement des nano et des microtechnologies, basées sur 141 produits distincts (un même produit peut parfois participer à plusieurs tests) dont 38 sont d'ores et déjà approuvés. Si une majorité des micro et nanotechnologies concerne la prise en charge du cancer, on remarque de plus qu'une grande partie des technologies associés aux différents essais sont les systèmes tests, devant

l'imagerie (cf. Figure 1-18). On peut citer, par exemple, le Verigene qui permet la détection à la fois de protéines et d'ADN sans PCR en se basant sur des technologies de type *microarray*.¹⁶⁵

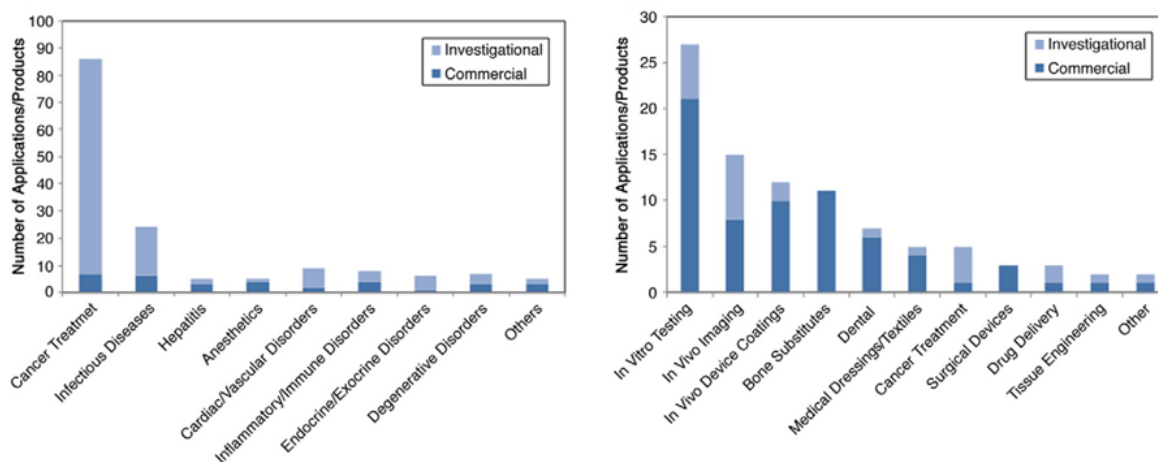


Figure 1-18 : domaines d'application des nanomédecines à visée thérapeutique (à gauche) : le traitement du cancer concentre la majorité des études. Les dispositifs associés au traitement thérapeutique sont essentiellement des tests de détection *in vitro* permettant le suivi de l'effet du traitement clinique mis en place (à droite).¹⁶⁴

Enfin, une étude plus récente discute du potentiel industriel de ces nouvelles applications biomédicales dans le domaine du cancer.¹⁶⁶ Selon les auteurs, les nouvelles technologies devront répondre à plusieurs questions dont celle (encore une fois) de la meilleure compréhension de l'hétérogénéité des cancers et des facteurs biologiques qui les influent. On note ici que des tests à valeur de diagnostic et pronostic pourraient donc permettre une meilleure connaissance des cancers mais aussi, et par conséquence, une meilleure prise en charge des patients au niveau des traitements proposés. De façon remarquable, ce type de test compagnon devrait devenir une condition *sine qua non* de la mise sur le marché des prochaines thérapies innovantes en oncologie, afin de limiter non seulement les risques d'échecs thérapeutiques et mais également de justifier le prix grandissant des nouveaux traitements.

1.3.3. Le principe de transduction : de l'évènement biologique au signal physique

Dans la suite du manuscrit, les méthodes de détection avancées se baseront toujours sur le même principe : dans un premier temps, une bio-reconnaissance des molécules spécifiques de miARNs est effectuée, on entend par bio-reconnaissance, la capture des cibles par une sonde, cela correspond

donc à la partie biologique du capteur. Cette capture doit engendrer ensuite un changement physique, on parle alors de transduction de la reconnaissance biologique en signal physique. Ce dernier peut être de natures variées : optique, mécanique ou encore électrique (cf. Figure 1-19). Ces voies comportent des avantages et limites que nous allons décrire, notamment dans le cadre de la détection et de la quantification des miARNs.

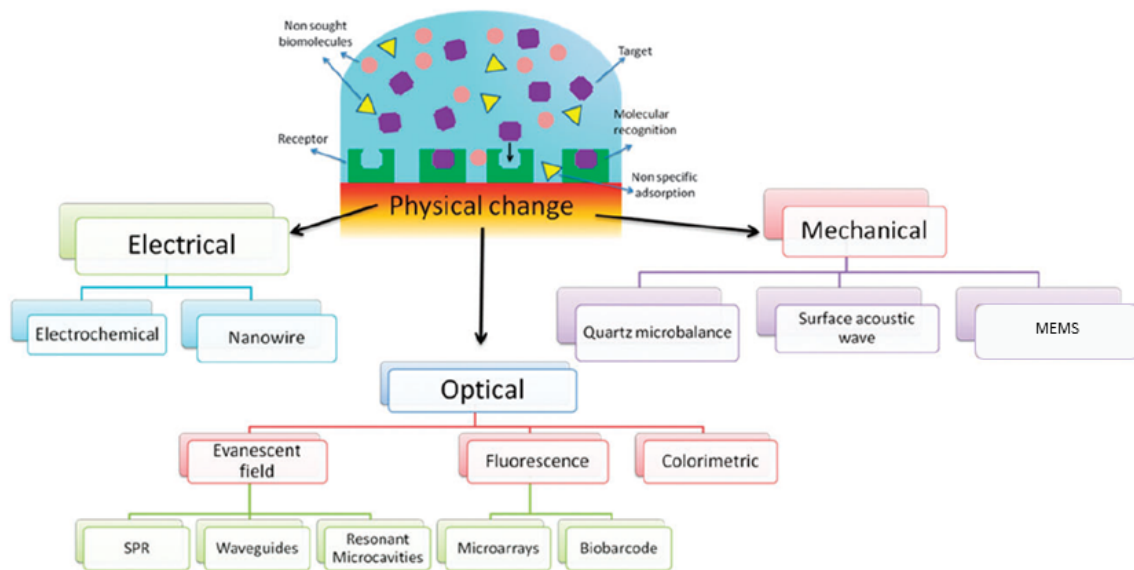


Figure 1-19 : exemple de transduction pour la bio-reconnaissance. Adapté à partir de Tamayo et al.¹⁶⁷

1.3.3.1. Les approches électrochimiques et électriques

1.3.3.1.1. Détection électrique

La détection électrique de miARNs est basée sur la mesure d'un courant ou d'une différence de potentiel suite par exemple au changement de résistance d'un système après hybridation du miARN avec la sonde. Elle permet, en général, d'avoir des niveaux de détection bas, une bonne sélectivité du miARN et un faible coût.

Une première manière de procéder est d'utiliser des nano-pores dont la résistance électrique peut être modulée par le passage des ARNs. Dans les travaux de Tian *et al.*, la détection est effectuée en deux étapes : dans un premier temps, les miARNs sont hybridés avec des sondes PNA (Peptid Nucleic Acid), ces sondes ont la particularité d'être électriquement neutres car les nucléotides ne contiennent

pas de groupement phosphate. Chaque sonde est de plus conjuguée à un peptide polycationique (c'est-à-dire, un peptide chargé positivement). Après hybridation avec le miARN (qui est chargé négativement), un dipôle est alors formé et conduit jusqu'au nano-pore (formé à l'intérieur d'une bicouche lipidique) via un fort gradient de champ électrique (cf. Figure 1-20). Les miARNs n'ayant pas subi d'hybridation restent, quant à eux, chargés négativement et s'éloignent des nano-pores de par l'influence du champ électrique. Lorsqu'un complexe miARN/PNA traverse le nano-pore, un décalage en intensité de l'ordre de quelques picoampère est observé via une mesure du courant. Cette méthode a l'avantage de bénéficier d'une très bonne sélectivité (détection d'une seule différence de nucléotide) et de présenter une limite de détection de l'ordre du picomolaire. Cependant, la preuve de concept a été réalisée en utilisant des miARNs synthétiques dilués à des concentrations connues dans des tampons contenant du chlorure de potassium.¹⁶⁸ On note ainsi la présence de contraintes fortes liées à l'utilisation d'une solution tampon qui doit être compatible avec une mesure électrique et ne permet donc pas de traiter des échantillons peu purifiés.

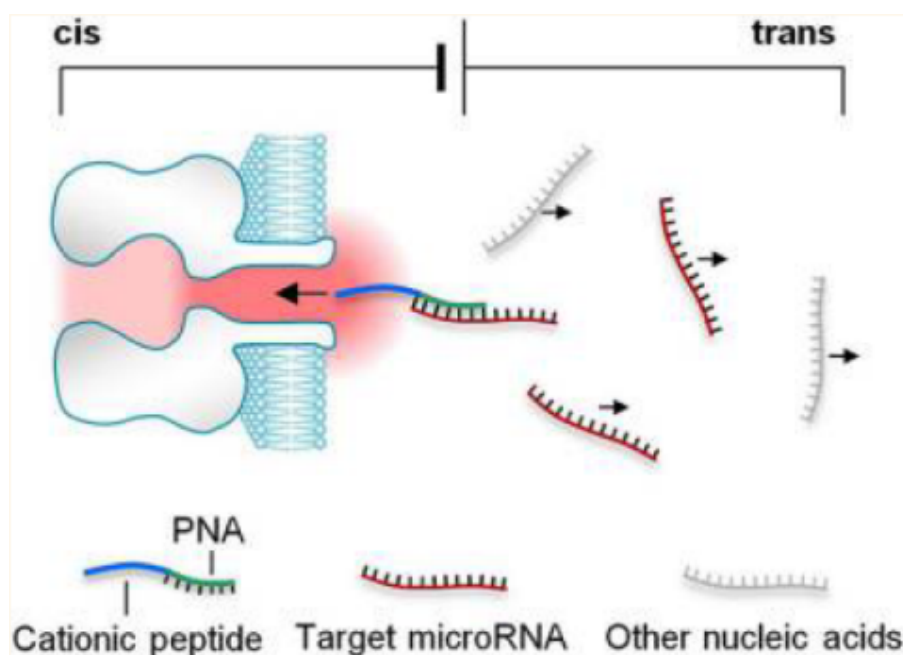


Figure 1-20 : principe de la mesure électrique avec des nanopores.¹⁶⁸

Une autre approche consiste à greffer des sondes PNA sur des nano-fils de silicium, dopés et donc conducteurs. Le greffage est réalisé entre le groupe amine de la sonde et la surface de silicium modifiée avec des aldéhydes. Une mesure de résistance avant et après hybridation du miARN avec la sonde permet de déterminer la concentration spécifiquement en miARNs. Ce changement de résistance est

dû au fait que le miARN est chargé négativement et que la sonde PNA est neutre électriquement. Cette accumulation d'électrons vient charger le nano-fil et ainsi changer la résistance à ses bornes (cf. Figure 1-21). Cette méthode présente une très bonne spécificité et permet de discriminer deux miARNs différant d'une seule base. Le niveau de détection limite est de l'ordre du femtomolaire.¹⁶⁹ Cependant, encore une fois, la détection n'est pas réalisée en temps réel et nécessite une étape d'incubation d'une heure à température ambiante dans des solutions tampon bien définies. On peut aussi souligner la difficulté de fabrication de ce type de dispositifs qui manquent, par conséquent, souvent de robustesse.

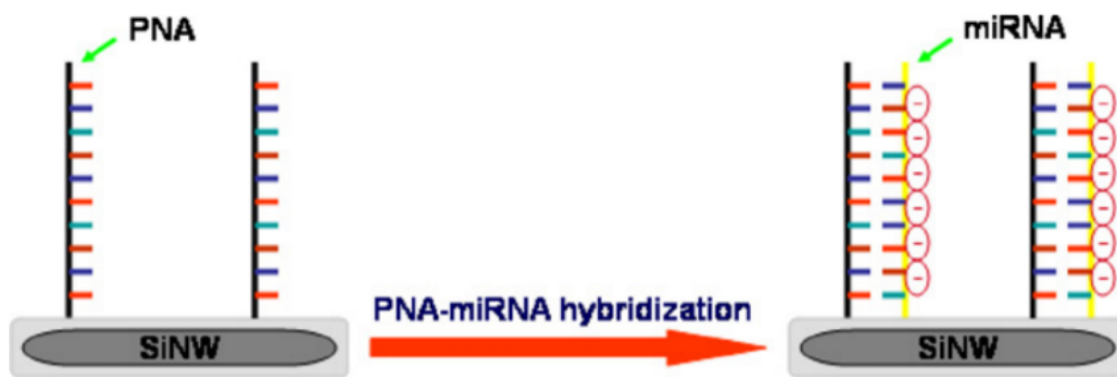


Figure 1-21 : principe de la détection avec des nanofils de silicium.¹⁶⁹

La détection de miARNs, notamment dans des modèles de cancer du pancréas, peut être réalisée à l'aide d'une nanomembrane, qui se charge négativement lors de l'interaction avec des miARNs. La mesure de courant en balayant la tension appliquée (on parle de caractéristique I(V) au niveau de réservoirs séparés par cette membrane, est directement corrélée au taux d'hybridation. Les auteurs de ces travaux montrent la possibilité de pouvoir détecter les molécules cibles dans des extraits de cellules. Ils ont, de plus, intégré la possibilité de lyser les exosomes, susceptibles d'être des transporteurs de miARNs, à l'aide d'ondes acoustiques de surface (cf. Figure 1-22).¹⁷⁰

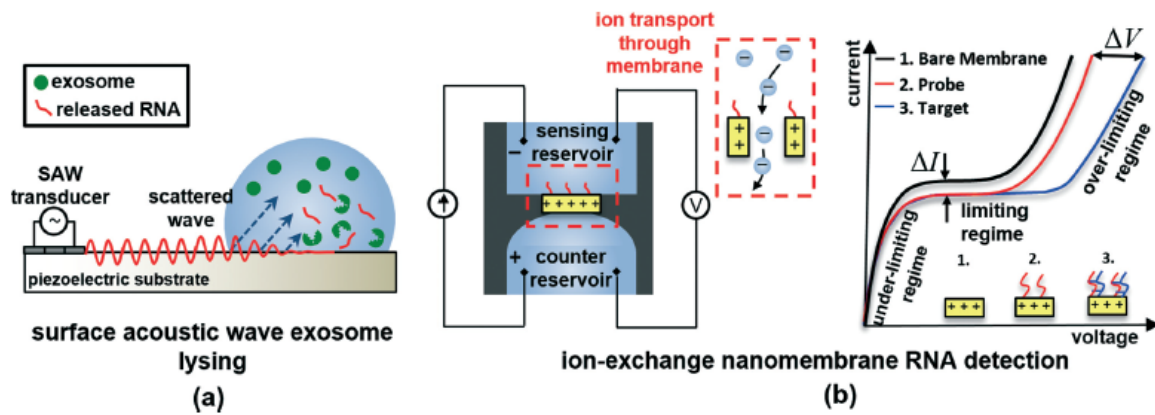


Figure 1-22 : principe de la détection à l'aide d'une membrane couplé à la lyse des exosomes sur puce.¹⁷⁰

1.3.3.1.2. Détection électrochimique

La détection électrochimique se distingue d'une simple mesure électrique dans le sens où elle implique une réaction d'oxydation ou de réduction au niveau des matériaux conducteurs utilisés.

Ainsi, par exemple, Yin *et al.* ont réalisé une détection électrochimique en se basant sur l'utilisation de nanoparticules dendritiques d'or fonctionnalisées avec des sondes complémentaires de type balise moléculaire aux miARNs (cf. Figure 1-23). Les balises moléculaires ont la particularité d'avoir une structure secondaire stable. Ainsi, on les trouve en position fermée lorsque qu'elles ne sont pas en interaction avec une séquence cible et en position ouverte dans le cas inverse. Ces sondes reposent de plus sur une surface de graphène (c'est-à-dire une monocouche de graphite qui correspond à des atomes de carbones organisés de manière hexagonale sur le plan cristallin) qui sert de couche d'accroche. C'est suite à une d'incubation pendant 2h30 à température ambiante de la sonde et du miARN que les balises moléculaires s'ouvrent. Des nanoparticules d'or contenant un brin de type LNA (*locked nucleic acid*) complémentaire de la fin de la séquence de la sonde alors ouverte se fixent sur cette dernière: elles jouent le rôle de révélateur, cette deuxième étape dure 2h. Ces nanoparticules contiennent aussi des brins d'ADN biotinylés : cela permet de venir y fixer des molécules de streptavidine couplées à des peroxydases de raifort, qui permettront de catalyser la réaction électrochimique par la suite (et donc d'amplifier le signal électrique). Chacune de ces trois étapes est, bien entendu, séparée par des lavages afin de limiter toute détection non spécifique. L'ajout d'un mélange composé d'hydroquinone et d'eau oxygénée entraîne la mise en place d'un courant, catalysé par la quantité de peroxydases en surface, c'est-à-dire, indirectement, le nombre de brins hybridés avec des miARNs.¹⁷¹ Une multitude d'autres approches utilisent des nanoparticules pour catalyser ce type de réaction électrochimique telles que le OsO₂¹⁷² ou le RuO₂.¹⁷³ Des clusters d'argent ont aussi

permis une électro-catalysation de la réaction de réduction par l'eau oxygénée.¹⁷⁴ Ces méthodes de détection ont de bonnes sensibilités, cependant elles nécessitent une multitude d'étapes pour arriver jusqu'à la quantification. De plus, elles ne permettent pas de mesure en temps réel, ce qui rend les temps de détection longs.

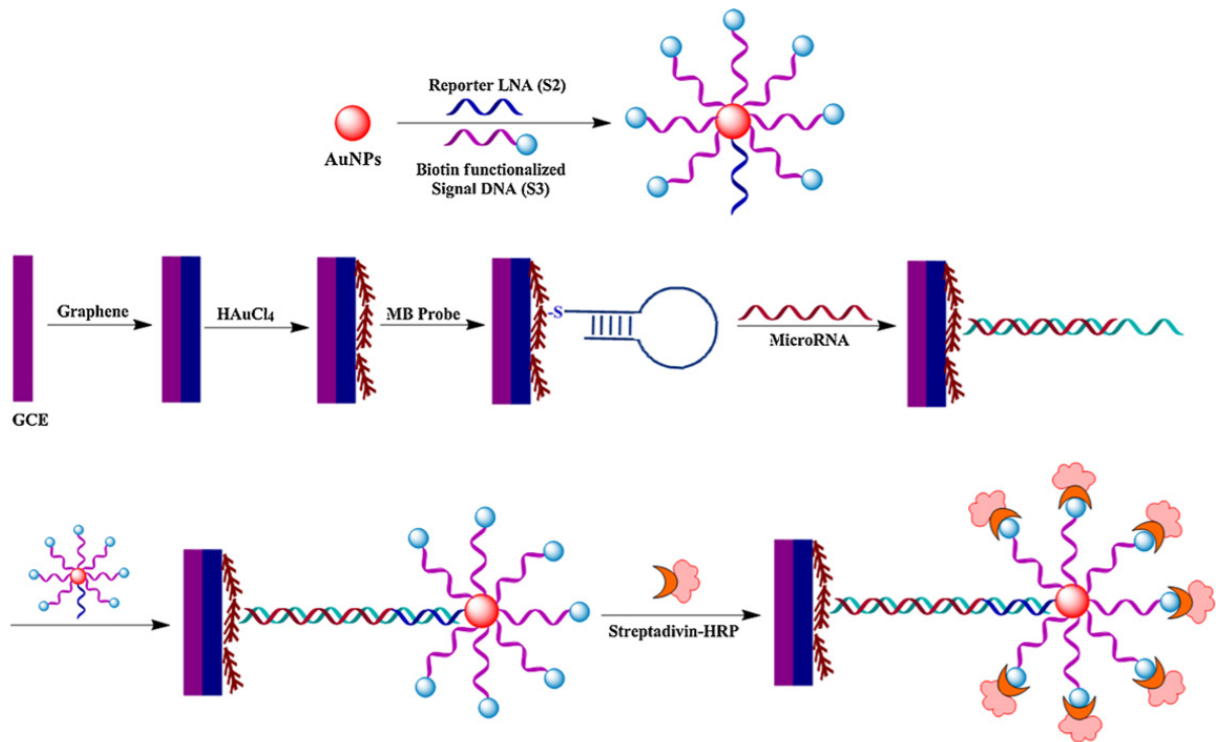


Figure 1-23 : principe de la détection des miARNs avec une couche de graphène couplée à des sondes de type balise moléculaire et des nanoparticules d'or.¹⁷¹

De manière générale, on relève que ces méthodes présentent l'avantage certain de pouvoir atteindre des limites de détection compatibles avec la détection d'évènements rares, cependant, des étapes de lavage et des temps d'incubation importants sont nécessaires et rendent impossible, par conséquent, une détection en temps réel. De plus, bien que l'électrochimie soit décrite comme une absence de marquage, l'utilisation de catalyseur est nécessaire à l'amplification des réactions d'oxydoréductions mises en jeu.

1.3.3.2. La détection mécanique

Il est aussi possible de détecter des changements mécaniques sur des structures suspendues miniaturisées. Ce type de systèmes, appelé MEMS pour *microelectromechanical systems*, peut être utilisé en mode statique ou dynamique. Dans le premier cas, la capture de molécules en surface de la structure qui se traduit en un ajout de masse et l'apparition de contraintes sur la surface engendre une déflexion de la structure, cette dernière peut alors être mesurée de différentes manières (mesure de contrainte, optique, etc.). Il est aussi possible d'utiliser ces systèmes dans des régimes dynamiques, c'est à dire en vibration. On ne mesure alors plus une déflexion mais un changement de fréquence de résonance dû à l'ajout de masse sur la surface du résonateur. En d'autres termes, lorsqu'une couche de molécules est déposée, la masse augmente, ce qui engendre alors une baisse de la fréquence de résonance. Un autre paramètre peut être étudié : le phénomène de dissipation (l'amortissement). Ce dernier est directement relié aux propriétés viscoélastiques de la couche déposée et donne, par conséquent, des informations quant à la nature des interactions de la couche déposée et son organisation. En effet, si les interactions sont très fortes (dans le cas d'une très bonne complémentarité) alors la couche déposée peut être considérée comme rigide et son influence sur le facteur de qualité sera faible. Dans le cas contraire, un amortissement plus important de la résonance pourra être observé.

Peu de travaux font état de l'utilisation de MEMS pour la détection de miARNs. L'utilisation de poutres en zirconate de silicium, matériau piézoélectrique qui se déforme lorsqu'un champ électrique lui est appliqué, d'une surface de l'ordre de 1 mm^2 recouvertes d'une couche d'or d'une épaisseur de 100 nm fait partie des méthodes très prometteuses comme le montrent Johnson *et al.*¹⁴² Afin de rendre la détection sélective, les sondes ADN complémentaires au miARN recherché sont thiolées, ce qui permet leur greffage sur la couche d'or (cf. Figure 1-24). La nouvelle fréquence de résonance après interaction entre la cible miARN et la sonde est alors directement proportionnelle à la masse ajoutée. La mesure se fait via l'application d'un champ électrique périodique (100 mV) qui permet d'exciter la poutre mécaniquement. Cette technique a une bonne sélectivité et permet d'éviter tout marquage. Elle est de plus compatible avec une détection dans des fluides complexes tels que le sérum.¹⁷⁵ Cependant la réduction des dimensions de tels systèmes (qui permettraient d'atteindre des sensibilités très bonnes) est encore un verrou technologique en terme de microfabrication, la robustesse de tels systèmes MEMS reste donc encore un challenge scientifique à part entière.

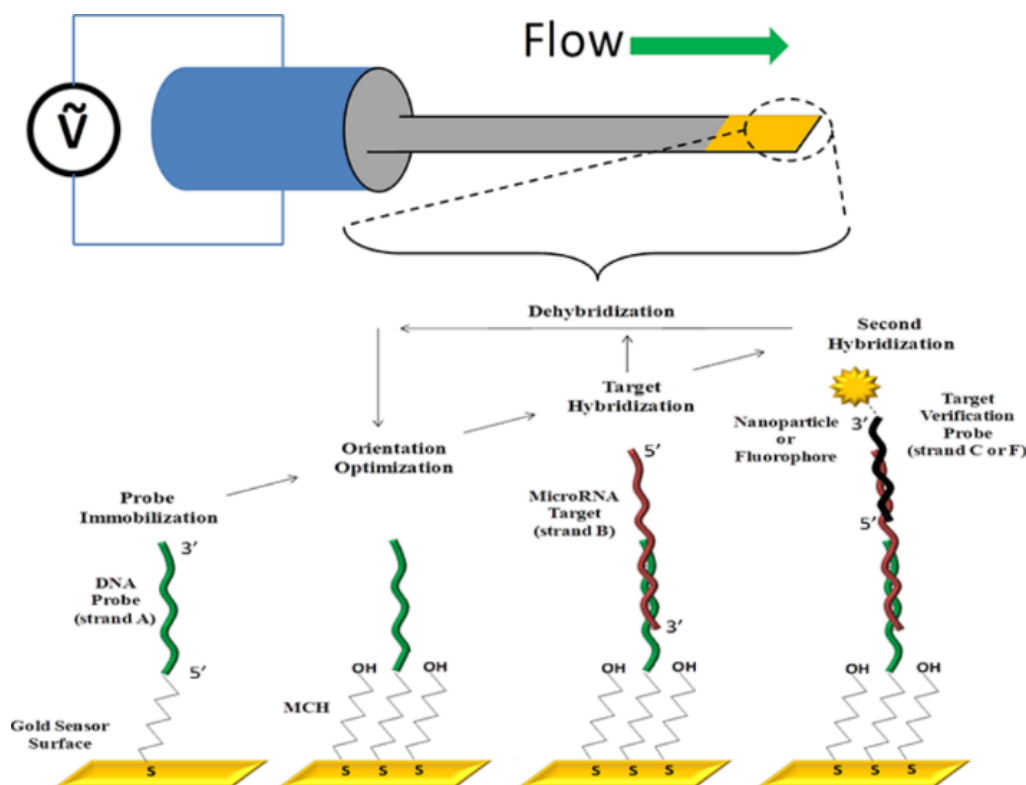


Figure 1-24 : principe de la détection par résonateur mécanique.¹⁴²

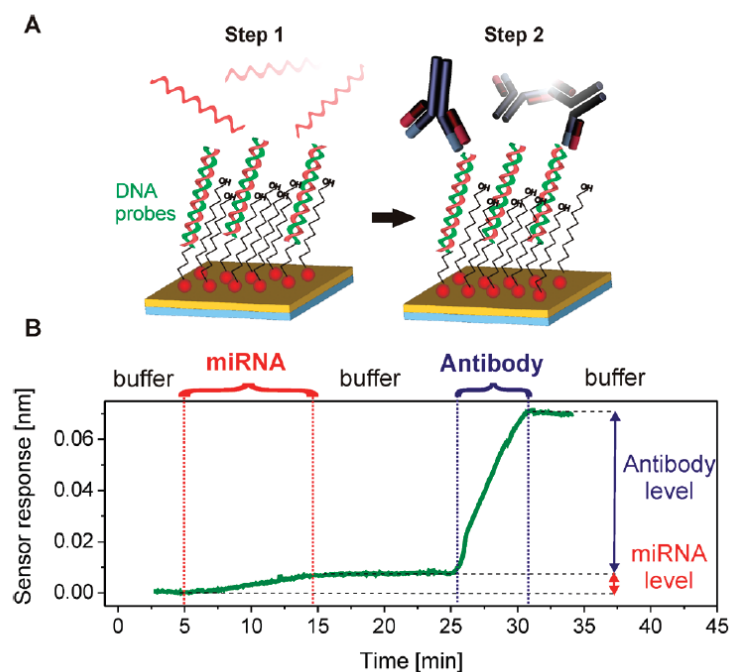
1.3.3.3. Les méthodes de détection optique

1.3.3.3.1. La SPR

Une autre approche consiste en l'utilisation de plasmons (une quasiparticule présente dans les métaux avec des propriétés lumineuses et mécaniques qu'il est possible de faire entrer en résonance) de surface (SPR pour *surface plasmon resonance* en anglais). Cette méthode permet de détecter un changement d'indice de réfraction à l'interface d'une couche fine de métal. Typiquement, l'adsorption d'une molécule à l'interface aura une influence sur l'indice de réfraction. La détection des plasmons de surface nécessite alors l'utilisation de source d'ondes électromagnétiques puissantes et à longueur d'onde variable, c'est-à-dire en énergie variable. Ceci est indispensable afin d'évaluer le niveau d'énergie des photons absorbés qui permettent l'entrée en résonance des plasmons de surface et donc la détermination de l'indice de réfraction à l'interface. Pour ce faire, la source est couplée à un réseau de diffraction ou bien un prisme afin de contrôler finement la longueur d'onde émise.

Dans leur étude, Sipova *et al.*¹⁷⁶ utilisent des sondes ADN thiolées greffées sur une surface d'or afin de permettre la bio-reconnaissance des miARNs. Suite à l'hybridation de la sonde avec le miARN cible, un

anticorps monoclonal est ajouté. Cet anticorps a pour propriété de reconnaître spécifiquement l'hybridation ADN/miARN (cf. Figure 1-25), il permet notamment d'amplifier le changement en indice de réfraction et facilite donc la détection. Les concentrations détectables sont de l'ordre du picomolaire après 30 minutes d'interaction en temps réel. Une méthode proche de celle décrite consiste à utiliser la protéine p19 couplée à des billes magnétiques spécifique au duplexe formé comme révélateur afin d'avoir un niveau de détection de l'ordre du femtomolaire.¹⁷⁷ En effet, de par cette deuxième interaction le changement d'indice de réfraction à l'interface est amplifié.



Fang *et al.* utilisent une méthode de détection très similaire. Sa mise en place est plus compliquée mais la limite de détection est elle aussi de l'ordre du femtomolaire. Des sondes LNA sont dans un premier temps fixées sur la surface, puis, après hybridation du miARN avec la sonde, une réaction de polymérase est effectuée permettant alors l'ajout d'une séquence poly(A) à la suite du miARN cible. Des nanoparticules d'or contenant un brin de poly(T) permettent alors l'hybridation avec les poly(A). La détection se fait ensuite via SPR, ce sont les nanoparticules d'or qui permettent une bonne amplification du signal et une détection à un seuil aussi bas.¹⁷⁸

De la même manière, les travaux de Liu *et al.* font eux aussi état de l'utilisation de la SPR pour la détection de miARNs. Dans leur publication, des nanoparticules sont modifiées avec des aptamères, engendrant alors une sélectivité très haute. La détection a pu être réalisée dans des milieux complexes tels que du sérum dilué cinq fois. On peut noter ici l'impossibilité d'effectuer une détection en temps réel. La mesure est effectuée après 50 minutes d'interaction et plusieurs étapes de révélation. Le capteur permet alors d'atteindre de très bon niveaux de détection (~ 100 fM).¹⁷⁹

Enfin, l'équipe de Murray Korc, chercheur reconnu dans le domaine du cancer du pancréas, a obtenu des résultats très impressionnants sur la détection de séquence miARN dans des extraits de fluides biologiques ainsi qu'après isolement d'exosomes circulants à l'aide de nanoprismes en or.⁹³ Les limites de détection sont très basses, de l'ordre de la centaine d'attomolaire avec une excellente sélectivité (cf. Figure 1-26). Cependant on peut noter des erreurs très importantes en cas de haute concentration de miARNs (10 pM – 10 nM). De plus, les temps d'interaction avant détection sont très longs (~ 12 h) et la détection ne se fait pas en temps réel.

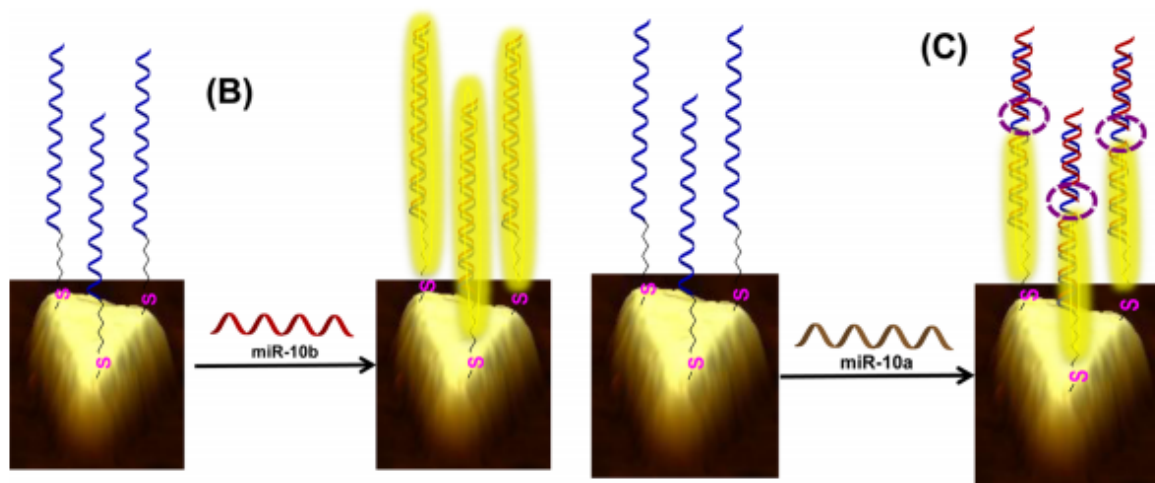


Figure 1-26 : détection de séquences miARNs par SPR via l'utilisation de nanoprismes en or sur lesquels sont greffées des sondes thiolées complémentaires à une séquence miARN spécifique (miR-10b). Les auteurs montrent ici l'effet de la présence d'un nucléotide non apparié avec la séquence cible miR-10a détection.⁵²

Une autre approche très similaire à la SPR est la détection via des micro-anneaux de silicium. Après accroche des sondes ADN via des fonctions silane sur le silicium, l'hybridation peut avoir lieu avec le miARN cible. L'ajout d'un anticorps S9.6 spécifique à l'interaction miARN/ADN permet ensuite d'amplifier le signal de détection. L'excitation optique dépend d'un laser externe. Le seuil de détection est relativement élevé comparé aux autres méthodes optiques mais le protocole est beaucoup plus

simple.¹⁸⁰ Le même groupe a ensuite optimisé le design de la sonde afin d'améliorer la sensibilité du capteur, cela leur a permis d'effectuer la détection à partir d'extrait de tissus humains.¹⁸¹

De manière générale, les niveaux de sensibilité atteints sont meilleurs qu'en électrochimie lorsque les approches utilisent des molécules révélatrices pour amplifier le signal. On relève la possibilité d'effectuer une détection en temps réel, certes au détriment de la sensibilité, et ce dans des fluides complexes. Cependant, la détection par SPR demande une mise en place expérimentale complexe faisant intervenir des lasers puissants et consommateurs d'énergie. Les possibilités d'intégration et miniaturisation sont donc très limitées, et ne permettent donc pas de rendre ce type de système facilement transportable.

1.3.3.3.2. La détection en fluorescence

Le principe de la mesure par fluorescence repose sur l'utilisation de fluorophores ou boîtes quantiques, qui, lorsqu'excités à une longueur d'onde spécifique, émettent de la lumière à une fréquence connue. Ces méthodes de détection impliquent généralement des étapes de marquage.

Dans leurs travaux, Degliangeli *et al.* immobilisent les sondes sur une couche de nanoparticules d'or fonctionnalisées via une étape d'incubation avec des sondes thiolées spécifiques aux miARNs, puis passivées avec du PEG (Polyéthylène Glycol) afin d'éviter toute interaction non spécifique sur la surface. Après hybridation avec la cible miARN, une endonucléase provoque alors l'hydrolyse des duplex ADN/miARN et, par conséquent, la libération des fluorophores présents sur les sondes.¹⁸² Une fois les fluorophores libérés, la mesure du signal en fluorescence est alors possible et permet d'accéder à la quantification des miARNs (cf. Figure 1-27). Une concentration limite de 5 pM est alors détectable avec ce type de dispositif. Néanmoins, il est important de noter que des étapes de préparation importantes, notamment en ce qui concerne les nanoparticules, sont nécessaires.

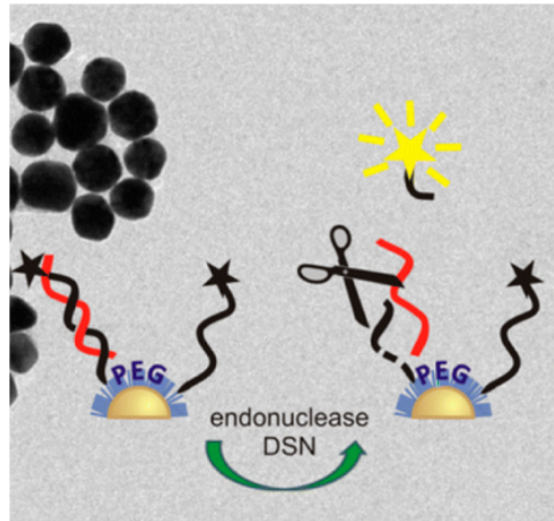


Figure 1-27 : détection en fluorescence via l'utilisation d'une sonde marquée et d'un quencher (nanoparticule d'or). Une fois associée avec la séquence miARN cible, une endonucléase sert de révélateur afin de dégrader spécifiquement les duplex doubles brins : le fluorophore est ainsi libéré et émet de la lumière.¹⁸²

L'utilisation des boîtes quantiques en alternative à la détection via des fluorophores est une stratégie intéressante au vu de leurs bonnes propriétés optiques (bon contrôle des longueurs d'onde d'excitation et d'émission, faible photoblanchiment, etc.). C'est l'approche privilégiée par Su *et al.* dans leurs travaux : dans un premier temps le miARN cible est associé avec la première partie de la séquence d'une sonde ADN liée à un désactivateur (*quencher* en anglais), ce dernier a pour rôle de venir absorber un ensemble de longueurs d'ondes données. Une boîte quantique est fonctionnalisée avec des sondes complémentaires à l'autre moitié de la séquence miARN. Lorsque l'assemblage se fait alors on peut observer une diminution de la fluorescence de la boîte quantique. Ceci est la conséquence directe de la présence du désactivateur dû à la première hybridation. Il y a en effet un échange d'énergie entre le désactivateur et la boîte quantique. Cette méthode permet une détection limite de 10 fM pour le miARN et 1 fM pour la détection d'ADN.¹⁸³ Ce système est très similaire aux approches BRET et FRET utilisées en recherche biologique.

Une autre alternative est l'utilisation de structures 2D de graphène sur lesquelles s'adsorbent plus facilement les séquences simple brin que les duplex double brin. Il est ainsi possible d'immobiliser des sondes complémentaires marquées en fluorescence sur le graphène. De par les propriétés de ce matériau, l'émission en fluorescence est absorbée par le graphène. Cependant, lorsque la cible miARN est présente en solution, la formation d'un duplex entraîne une désorption des séquences. Les fluorophores s'éloignent de la surface de graphène, ce qui entraîne l'apparition de la fluorescence.¹⁸⁴ D'autres groupes de recherche ont couplé cette approche avec des designs de sondes plus élaborés

comme l'utilisation de base UNA (*unlocked nucleic acid*) qui permettent une amélioration de la sélectivité.¹⁸⁵

Les approches décrites ci-dessus se basent sur le marquage de la sonde qui, après interaction avec le miARN, émettra de la lumière via des processus de désactivation de la fluorescence. Une autre voie est d'utiliser des cibles marquées. C'est ce qu'ont décrit Lee *et al.* en couplant le marquage des miARNs à leur détection via des hydrogels. Ces derniers contiennent deux parties distinctes : une zone fonctionnalisée pour la détection et une partie code-barres pour identifier la séquence détectée par la particule d'hydrogel. L'intérêt de l'hydrogel réside ici par sa porosité qui permet d'avoir des molécules sondes dans tout le volume de la particule et, par conséquent, une surface totale de détection très grande. Les auteurs montrent la possibilité d'effectuer la détection dans un extrait de moins de 1000 cellules. Pour ce faire, une hybridation à 55°C pendant 90 minutes est effectuée, suivie d'une étape de rinçage avant marquage des cibles via une ligase (cf. Figure 1-28). On peut noter encore une fois les temps longs d'interaction et l'absence de détection en temps réel inhérent à cette méthode.¹⁸⁶

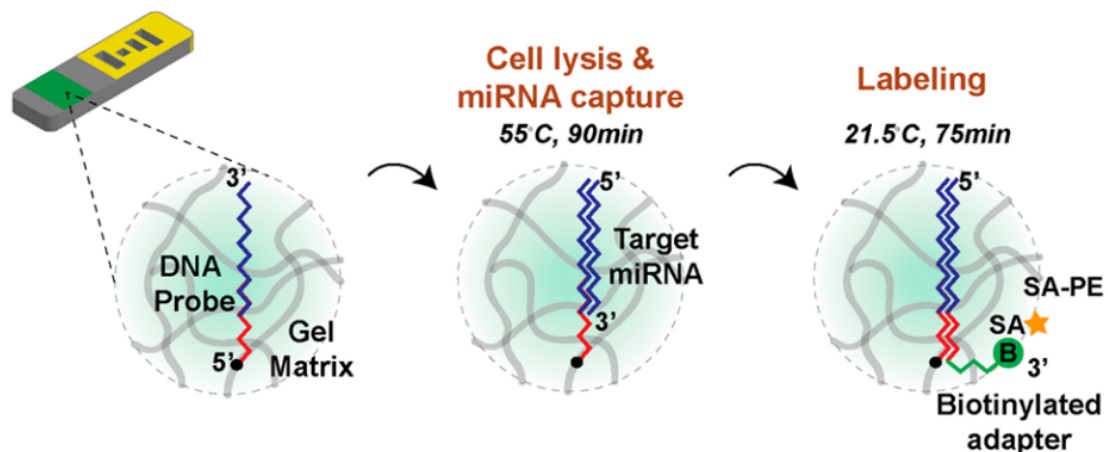


Figure 1-28 : principe de détection via des hydrogels suite à une étape de marquage en fluorescence.¹⁸⁶

Aussi, il nous semble important de discuter de la possibilité d'effectuer une ddPCR (*droplet digital PCR*) ciblée sur la détection des miARNs. La ddPCR se base sur l'amplification d'une séquence unique préalablement confinée dans une gouttelette via des systèmes microfluidiques. Pour ce faire, l'échantillon est dilué puis réparti dans des gouttes d'un volume de l'ordre du nL ou du pL contenant les différentes enzymes et sels nécessaires à la PCR, cette dilution n'autorisant la présence de 4 à 5 molécules amplifiables par goutte, si on se fie à la loi de Poisson. L'intérêt de cette méthode est de limiter le bruit de fond du signal. Bien que plus coûteuse que la PCR, cette méthode permet d'atteindre

des sensibilités seulement limitées par une éventuelle amplification non spécifique (engendrant la détection de faux positifs) ainsi que par le nombre de gouttes que le système est capable de générer. Ce point est d'autant plus important dans la détection des miARNs. En effet, l'apparition de faux positifs et négatifs a été montrée lorsqu'une ddPCR était effectuée avec des réactifs habituellement utilisés en RT-qPCR classique. Bien que possible, la détection de miARNs nécessite la mise en place de contrôles et une optimisation des enzymes, amorces et sondes utilisées comme le montre clairement Stein *et al.*¹⁸⁷

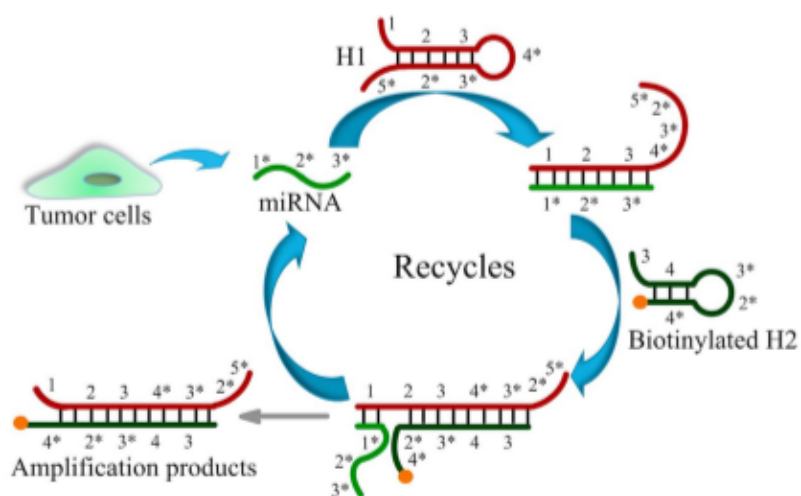


Figure 1-29 : principe de l'amplification du signal par recyclage des cibles.¹⁸⁸

Enfin, des approches récentes utilisent le recyclage des cibles afin de permettre l'amplification du signal. Nous ne sommes pas ici en présence de cycles de PCR à proprement parler, mais de cycles d'hybridation successifs de cibles sur plusieurs sondes de type balise moléculaire. Les cibles sont ensuite remplacées par une deuxième séquence de type balise moléculaire, cette dernière ne devenant fluorescente qu'après ouverture (cf. Figure 1-29).¹⁸⁸ Cette propriété permet, par ailleurs, l'utilisation de désactiveurs qui absorbent l'émission du fluorophore lorsque la séquence est en position fermée, ce qui n'est plus le cas si les sondes sont ouvertes. Ce type d'approche par recyclage des cibles a aussi été utilisé par Zhou *et al.* Dans leurs travaux, l'ouverture d'un G-quadruplex permet la détection d'un signal fluorescent, ce dernier alors ouvert peut être digéré par l'enzyme DSN qui entraîne la libération de cibles miARNs capables alors d'interagir avec un quadruplex secondaire.¹⁸⁹ On peut noter que, dans ces travaux récents, aucun avantage des nano ou microtechnologies n'est

exploité. En effet, la détection repose entièrement sur une optimisation biologique des séquences sondes utilisées.

On peut remarquer que les méthodes de détection par fluorescence sont variées. L'utilisation de nanoparticules permet de réaliser des détections directes via des processus de désactivation ou d'activation de fluorescence. On note ici la difficulté à multiplier le nombre de cibles détectées sauf dans le cas de l'utilisation d'hydrogels, ce qui entraîne alors des niveaux de détection inférieurs. Les approches par recyclage de cibles sont séduisantes mais purement biologique. Enfin, la détection par ddPCR ne palie pas aux problèmes inhérents dus à l'amplification tel que l'apparition de produits non spécifiques.

Conclusion du chapitre 1

Les miARNs sont des biomarqueurs qui présentent un potentiel clinique évident afin d'améliorer la prise en charge du cancer, notamment pancréatique. La littérature fait état d'un candidat biomarqueur privilégié du fait de sa robustesse, de sa présence dans les fluides biologiques, ainsi que la forte relation qui existe entre niveau d'expression et stade cancéreux. Cependant, notre analyse fait ressortir la complexité et les limitations des méthodes qui, actuellement, sont utilisées pour détecter les miARNs, que ce soit en termes d'extraction, de qualification ou de quantification. Nous avons enfin, dans la dernière partie, montré l'émergence de méthodes récentes de détection plus directes, pouvant parfois permettre l'analyse dans des fluides complexes, limitant ainsi les biais liés à la préparation de l'échantillon avant sa détection. Cependant, et bien que la littérature soit très riche sur le sujet, le transfert de telles approches reste très limité pour une application clinique. Ceci est souvent dû à la complexité des systèmes et leur robustesse intrinsèque qui ne permettent pas un transfert industriel des technologies. Les limitations en termes de procédures opératoires souvent laborieuses et d'analyse en temps réel peuvent faire figure d'autant d'explications. Afin de remédier en partie à ces limitations, nous proposons dans la suite du manuscrit un nouveau système nanofluidique permettant la détection directe (sans amplification) en fluorescence et en temps réel des miARNs.

Références du chapitre 1

1. Rönnau, C. G. H., Verhaegh, G. W., Luna-Velez, M. V. & Schalken, J. A. Noncoding RNAs as Novel Biomarkers in Prostate Cancer. *BioMed Res. Int.* (2014). doi:10.1155/2014/591703
2. Almeida, M. I., Reis, R. M. & Calin, G. A. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **717**, 1–8 (2011).
3. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
4. Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E. & Ruvkun, G. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**, 86 (2000).
5. Ruvkun, G. Glimpses of a Tiny RNA World. *Science* **294**, 797–799 (2001).
6. miRBase. at <<http://www.mirbase.org/>>
7. Roush, S. & Slack, F. J. The *let-7* family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* **18**, 505–516 (2008).
8. Cai, X., Hagedorn, C. H. & Cullen, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N. Y. N* **10**, 1957–1966 (2004).
9. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S. & Kim, V. N. The nuclear RNase III *Drosha* initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
10. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* **303**, 95–98 (2004).
11. Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. & Zamore, P. D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199–208 (2003).
12. Miyoshi, K., Miyoshi, T. & Siomi, H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol. Genet. Genomics* **284**, 95–103 (2010).
13. Kim, D. H., Sætrom, P., Snøve, O. & Rossi, J. J. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 16230–16235 (2008).
14. Catalanotto, C., Cogoni, C. & Zardo, G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
15. Ciafrè, S. A. & Galardi, S. microRNAs and RNA-binding proteins. *RNA Biol.* **10**, 934–942 (2013).
16. Laressergues, D., Couzigou, J.-M., Clemente, H. S., Martinez, Y., Dunand, C., Bécard, G. & Combier, J.-P. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature* **520**, 90–93 (2015).
17. Vidigal, J. A. & Ventura, A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol.* **25**, 137–147 (2015).
18. Casey, M.-C., Kerin, M. J., Brown, J. A. & Sweeney, K. J. Evolution of a research field—a micro (RNA) example. *PeerJ* **3**, (2015).
19. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 259–269 (2006).
20. Grimson, A., Farh, K. K.-H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P. & Bartel, D. P. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol. Cell* **27**, 91–105 (2007).
21. Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C., Kipps, T. J., Negrini, M. & Croce,

- C. M. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 13944–13949 (2005).
22. Akao, Y., Nakagawa, Y. & Naoe, T. let-7 MicroRNA Functions as a Potential Growth Suppressor in Human Colon Cancer Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 903–906 (2006).
 23. Langevin, S. M., Stone, R. A., Bunker, C. H., Lyons-Weiler, M. A., LaFramboise, W. A., Kelly, L., Seethala, R. R., Grandis, J. R., Sobol, R. W., Taioli, E. & PhD, M. MicroRNA-137 promoter methylation is associated with poorer overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **117**, 1454–1462 (2011).
 24. Choudhry, H. & Catto, J. W. F. Epigenetic regulation of microRNA expression in cancer. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **676**, 165–184 (2011).
 25. Ali, S. R., Humphreys, K. J., McKinnon, R. A. & Michael, M. Z. Impact of Histone Deacetylase Inhibitors on microRNA Expression and Cancer Therapy: A Review. *Drug Dev. Res.* **76**, 296–317 (2015).
 26. Chin, L. J., Ratner, E., Leng, S., Zhai, R., Nallur, S., Babar, I., Muller, R.-U., Straka, E., Su, L., Burki, E. A., Crowell, R. E., Patel, R., Kulkarni, T., Homer, R., Zelterman, D., Kidd, K. K., Zhu, Y., Christiani, D. C., Belinsky, S. A., Slack, F. J. & Weidhaas, J. B. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res.* **68**, 8535–8540 (2008).
 27. Sethi, N., Wright, A., Wood, H. & Rabbitts, P. MicroRNAs and head and neck cancer: Reviewing the first decade of research. *Eur. J. Cancer* **50**, 2619–2635 (2014).
 28. Jakymiw, A., Patel, R. S., Deming, N., Bhattacharyya, I., Shah, P., Lamont, R. J., Stewart, C. M., Cohen, D. M. & Chan, E. K. L. Overexpression of dicer as a result of reduced let-7 MicroRNA levels contributes to increased cell proliferation of oral cancer cells. *Genes. Chromosomes Cancer* **49**, 549–559 (2010).
 29. Frenzel, A., Lovén, J. & Henriksson, M. A. Targeting MYC-Regulated miRNAs to Combat Cancer. *Genes Cancer* **1**, 660–667 (2010).
 30. Globocan 2012 - Home. at <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>
 31. Ezzati, M., Henley, S. J., Lopez, A. D. & Thun, M. J. Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs. *Int. J. Cancer* **116**, 963–971 (2005).
 32. Parkin, D. M., Boyd, L. & Walker, L. C. 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br. J. Cancer* **105 Suppl 2**, S77-81 (2011).
 33. Ilic, M. & Ilic, I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* **22**, 9694–9705 (2016).
 34. Vrieling, A., Bueno-de-Mesquita, H. B., Boshuizen, H. C., Michaud, D. S., Severinsen, M. T., Overvad, K., Olsen, A., Tjønneland, A., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C., Kaaks, R., Rohrmann, S., Boeing, H., Nöthlings, U., Trichopoulou, A., Moutsiou, E., Dilis, V., Palli, D., Krogh, V., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., van Gils, C. H., Peeters, P. H. M., Lund, E., Gram, I. T., Rodríguez, L., Agudo, A., Larrañaga, N., Sánchez, M.-J., Navarro, C., Barricarte, A., Manjer, J., Lindkvist, B., Sund, M., Ye, W., Bingham, S., Khaw, K.-T., Roddam, A., Key, T., Boffetta, P., Duell, E. J., Jenab, M., Gallo, V. & Riboli, E. Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int. J. Cancer* **126**, 2394–2403 (2010).
 35. Cancer Statistics Review, 1975-2013 - Previous Version - SEER Cancer Statistics Review. at <https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2013/>
 36. Buscail, L. Commentary: Pancreatic cancer: is the worst to come? *Int. J. Epidemiol.* **46**, 1774–1775 (2017).

37. Olsen, D. & Jørgensen, J. T. Companion Diagnostics for Targeted Cancer Drugs – Clinical and Regulatory Aspects. *Front. Oncol.* **4**, (2014).
38. Freelove, R. & Walling, A. D. Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am. Fam. Physician* **73**, 485–492 (2006).
39. Bournet, B., Gayral, M., Torrisani, J., Selves, J., Cordelier, P. & Buscail, L. Role of endoscopic ultrasound in the molecular diagnosis of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* **20**, 10758–10768 (2014).
40. Bournet, B., Pointreau, A., Souque, A., Oumouhou, N., Muscari, F., Lepage, B., Senesse, P., Barthet, M., Lesavre, N., Hammel, P., Levy, P., Ruzniewski, P., Cordelier, P. & Buscail, L. Gene expression signature of advanced pancreatic ductal adenocarcinoma using low density array on endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **12**, 27–34 (2012).
41. Lee, E. J., Gusev, Y., Jiang, J., Nuovo, G. J., Lerner, M. R., Frankel, W. L., Morgan, D. L., Postier, R. G., Brackett, D. J. & Schmittgen, T. D. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **120**, 1046–1054 (2007).
42. Bloomston, M., Frankel, W. L., Petrocca, F., Volinia, S., Alder, H., Hagan, J. P., Liu, C.-G., Bhatt, D., Taccioli, C. & Croce, C. M. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* **297**, 1901–1908 (2007).
43. Abreu, F. B. de, Liu, X. & Tsongalis, G. J. miRNA analysis in pancreatic cancer: the Dartmouth experience. *Clin. Chem. Lab. Med.* **55**, 755–762 (2017).
44. Tréhoux, S., Lahdaoui, F., Delpu, Y., Renaud, F., Leteurtre, E., Torrisani, J., Jonckheere, N. & Van Seuning, I. Micro-RNAs miR-29a and miR-330-5p function as tumor suppressors by targeting the MUC1 mucin in pancreatic cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 2392–2403 (2015).
45. Lahdaoui, F., Delpu, Y., Vincent, A., Renaud, F., Messenger, M., Duchêne, B., Leteurtre, E., Mariette, C., Torrisani, J., Jonckheere, N. & Van Seuning, I. miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer. *Oncogene* **34**, 780–788 (2015).
46. Jonckheere, N., Lahdaoui, F. & Van Seuning, I. Targeting MUC4 in pancreatic cancer: miRNAs. *Oncoscience* **2**, 799–800 (2015).
47. Torrisani, J., Bournet, B., du Rieu, M. C., Bouisson, M., Souque, A., Escourrou, J., Buscail, L. & Cordelier, P. let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum. Gene Ther.* **20**, 831–844 (2009).
48. du Rieu, M. C., Torrisani, J., Selves, J., Al Saati, T., Souque, A., Dufresne, M., Tsongalis, G. J., Suriawinata, A. A., Carrère, N., Buscail, L. & Cordelier, P. MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin. Chem.* **56**, 603–612 (2010).
49. Hanoun, N., Delpu, Y., Suriawinata, A. A., Bournet, B., Bureau, C., Selves, J., Tsongalis, G. J., Dufresne, M., Buscail, L., Cordelier, P. & Torrisani, J. The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis. *Clin. Chem.* **56**, 1107–1118 (2010).
50. Delpu, Y., Lulka, H., Sicard, F., Saint-Laurent, N., Lopez, F., Hanoun, N., Buscail, L., Cordelier, P. & Torrisani, J. The Rescue of miR-148a Expression in Pancreatic Cancer: An Inappropriate Therapeutic Tool. *PLoS ONE* **8**, e55513 (2013).
51. Sicard, F., Gayral, M., Lulka, H., Buscail, L. & Cordelier, P. Targeting miR-21 for the Therapy of Pancreatic Cancer. *Mol. Ther.* (2013). doi:10.1038/mt.2013.35

52. Humeau, M., Vignolle-Vidoni, A., Sicard, F., Martins, F., Bournet, B., Buscail, L., Torrisani, J. & Cordelier, P. Salivary MicroRNA in Pancreatic Cancer Patients. *PLoS One* **10**, e0130996 (2015).
53. Buscail, L., Bournet, B., Vernejoul, F., Cambois, G., Lulka, H., Hanoun, N., Dufresne, M., Meulle, A., Vignolle-Vidoni, A., Ligat, L., Saint-Laurent, N., Pont, F., Dejean, S., Gayral, M., Martins, F., Torrisani, J., Barbey, O., Gross, F., Guimbaud, R., Otal, P., Lopez, F., Tiraby, G. & Cordelier, P. First-in-man phase I clinical trial of gene therapy for advanced pancreatic cancer: Safety, biodistribution and preliminary clinical findings. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* (2015). doi:10.1038/mt.2015.1
54. Delpu, Y., Hanoun, N., Lulka, H., Sicard, F., Selves, J., Buscail, L., Torrisani, J. & Cordelier, P. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Curr. Genomics* **12**, 15–24 (2011).
55. Gayral, M., Torrisani, J. & Cordelier, P. in *MicroRNAs Toxicol. Med.* 167–172 (2013).
56. Gayral, M., Jo, S., Hanoun, N., Vignolle-Vidoni, A., Lulka, H., Delpu, Y., Meulle, A., Dufresne, M., Humeau, M., Chalret du Rieu, M., Bournet, B., Sèlves, J., Guimbaud, R., Carrère, N., Buscail, L., Torrisani, J. & Cordelier, P. MicroRNAs as emerging biomarkers and therapeutic targets for pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 11199–11209 (2014).
57. Humeau, M., Torrisani, J. & Cordelier, P. miRNA in clinical practice: Pancreatic cancer. *Clin. Biochem.* (2013). doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.03.019
58. Torrisani, J. & Cordelier, P. in *MicroRNAs Cancer Transl. Res.* 287–307 (2011).
59. Tsongalis, G. J., Calin, G., Cordelier, P., Croce, C., Monzon, F. & Szafranska-Schwarzbach, A. E. MicroRNA Analysis: Is It Ready for Prime Time? *Clin. Chem.* (2012). doi:10.1373/clinchem.2012.185009
60. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89–95 (2001).
61. NCI Dictionary of Cancer Terms. *Natl. Cancer Inst.* at <<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>>
62. Lightwood, R., Reber, H. A. & Way, L. W. The risk and accuracy of pancreatic biopsy. *Am. J. Surg.* **132**, 189–194 (1976).
63. Eloubeidi, M. A., Chen, V. K., Eltoun, I. A., Jhala, D., Chhieng, D. C., Jhala, N., Vickers, S. M. & Wilcox, C. M. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy of patients with suspected pancreatic cancer: diagnostic accuracy and acute and 30-day complications. *Am. J. Gastroenterol.* **98**, 2663–2668 (2003).
64. Smerage, J. B., Barlow, W. E., Hortobagyi, G. N., Winer, E. P., Leyland-Jones, B., Srkalovic, G., Tejwani, S., Schott, A. F., O'Rourke, M. A., Lew, D. L., Doyle, G. V., Gralow, J. R., Livingston, R. B. & Hayes, D. F. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 3483–3489 (2014).
65. Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 623–631 (2014).
66. Diaz, L. A. & Bardelli, A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J. Clin. Oncol.* **32**, 579–586 (2014).
67. Chignard, N., Shang, S., Wang, H., Marrero, J., Bréchet, C., Hanash, S. & Beretta, L. Cleavage of endoplasmic reticulum proteins in hepatocellular carcinoma: Detection of generated fragments in patient sera. *Gastroenterology* **130**, 2010–2022 (2006).
68. Carter, H. B., Albertsen, P. C., Barry, M. J., Etzioni, R., Freedland, S. J., Greene, K. L., Holmberg, L., Kantoff, P., Konety, B. R., Murad, M. H., Penson, D. F. & Zietman, A. L. Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. *J. Urol.* **190**, 419–426 (2013).

69. Ludwig, J. A. & Weinstein, J. N. Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 845–856 (2005).
70. Goonetilleke, K. S. & Siriwardena, A. K. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* **33**, 266–270 (2007).
71. Boylan, K. L. M., Geschwind, K., Koopmeiners, J. S., Geller, M. A., Starr, T. K. & Skubitz, A. P. N. A multiplex platform for the identification of ovarian cancer biomarkers. *Clin. Proteomics* **14**, (2017).
72. Gao, A., Yang, X., Tong, J., Zhou, L., Wang, Y., Zhao, J., Mao, H. & Li, T. Multiplexed detection of lung cancer biomarkers in patients serum with CMOS-compatible silicon nanowire arrays. *Biosens. Bioelectron.* **91**, 482–488 (2017).
73. Trabert, B., Pinto, L., Hartge, P., Kemp, T., Black, A., Sherman, M. E., Brinton, L. A., Pfeiffer, R. M., Shiels, M. S., Chaturvedi, A. K., Hildesheim, A. & Wentzensen, N. Pre-diagnostic serum levels of inflammation markers and risk of ovarian cancer in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer (PLCO) Screening Trial. *Gynecol. Oncol.* **135**, 297–304 (2014).
74. Cohen, J. D., Li, L., Wang, Y., Thoburn, C., Afsari, B., Danilova, L., Douville, C., Javed, A. A., Wong, F., Mattox, A., Hruban, R. H., Wolfgang, C. L., Goggins, M. G., Molin, M. D., Wang, T.-L., Roden, R., Klein, A. P., Ptak, J., Dobbyn, L., Schaefer, J., Silliman, N., Popoli, M., Vogelstein, J. T., Browne, J. D., Schoen, R. E., Brand, R. E., Tie, J., Gibbs, P., Wong, H.-L., Mansfield, A. S., Jen, J., Hanash, S. M., Falconi, M., Allen, P. J., Zhou, S., Bettegowda, C., Diaz, L. A., Tomasetti, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Lennon, A. M. & Papadopoulos, N. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* **359**, 926–930 (2018).
75. Goossens, N., Nakagawa, S., Sun, X. & Hoshida, Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl. Cancer Res.* **4**, 256–269 (2015).
76. Bournet, B., Buscail, C., Muscari, F., Cordelier, P. & Buscail, L. Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **54**, 75–83 (2016).
77. Bournet, B., Vignolle-Vidoni, A., Grand, D., Roques, C., Breibach, F., Cros, J., Muscari, F., Carrère, N., Selves, J., Cordelier, P. & Buscail, L. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration plus KRAS and GNAS mutation in malignant intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Endosc. Int. Open* **4**, E1228–E1235 (2016).
78. Bournet, B., Selves, J., Grand, D., Danjoux, M., Hanoun, N., Cordelier, P. & Buscail, L. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with a KRAS mutation assay using allelic discrimination improves the diagnosis of pancreatic cancer. *J. Clin. Gastroenterol.* **49**, 50–56 (2015).
79. Bournet, B., Muscari, F., Buscail, C., Assenat, E., Barthet, M., Hammel, P., Selves, J., Guimbaud, R., Cordelier, P. & Buscail, L. KRAS G12D Mutation Subtype Is A Prognostic Factor for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **7**, e157 (2016).
80. Shigeyasu, K., Toden, S., Zumwalt, T. J., Okugawa, Y. & Goel, A. Emerging Role of MicroRNAs as Liquid Biopsy Biomarkers in Gastrointestinal Cancers. *Clin. Cancer Res.* **23**, 2391–2399 (2017).
81. Cho, J.-Y. & Sung, H.-J. Proteomic approaches in lung cancer biomarker development. *Expert Rev. Proteomics* **6**, 27–42 (2009).
82. Hanoun, N., Delpu, Y., Suriawinata, A. A., Bournet, B., Bureau, C., Selves, J., Tsongalis, G. J., Dufresne, M., Buscail, L., Cordelier, P. & Torrisani, J. The Silencing of MicroRNA 148a Production by DNA Hypermethylation Is an Early Event in Pancreatic Carcinogenesis. *Clin. Chem.* **56**, 1107–1118 (2010).

83. Balaguer, F., Link, A., Lozano, J. J., Cuatrecasas, M., Nagasaka, T., Boland, C. R. & Goel, A. Epigenetic Silencing of miR-137 Is an Early Event in Colorectal Carcinogenesis. *Cancer Res.* **70**, 6609–6618 (2010).
84. Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R. & Golub, T. R. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838 (2005).
85. Kosaka, N., Iguchi, H. & Ochiya, T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* **101**, 2087–2092 (2010).
86. Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B. & Tewari, M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 10513–10518 (2008).
87. Ono, S., Lam, S., Nagahara, M. & Hoon, D. S. B. Circulating microRNA Biomarkers as Liquid Biopsy for Cancer Patients: Pros and Cons of Current Assays. *J. Clin. Med.* **4**, 1890–1907 (2015).
88. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J. & Zhang, C.-Y. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* **18**, 997–1006 (2008).
89. El-Hefnawy, T., Raja, S., Kelly, L., Bigbee, W. L., Kirkwood, J. M., Luketich, J. D. & Godfrey, T. E. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin. Chem.* **50**, 564–573 (2004).
90. Cheng, L., Sharples, R. A., Scicluna, B. J. & Hill, A. F. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J. Extracell. Vesicles* **3**, (2014).
91. Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. & Illei, G. G. The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. *PLOS ONE* **7**, e30679 (2012).
92. Michael, A., Bajracharya, S. D., Yuen, P. S. T., Zhou, H., Star, R. A., Illei, G. G. & Alevizos, I. Exosomes from Human Saliva as a Source of microRNA Biomarkers. *Oral Dis.* **16**, 34–38 (2010).
93. Joshi, G. K., Deitz-McElyea, S., Liyanage, T., Lawrence, K., Mali, S., Sardar, R. & Korc, M. Label-Free Nanoplasmonic-Based Short Noncoding RNA Sensing at Attomolar Concentrations Allows for Quantitative and Highly Specific Assay of MicroRNA-10b in Biological Fluids and Circulating Exosomes. *ACS Nano* **9**, 11075–11089 (2015).
94. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. & Burwinkel, B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7223–7233 (2011).
95. Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F. & Tewari, M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5003–5008 (2011).
96. Becker, N. & Lockwood, C. M. Pre-analytical variables in miRNA analysis. *Clin. Biochem.* **46**, 861–868 (2013).
97. Lawrie, C. H., Gal, S., Dunlop, H. M., Pushkaran, B., Liggins, A. P., Pulford, K., Banham, A. H., Pezzella, F., Boulton, J., Wainscoat, J. S., Hatton, C. S. R. & Harris, A. L. Detection of elevated

- levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **141**, 672–675 (2008).
98. De Guire, V., Robitaille, R., Tétreault, N., Guérin, R., Ménard, C., Bambace, N. & Sapieha, P. Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: Promises and challenges. *Clin. Biochem.* **46**, 846–860 (2013).
 99. Yeri, A., Courtright, A., Reiman, R., Carlson, E., Beecroft, T., Janss, A., Siniard, A., Richholt, R., Balak, C., Rozowsky, J., Kitchen, R., Hutchins, E., Winarta, J., McCoy, R., Anastasi, M., Kim, S., Huentelman, M. & Van Keuren-Jensen, K. Total Extracellular Small RNA Profiles from Plasma, Saliva, and Urine of Healthy Subjects. *Sci. Rep.* **7**, 44061 (2017).
 100. Kim, D.-J., Linnstaedt, S., Palma, J., Park, J. C., Ntrivalas, E., Kwak-Kim, J. Y. H., Gilman-Sachs, A., Beaman, K., Hastings, M. L., Martin, J. N. & Duelli, D. M. Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation. *J. Mol. Diagn. JMD* **14**, 71–80 (2012).
 101. Mraz, M., Malinova, K., Mayer, J. & Pospisilova, S. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 1–4 (2009).
 102. Grasedieck, S., Schöler, N., Bommer, M., Niess, J. H., Tumani, H., Rouhi, A., Bloehdorn, J., Liebisch, P., Mertens, D., Döhner, H., Buske, C., Langer, C. & Kuchenbauer, F. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia* **26**, 2414–2416 (2012).
 103. Pritchard, C. C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J. D., Dougherty, K. J., Miyaji, M. M., Tait, J. F. & Tewari, M. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* **5**, 492–497 (2012).
 104. Szafranska, A. E., Davison, T. S., Shingara, J., Doleshal, M., Riggenschach, J. A., Morrison, C. D., Jewell, S. & Labourier, E. Accurate Molecular Characterization of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues by microRNA Expression Profiling. *J. Mol. Diagn. JMD* **10**, 415–423 (2008).
 105. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
 106. Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J. & Nilsen, T. W. Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, pdb.prot5439 (2010).
 107. Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.-L. T., Schmittgen, T. D., Nana-Sinkam, S. P., Jarjoura, D. & Marsh, C. B. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* **3**, e3694 (2008).
 108. Duy, J., Koehler, J. W., Honko, A. N. & Minogue, T. D. Optimized microRNA purification from TRIzol-treated plasma. *BMC Genomics* **16**, (2015).
 109. Kim, Y.-K., Yeo, J., Kim, B., Ha, M. & Kim, V. N. Short Structured RNAs with Low GC Content Are Selectively Lost during Extraction from a Small Number of Cells. *Mol. Cell* **46**, 893–895 (2012).
 110. Kim, Y.-K., Yeo, J., Ha, M., Kim, B. & Kim, V. N. RETRACTED: Cell Adhesion-Dependent Control of MicroRNA Decay. *Mol. Cell* **43**, 1005–1014 (2011).
 111. Doleshal, M., Magotra, A. A., Choudhury, B., Cannon, B. D., Labourier, E. & Szafranska, A. E. Evaluation and Validation of Total RNA Extraction Methods for MicroRNA Expression Analyses in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *J. Mol. Diagn.* **10**, 203–211 (2008).
 112. McAlexander, M. A., Phillips, M. J. & Witwer, K. W. Comparison of Methods for miRNA Extraction from Plasma and Quantitative Recovery of RNA from Cerebrospinal Fluid. *Front. Genet.* **4**, (2013).
 113. Garcia-Elias, A., Alloza, L., Puigdecenet, E., Nonell, L., Tajés, M., Curado, J., Enjuanes, C., Díaz, O., Bruguera, J., Martí-Almor, J., Comín-Colet, J. & Benito, B. Defining quantification methods and optimizing protocols for microarray hybridization of circulating microRNAs. *Sci. Rep.* **7**, (2017).

114. Kroh, E. M., Parkin, R. K., Mitchell, P. S. & Tewari, M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods San Diego Calif* **50**, 298–301 (2010).
115. Desjardins, P. & Conklin, D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J. Vis. Exp. JoVE* (2010). doi:10.3791/2565
116. El-Khoury, V., Pierson, S., Kaoma, T., Bernardin, F. & Berchem, G. Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
117. Ge, Q., Zhou, Y., Lu, J., Bai, Y., Xie, X. & Lu, Z. miRNA in Plasma Exosome is Stable under Different Storage Conditions. *Molecules* **19**, 1568–1575 (2014).
118. Seashols-Williams, S., Lewis, C., Calloway, C., Peace, N., Harrison, A., Hayes-Nash, C., Fleming, S., Wu, Q. & Zehner, Z. E. High-throughput miRNA sequencing and identification of biomarkers for forensically relevant biological fluids. *ELECTROPHORESIS* **37**, 2780–2788 (2016).
119. Channavajjhala, S. K., Rossato, M., Morandini, F., Castagna, A., Pizzolo, F., Bazzoni, F. & Olivieri, O. Optimizing the purification and analysis of miRNAs from urinary exosomes. *Clin. Chem. Lab. Med.* **52**, 345–354 (2014).
120. Fleige, S. & Pfaffl, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* **27**, 126–139 (2006).
121. Kirchner, B., Paul, V., Riedmaier, I. & Pfaffl, M. W. in *Quant. Real-Time PCR* 43–53 (Humana Press, New York, NY, 2014). doi:10.1007/978-1-4939-0733-5_5
122. Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503–517 (1975).
123. Válóczy, A., Hornyik, C., Varga, N., Burgyán, J., Kauppinen, S. & Havelda, Z. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* **32**, e175–e175 (2004).
124. Pall, G. S., Codony-Servat, C., Byrne, J., Ritchie, L. & Hamilton, A. Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res.* **35**, e60–e60 (2007).
125. Várallyay, É., Burgyán, J. & Havelda, Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat. Protoc.* **3**, 190–196 (2008).
126. Streit, S., Michalski, C. W., Erkan, M., Kleeff, J. & Friess, H. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nat. Protoc.* **4**, 37–43 (2009).
127. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350–1354 (1985).
128. File:Polymerase chain reaction.svg. *Wikipedia* at <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg>
129. Ozsolak, F., Platt, A. R., Jones, D. R., Reifengerger, J. G., Sass, L. E., McInerney, P., Thompson, J. F., Bowers, J., Jarosz, M. & Milos, P. M. Direct RNA sequencing. *Nature* **461**, 814–818 (2009).
130. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* **10**, 413–417 (1992).
131. Thomson, J. M., Parker, J., Perou, C. M. & Hammond, S. M. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat. Methods* **1**, 47–53 (2004).

132. Beuvink, I., Kolb, F. A., Budach, W., Garnier, A., Lange, J., Natt, F., Dengler, U., Hall, J., Filipowicz, W. & Weiler, J. A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res.* **35**, e52 (2007).
133. Nelson, P. T., Baldwin, D. A., Scearce, L. M., Oberholtzer, J. C., Tobias, J. W. & Mourelatos, Z. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat. Methods* **1**, 155–161 (2004).
134. Liu, C.-G., Calin, G. A., Meloon, B., Gamliel, N., Sevignani, C., Ferracin, M., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Zupo, S., Dono, M., Alder, H., Bullrich, F., Negrini, M. & Croce, C. M. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 9740–9744 (2004).
135. Castoldi, M., Schmidt, S., Benes, V., Noerholm, M., Kulozik, A. E., Hentze, M. W. & Muckenthaler, M. U. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* **12**, 913–920 (2006).
136. Li, W. & Ruan, K. MicroRNA detection by microarray. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1117–1124 (2009).
137. Liu, C.-G., Calin, G. A., Volinia, S. & Croce, C. M. MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat. Protoc.* **3**, 563 (2008).
138. Geiss, G. K., Bumgarner, R. E., Birditt, B., Dahl, T., Dowidar, N., Dunaway, D. L., Fell, H. P., Ferree, S., George, R. D., Grogan, T., James, J. J., Maysuria, M., Mitton, J. D., Oliveri, P., Osborn, J. L., Peng, T., Ratcliffe, A. L., Webster, P. J., Davidson, E. H., Hood, L. & Dimitrov, K. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat. Biotechnol.* **26**, 317–325 (2008).
139. Nuovo, G. J., Garofalo, M., Valeri, N., Roulstone, V., Volinia, S., Cohn, D. E., Phelps, M., Harrington, K. J., Vile, R., Melcher, A., Galanis, E., Sehl, S., Adair, R., Scott, K., Rose, A., Toogood, G. & Coffey, M. C. Reovirus-associated reduction of microRNA-let-7d is related to the increased apoptotic death of cancer cells in clinical samples. *Mod. Pathol.* **25**, 1333–1344 (2012).
140. Kolbert, C. P., Feddersen, R. M., Rakhshan, F., Grill, D. E., Simon, G., Middha, S., Jang, J. S., Simon, V., Schultz, D. A., Zschunke, M., Lingle, W., Carr, J. M., Thompson, E. A., Oberg, A. L., Eckloff, B. W., Wieben, E. D., Li, P., Yang, P. & Jen, J. Multi-Platform Analysis of MicroRNA Expression Measurements in RNA from Fresh Frozen and FFPE Tissues. *PLOS ONE* **8**, e52517 (2013).
141. Wyman, S. K., Knouf, E. C., Parkin, R. K., Fritz, B. R., Lin, D. W., Dennis, L. M., Krouse, M. A., Webster, P. J. & Tewari, M. Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. *Genome Res.* **21**, 1450–1461 (2011).
142. Technical Support Documentation | NanoString Technologies. *SITE* at <<https://www.nanostring.com/support/product-support/support-documentation>>
143. Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Hutchison Iii, C. A., Slocombe, P. M. & Smith, M. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* **265**, 687–695 (1977).
144. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931–945 (2004).
145. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
146. Metzker, M. L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 31–46 (2010).

147. van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y. & Thermes, C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* **30**, 418–426 (2014).
148. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A. & Kinzler, K. W. Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546–1558 (2013).
149. Gallach, S., Jantus-Lewintre, E., Calabuig-Fariñas, S., Montaner, D., Alonso, S., Sirera, R., Blasco, A., Usó, M., Guijarro, R., Martorell, M. & Camps, C. MicroRNA profiling associated with non-small cell lung cancer: next generation sequencing detection, experimental validation, and prognostic value. *Oncotarget* **8**, 56143–56157 (2017).
150. Heather, J. M. & Chain, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* **107**, 1–8 (2016).
151. Moldovan, L., Batte, K. E., Trgovcich, J., Wisler, J., Marsh, C. B. & Piper, M. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 371–390 (2014).
152. Choi, H. & Mody, C. C. M. The Long History of Molecular Electronics: Microelectronics Origins of Nanotechnology. *Soc. Stud. Sci.* **39**, 11–50 (2009).
153. Schaller, R. R. Moore's law: past, present and future. *IEEE Spectr.* **34**, 52–59 (1997).
154. Kurzweil, R. *The Singularity is Near*. (Gerald Duckworth & Co, 2010).
155. Palchetti, I. & Mascini, M. in *Sens. Microsyst.* 15–23 (Springer, Dordrecht, 2010). doi:10.1007/978-90-481-3606-3_2
156. Qlark, L. C. J. MONITOR AND CONTROL OF BLOOD AND TISSUE OXYGEN TENSIONS. *ASAIO J.* **2**, 41 (1956).
157. Clark, L. C. & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 29–45 (1962).
158. Tabeling, P. *Introduction to Microfluidics*. (OUP Oxford, 2005).
159. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* (2006). doi:10.1038/nature05058
160. Tegenfeldt, J. O., Prinz, C., Cao, H., Huang, R. L., Austin, R. H., Chou, S. Y., Cox, E. C. & Sturm, J. C. Micro- and nanofluidics for DNA analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 1678–1692 (2004).
161. Easley, C. J., Karlinsey, J. M., Bienvenue, J. M., Legendre, L. A., Roper, M. G., Feldman, S. H., Hughes, M. A., Hewlett, E. L., Merkel, T. J., Ferrance, J. P. & Landers, J. P. A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in–answer-out capability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 19272–19277 (2006).
162. Sahoo, S. K., Parveen, S. & Panda, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **3**, 20–31 (2007).
163. Jain, K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clin. Chim. Acta* **358**, 37–54 (2005).
164. Etheridge, M. L., Campbell, S. A., Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M. & McCullough, J. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **9**, 1–14 (2013).
165. Dobson, M. G., Galvin, P. & Barton, D. E. Emerging technologies for point-of-care genetic testing. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **7**, 359–370 (2007).
166. Hare, J. I., Lammers, T., Ashford, M. B., Puri, S., Storm, G. & Barry, S. T. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **108**, 25–38 (2017).
167. Tamayo, J., Kosaka, P. M., Ruz, J. J., Paulo, Á. S. & Calleja, M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 1287–1311 (2013).

168. Tian, K., He, Z., Wang, Y., Chen, S.-J. & Gu, L.-Q. Designing a Polycationic Probe for Simultaneous Enrichment and Detection of MicroRNAs in a Nanopore. *ACS Nano* **7**, 3962–3969 (2013).
169. Zhang, G.-J., Chua, J. H., Chee, R.-E., Agarwal, A. & Wong, S. M. Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 2504–2508 (2009).
170. Taller, D., Richards, K., Slouka, Z., Senapati, S., Hill, R., B. Go, D. & Chang, H.-C. On-chip surface acoustic wave lysis and ion-exchange nanomembrane detection of exosomal RNA for pancreatic cancer study and diagnosis. *Lab. Chip* **15**, 1656–1666 (2015).
171. Yin, H., Zhou, Y., Zhang, H., Meng, X. & Ai, S. Electrochemical determination of microRNA-21 based on graphene, LNA integrated molecular beacon, AuNPs and biotin multifunctional bio bar codes and enzymatic assay system. *Biosens. Bioelectron.* **33**, 247–253 (2012).
172. Gao, Z. & Yang, Z. Detection of MicroRNAs Using Electrocatalytic Nanoparticle Tags. *Anal. Chem.* **78**, 1470–1477 (2006).
173. Peng, Y. & Gao, Z. Amplified Detection of MicroRNA Based on Ruthenium Oxide Nanoparticle-Initiated Deposition of an Insulating Film. *Anal. Chem.* **83**, 820–827 (2011).
174. Dong, H., Jin, S., Ju, H., Hao, K., Xu, L.-P., Lu, H. & Zhang, X. Trace and Label-Free MicroRNA Detection Using Oligonucleotide Encapsulated Silver Nanoclusters as Probes. *Anal. Chem.* **84**, 8670–8674 (2012).
175. Johnson, B. N. & Mutharasan, R. Sample Preparation-Free, Real-Time Detection of microRNA in Human Serum Using Piezoelectric Cantilever Biosensors at Attomole Level. *Anal. Chem.* **84**, 10426–10436 (2012).
176. Šířová, H., Zhang, S., Dudley, A. M., Galas, D., Wang, K. & Homola, J. Surface Plasmon Resonance Biosensor for Rapid Label-Free Detection of Microribonucleic Acid at Subfemtomole Level. *Anal. Chem.* **82**, 10110–10115 (2010).
177. Naseri, N., Cheng, J., Singaravelu, R., Wu, P., McDermott, M. T. & Pezacki, J. P. An enzyme-linked assay for the rapid quantification of microRNAs based on the viral suppressor of RNA silencing protein p19. *Anal. Biochem.* **412**, 165–172 (2011).
178. Fang, S., Lee, H. J., Wark, A. W. & Corn, R. M. Attomole Microarray Detection of MicroRNAs by Nanoparticle-Amplified SPR Imaging Measurements of Surface Polyadenylation Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 14044–14046 (2006).
179. Liu, R., Wang, Q., Li, Q., Yang, X., Wang, K. & Nie, W. Surface plasmon resonance biosensor for sensitive detection of microRNA and cancer cell using multiple signal amplification strategy. *Biosens. Bioelectron.* **87**, 433–438 (2017).
180. Qavi, A. J., Kindt, J. T., Gleeson, M. A. & Bailey, R. C. Anti-DNA:RNA Antibodies and Silicon Photonic Microring Resonators: Increased Sensitivity for Multiplexed microRNA Detection. *Anal. Chem.* **83**, 5949–5956 (2011).
181. Graybill, R. M., Para, C. S. & Bailey, R. C. PCR-Free, Multiplexed Expression Profiling of microRNAs Using Silicon Photonic Microring Resonators. *Anal. Chem.* **88**, 10347–10351 (2016).
182. Degliangeli, F., Kshirsagar, P., Brunetti, V., Pompa, P. P. & Fiammengo, R. Absolute and Direct MicroRNA Quantification Using DNA–Gold Nanoparticle Probes. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 2264–2267 (2014).
183. Su, S., Fan, J., Xue, B., Yuwen, L., Liu, X., Pan, D., Fan, C. & Wang, L. DNA-Conjugated Quantum Dot Nanoprobe for High-Sensitivity Fluorescent Detection of DNA and micro-RNA. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 1152–1157 (2014).

184. Zhu, D., Zhang, L., Ma, W., Lu, S. & Xing, X. Detection of microRNA in clinical tumor samples by isothermal enzyme-free amplification and label-free graphene oxide-based SYBR Green I fluorescence platform. *Biosens. Bioelectron.* **65**, 152–158 (2015).
185. Robertson, N. M., Toscano, A. E., LaMantia, V. E., Hizir, M. S., Rana, M., Balcioglu, M., Sheng, J. & Yigit, M. V. Unlocked Nucleic Acids for miRNA detection using two dimensional nano-graphene oxide. *Biosens. Bioelectron.* **89, Part 1**, 551–557 (2017).
186. Lee, H., Shapiro, S. J., Chapin, S. C. & Doyle, P. S. Encoded Hydrogel Microparticles for Sensitive and Multiplex microRNA Detection Directly from Raw Cell Lysates. *Anal. Chem.* **88**, 3075–3081 (2016).
187. Stein, E. V., Duewer, D. L., Farkas, N., Romsos, E. L., Wang, L. & Cole, K. D. Steps to achieve quantitative measurements of microRNA using two step droplet digital PCR. *PLoS ONE* **12**, (2017).
188. Deng, H., Liu, Q., Wang, X., Huang, R., Liu, H., Lin, Q., Zhou, X. & Xing, D. Quantum dots-labeled strip biosensor for rapid and sensitive detection of microRNA based on target-recycled nonenzymatic amplification strategy. *Biosens. Bioelectron.* **87**, 931–940 (2017).
189. Zhou, H., Yang, C., Chen, H., Li, X., Li, Y. & Fan, X. A simple G-quadruplex molecular beacon-based biosensor for highly selective detection of microRNA. *Biosens. Bioelectron.* **87**, 552–557 (2017).

Chapitre 2 : description de la plateforme nanofluidique et considérations théoriques sur la capture de miARNs en milieu confiné

Ce chapitre a pour objectif de décrire le système nanofluidique utilisé ainsi que ses caractéristiques et particularités. Il présente également un modèle théorique basé sur une étude par dynamique moléculaire à une dimension. Les simulations effectuées ont pu être confrontées à un modèle COMSOL de calcul par éléments finis décrivant très précisément le système fluidique. Nos résultats établissent une très bonne concordance entre les deux approches. Ce constat a permis l'utilisation du modèle de simulation par dynamique moléculaire dans le but de prédire l'influence de différents paramètres tels que la concentration en cibles miARNs, la pression appliquée, etc. sur la capture des miARNs. On notera alors l'importance de la longueur de capteur analysée dans la mesure finale, celle de la résolution spatiale du capteur sera ensuite discutée.

2.1. Description de la plateforme nanofluidique sélectionnée pour ces études

2.1.1. Considérations générales sur la micro et nanofluidique

La microfluidique est apparue dans les années 1980. Elle est une des conséquences directes des avancées de la microélectronique apparue 20 ans plus tôt. Elle se distingue néanmoins des circuits intégrés par le fait que ce ne sont pas des courants électriques mais des fluides qui sont manipulés. Comme décrit par Georges Whitesides dans la revue Nature en 2006,¹ la microfluidique peut se définir comme « la science et la technologie des systèmes qui manipule des petits volumes (10^{-9} à 10^{-18} litres), en utilisant des dimensions de la dizaine à la centaine de micromètres ». Les avantages de la microfluidique sont nombreux, on peut souligner par exemple la consommation de faibles volumes de fluides, ce qui permet d'économiser du matériel (avantage clé pour une application clinique, où les échantillons biologiques sont souvent peu conséquents) ainsi que d'améliorer l'efficacité des réactions et la dissipation thermique. C'est aussi une technologie à faible coût, robuste et permettant une grande reproductibilité, dans le sens où les flux sont laminaires et donc prévisibles car décrits de manière très fine par des modèles physiques (notamment avec les équations de Navier-Stokes). La microfluidique a fait ses preuves via de multiples applications, allant du domaine biomédical (délivrance de médicament avec dosage précis, biodétection, etc.) jusqu'à la purification de l'eau ou encore les batteries et piles à combustible.

La nanofluidique ou, dans notre cas, la fluidique submicronique (ou encore nanofluidique étendue), complète l'espace entre les objets de taille nanométrique (1 – 10 nm) et la microfluidique (1 – 1000 μm). L'observation de phénomènes liés au confinement de fluide à cette échelle est réalisée depuis plusieurs décennies via l'étude de matériaux naturellement nanoporeux (e.g. zéolite, gel, etc.). On peut cependant souligner que les récentes avancées dans les procédés de nanofabrication ont permis de contrôler les dimensions des systèmes ainsi fabriqués.^{2,3} Cela a, par conséquent, rendu possible la compréhension et la prédiction des effets liés à une réduction des échelles.⁴

Les implications de la nanofluidique ont alors pu être étudiées autant dans le cas de recherches théoriques mettant en avant des propriétés originales (liées à un rapport surface sur volume important inhérent à l'échelle nanométrique),⁵ que pour des applications en biologie et chimie telles que la séparation de molécules avec des nanofiltres,^{6,7} leur pré-concentration⁸ ou encore le confinement de biomolécules dans des nanocanaux.⁹ Enfin, la nanofluidique a des conséquences importantes sur la biodétection, avec notamment des effets sur les réactions mises en jeu.¹⁰ Cependant, ces effets restent, jusqu'à aujourd'hui, peu étudiés. Nous allons, par conséquent, dans la suite du chapitre,

décrire l'intérêt de l'utilisation d'une plateforme nanofluidique dans la détection de miARNs en nous appuyant sur un modèle de simulation par dynamique moléculaire.

2.1.2. Effet de la réduction des échelles sur la détection de biomolécules

2.1.2.1. Intérêt de la réduction des échelles pour la capture des miARNs

Prenons le cas d'un capteur spécifique à une cible biologique d'intérêt en solution couplé à un microcanal ou un nanocanal (cf. Figure 2-1). Les effets du confinement entraînent une réduction importante du temps de diffusion des molécules cibles jusqu'au capteur intégré (car ce temps caractéristique varie en fonction du carré de l'inverse de la hauteur du canal) comme précédemment décrit dans la littérature.¹¹ La conséquence directe est que le taux de capture, c'est-à-dire le ratio entre le nombre de cibles consommées sur le nombre de cibles capturées, est très important. En effet, du fait de ce temps de diffusion considérablement réduit, la probabilité d'une molécule se trouvant dans le canal de rencontrer le capteur lors de son temps de parcours au-dessus de ce dernier est bien plus importante.

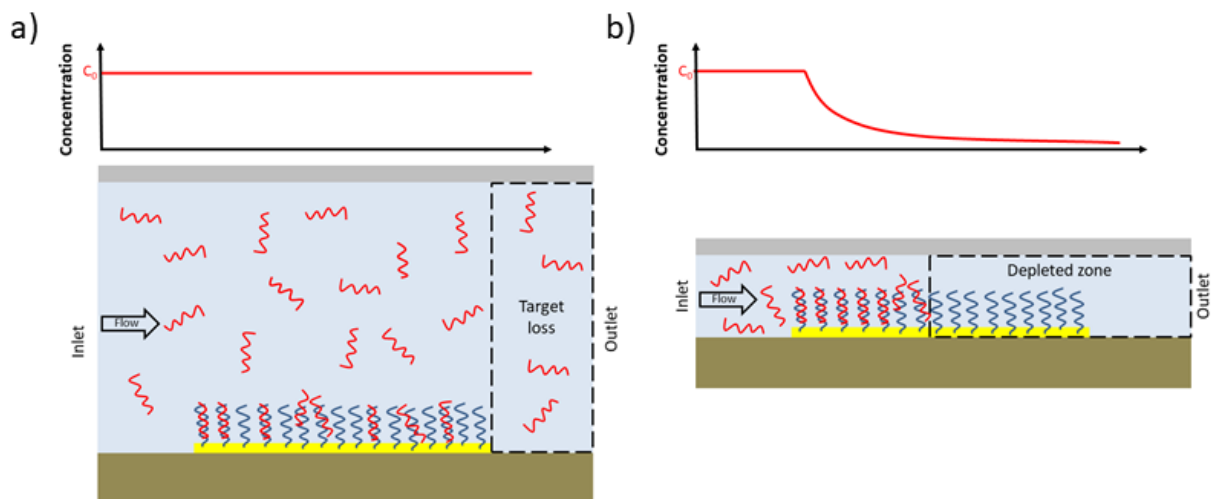


Figure 2-1: différence et implication de la réduction de la hauteur de canal sur la capture de biomolécules dans (a) un système microfluidique et (b) une plateforme nanofluidique : du fait du confinement on observe dans le deuxième cas un gradient spatial de concentration en molécules cibles (en rouge) dû à l'interaction qui s'établit avec les molécules sondes greffées en surface (en bleues). Dans le cas (a) en revanche la concentration en cible est homogène au-dessus de la surface car la hauteur élevée du canal ne permet pas la mise en place d'une interaction pour toutes les molécules cibles : certaines échappent donc à la capture.

Afin de mieux aborder ce problème, il peut être utile de décrire plusieurs grandeurs caractéristiques des systèmes micro et nanofluidiques telles que le nombre de Péclet (Pe_H) qui définit le rapport entre le transport par convection et celui par diffusion. Ainsi dans le cas d'un microcanal, la valeur de Pe_H sera typiquement supérieure à 1, ce qui signifie que l'interaction est limitée par la diffusion des molécules jusqu'au capteur. De la même manière, dans le cas d'un nanocanal, nous obtenons $Pe_H < 1$. Il est alors possible de conclure que l'accroche des cibles sera, cette fois, limitée par la convection, c'est-à-dire la vitesse de la solution au-dessus du capteur.

Pour comprendre comment le capteur interagit avec les cibles en solution, il est intéressant de comparer le nombre de Péclet avec $\lambda = \frac{l}{h}$ où l est la longueur du capteur et h , la hauteur du canal. Comme décrit par Squires *et al.*,¹² dans le cas où le nombre de Péclet est suffisamment petit et λ assez grand, ce qui correspond à un régime limité par la convection couplé à un capteur grand par rapport à la hauteur de canal, il est possible d'obtenir des taux de capture proches de 100%, c'est-à-dire que chaque cible présente en solution a la possibilité d'interagir avec la surface.

Il est aussi intéressant de comparer la vitesse de réaction (liée à l'affinité du duplex mis en jeu et à la densité de sonde) à la vitesse de diffusion des molécules via le nombre de Damköhler, $Da = \frac{\text{vitesse de reaction}}{\text{diffusion}}$. Dans le cas de nanocanaux, tout comme pour le nombre de Péclet, le terme Da est inférieur à 1. Selon la vitesse de convection des cibles au-dessus du capteur, la détection sera alors soit limitée soit par la convection, soit par la réaction en surface du capteur.

Si l'interaction a lieu dans un microcanal (et pour un capteur de taille micrométrique), alors $Pe_H > 1$ et $\lambda \sim 1$; ainsi le taux de capture sera inférieur à 100% et la concentration en cibles sera homogène sur tout la surface du capteur, entraînant une interaction uniforme sur ce dernier. En revanche, dans le cas d'un nanocanal, il est possible d'observer une déplétion des molécules de la solution.¹² En effet, comme le temps de diffusion des cibles jusqu'à la surface est très court ($Pe_H < 1$) et que le capteur est long par rapport à la hauteur du canal ($\lambda > 1$), on mesure, dans un premier temps, l'hybridation des premiers micromètres seuls du capteur. Lorsque la densité de sondes disponibles devient trop faible, la suite du capteur est hybridée et ainsi de suite jusqu'à hybridation totale de la surface. On peut alors parler ici d'hybridation non-uniforme du capteur au cours du temps (cf. Figure 2-1). On peut noter que ce type de phénomènes peut être aussi observable dans des microcanaux pour des surfaces d'accroche de longueur plus importantes et des vitesses de solution très faibles.^{13,14}

Ce type de système est également décrit comme une vague ou onde de cibles capturées par la surface et avançant au-dessus du capteur. En effet, du fait des très faibles volumes consommés, on observe une interaction en surface qui n'est pas homogène, entraînant ainsi la déplétion en cibles de

l'échantillon biologique ; ainsi, l'hybridation du capteur s'effectue à une vitesse bien plus faible que la vitesse de la solution dans le canal.^{15,16}

Ces considérations sont importantes afin de comprendre comment l'accumulation des cibles se déroule dans les conditions où les molécules sont confinées. Elles entraînent, par ailleurs, deux conséquences directes sur la biodétection. La première implique que le volume total de solution cible consommé est bien moindre dans le cas d'un nanocanal pour un même nombre de cibles capturées, ce point est pertinent pour l'étude d'échantillons cliniques souvent en quantité limitée. La deuxième, quant à elle, signifie qu'à volume équivalent les cibles sont hybridées sur une surface plus petite, ce qui signifie que la quantité de sondes hybridées par unité de surface est plus importante dans le cas des nanocanaux (pour un même débit de solution), ce point sera discuté plus amplement lors de l'analyse du modèle de simulation par dynamique moléculaire, à la fin de ce chapitre.

2.1.2.2. Effet connexe sur une détection avec des cibles marquées en fluorescence

Outre les conséquences de la nanofluidique sur la capture des biomolécules, il nous semble important de souligner l'implication d'une réduction de hauteur des canaux dans le cas d'une détection avec des cibles marquées en fluorescence. Ces dernières pourraient, en effet, bruyé le signal mesuré sur la zone du capteur. La mesure ne devient alors possible qu'après une étape de lavage du canal avec une solution sans cible afin de pouvoir permettre la détection. Dans le cas de notre plateforme nanofluidique, nous observons, en revanche, que le nombre de cibles en solution au-dessus du capteur est considérablement réduit (du fait de la réduction de la hauteur de canal), permettant alors une mesure de l'accroche des molécules en fluorescence en temps réel, sans étape de lavage. Par souci de clarté, nous soulignons ce point qui sera d'un intérêt capital dans le chapitre 3 car la détection par fluorescence est le mode de transduction (c'est-à-dire la méthode de détection qui permet de traduire la reconnaissance biologique en signal physique) que nous avons choisi pour la mise en place des manipulations expérimentales.

Il est important de noter que la plateforme nanofluidique, ainsi que le modèle décrit dans la suite du chapitre ont le potentiel d'être appliqués à n'importe quel mode de transduction (SPR, MEMS, etc.).

2.2. Réalisation du dispositif et modèle biologique utilisé

2.2.1. Description du dispositif

Le dispositif nanofluidique utilisé dans ces travaux est fabriqué sur des plaques de silicium standards de 100 mm de diamètre à l'aide des technologies de micro-fabrication issues de l'industrie microélectronique. Nous décrirons, dans cette partie, le design du dispositif, ainsi que son procédé de fabrication.

2.2.1.1. Conception des puces nanofluidiques

Le dispositif utilisé pour la détection de miARNs consiste en six canaux nanofluidiques d'une hauteur de 500 nm pour une largeur de 50 μm et une longueur de 500 μm . Au sein des nanocanaux se trouvent des plots en or de 50 μm par 50 μm (i.e. sur toute la largeur du canal), qui permettent d'effectuer des modifications de surface sélectives afin de rendre le dispositif spécifique d'une (ou plusieurs) espèce chimique ou biologique. Chaque nanocanal dispose de trois plots en or (qui constituent notre capteur dans le cas d'une détection en fluorescence, ils pourraient cependant être remplacés par n'importe quel type de capteur), la puce fluidique est donc composée, au total, de 18 zones de détection. Enfin, les nanocanaux sont reliés à des microcanaux d'une hauteur de l'ordre de 10 μm . Du fait de leur plus faible résistance hydrodynamique, ces derniers permettent les connections aux deux entrées et deux sorties de la puce tout en facilitant le remplissage des canaux fluidiques. On note que chaque puce présente une taille de 16 par 16 mm, ce qui permet d'en fabriquer jusqu'à 16 sur une seule et même plaque en silicium (cf. Figure 2-2).

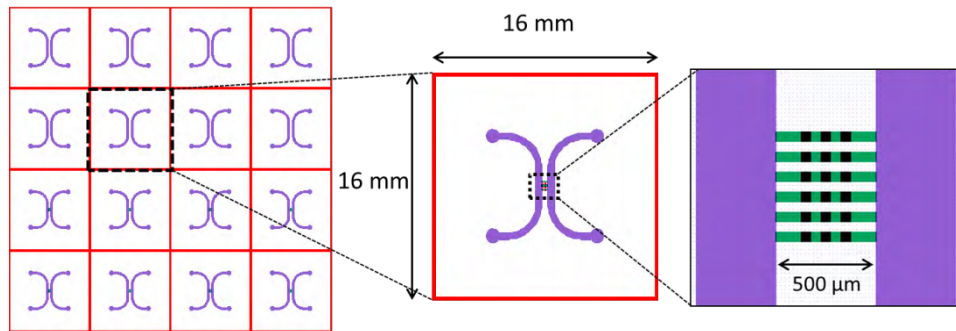


Figure 2-2: design des puces nanofluidiques (en rouge) qui comportent deux microcanaux (violets) reliés à deux entrées et deux sorties, et permettant le remplissage des nanocanaux (verts) dans lesquels se trouvent des patches en or (en noir).

2.2.1.2. Fabrication des puces fluidiques

Le principe de fabrication repose sur deux étapes de photolithographie successives puis un dépôt par évaporation des plots en or. De manière succincte, la photolithographie consiste à utiliser une couche de résine photosensible déposée via une enduction. Une étape d'insolation dans les ultraviolets de la plaque enduite de résine permet de changer la solubilité de la couche déposée localement. Ensuite, une étape de développement dans un solvant approprié rend possible la solubilisation de la résine sur des zones bien spécifiques avec une résolution de l'ordre du micromètre. La structuration de cette couche de résine permet d'exposer la surface de silicium à des attaques physico-chimiques afin de permettre sa gravure, tout en masquant les zones de la plaque en silicium que l'on souhaite laisser intactes.

Les premières étapes du procédé de fabrication des puces fluidiques consistent à graver de manière successive les micro puis les nanocanaux dans la plaquette de silicium (cf. Figure 2-2). Ensuite, une oxydation thermique est effectuée entre 800 et 1 200°C afin d'obtenir la formation d'une couche d'oxyde de silicium sur toute la surface de la plaque. Cette dernière est essentielle afin de rendre la surface des canaux hydrophile pour faciliter leur remplissage. En effet, ces dispositifs sont destinés à des applications en milieu liquide et la formation de bulles lors du remplissage des canaux peut parfois s'avérer très problématique.

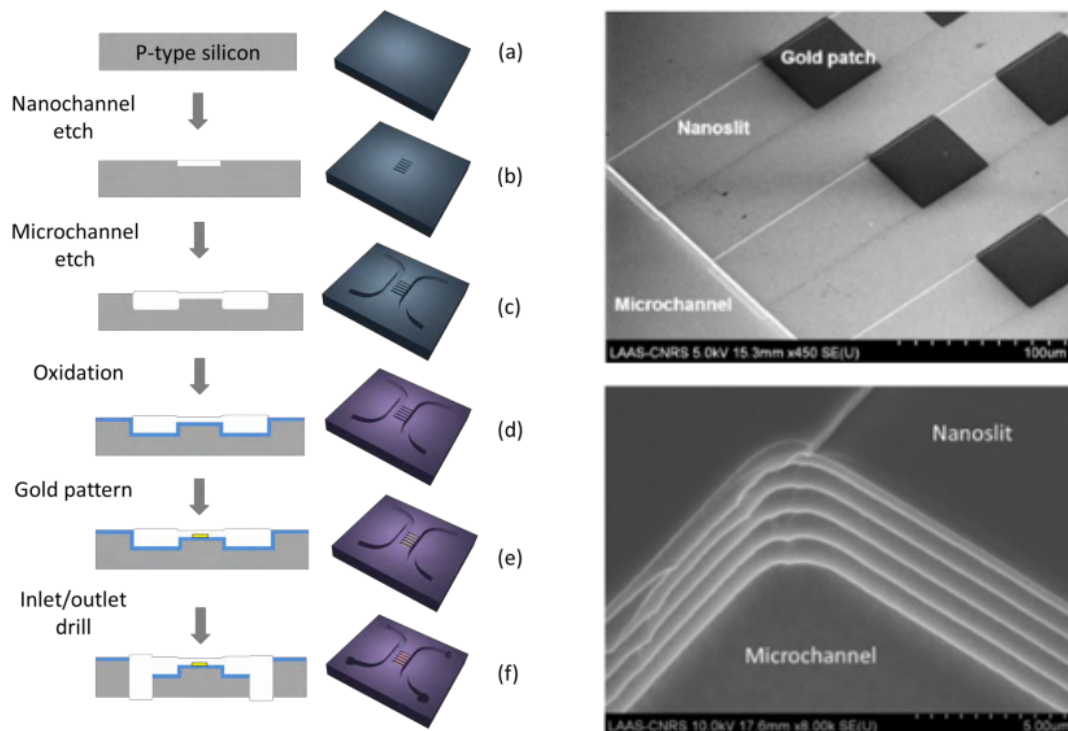


Figure 2-3 : étapes du procédé de fabrication des puces nanofluidiques réalisé en salle blanche (à gauche) et images MEB (microscope électronique à balayage) des micro et nanocanaux ainsi réalisé (à droite) : en haut nous observons les différents nanocanaux en parallèles et dans lesquels se trouvent les plots en or, l'image du bas montre la liaison d'un nanocanal avec un micro canal suite à une gravure ionique réactive.¹⁷

La dernière étape de procédé en salle blanche consiste à déposer les plots en or dans les nanocanaux déjà formés. Pour ce faire, et comme dans les cas précédents, une couche de résine photosensible est déposée sur la plaque. Après ouverture de la résine au niveau de l'emplacement voulu des plots en or, deux dépôts successifs, le premier de chrome puis le second d'or, sont effectués par évaporation thermique. La couche d'accroche en chrome est nécessaire pour garantir la bonne adhésion du dépôt d'or qui permet le greffage des molécules sondes par la suite. La hauteur cumulée de métal ainsi déposée est d'environ 100 nm. Ainsi, après retrait de la couche de résine, le dépôt de métal est retrouvé exclusivement au niveau des zones où cette dernière était ouverte. Enfin, la plaque est percée dans toute sa hauteur au niveau des entrées et sorties fluidiques à l'aide d'une sableuse. Cette étape se fait dans un environnement beaucoup moins propre nécessitant une protection de la plaque via la lamination d'un film sec. A ce stade de la fabrication, la puce fluidique n'est toujours pas encapsulée afin de rendre possible la fonctionnalisation biologique des plots en or.

2.2.2. De la nanofluidique au bio-capteur

2.2.2.1. Fonctionnalisation de surface, packaging et mise en place expérimentale

2.2.2.1.1. Fonctionnalisation de surface et encapsulation des canaux

L'étape de biofonctionnalisation de la surface est nécessaire à la biorecognition des miARNs ; l'objectif de cette procédure est de rendre les plots en or spécifiques pour la capture d'une séquence miARN donnée sur la surface. Pour ce faire, on utilise des bases ADN simple brin complémentaires aux cibles et thiolées en fin de séquence, qui sont synthétisées par des prestataires de service. Le greffage de ces sondes sur la surface est réalisé via une interaction thiol-or en incubation avant encapsulation de la puce fluide (c'est-à-dire avant le capotage des canaux). Suite au greffage des molécules sondes, la surface est passivée avec du MCE (mercaptoéthanol) afin d'éviter toute interaction non spécifique avec la surface en or par la suite. Ces deux étapes nécessitent un temps d'incubation d'une heure chacune afin d'atteindre l'état d'équilibre. Cette méthode a été largement décrite dans la littérature^{18,19} : elle permet un greffage robuste de par l'interaction thiol/or, ainsi qu'une maîtrise fine de la densité de greffage. On peut souligner que l'interaction mise en place est, aujourd'hui, toujours étudiée car mal comprise.²⁰ Cette couche d'accroche permet alors l'accumulation des miARNs cibles via une hybridation avec les sondes (cf. Figure 2-4).

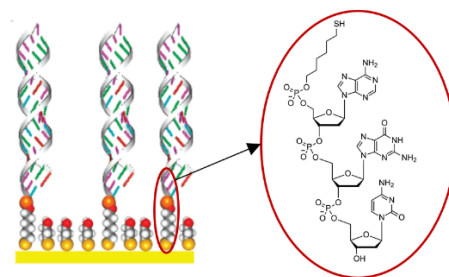


Figure 2-4 : greffage de sondes ADN thiolées couplées à des molécules de MCE sur une surface d'or et structure chimique de la fonction thiol liée à un début de séquence.^{19,21}

Suite à cette étape de fonctionnalisation, la puce est encapsulée par le scellage des canaux. Pour ce faire, des lamelles en verre de 20 par 20 mm sont, dans un premier temps, enduites d'une solution de

h-PDMS (hard-polydiméthylsiloxane) (cf. protocole en Annexe B). Le polymère ainsi déposé est alors recuit puis traité au plasma O₂ avant encapsulation à température ambiante. Le h-PDMS a l'avantage d'avoir un module d'Young de l'ordre de 10 MPa, soit une rigidité trois fois plus importante que le PDMS habituel. Cela permet l'encapsulation des nanocanaux tout en évitant un contact entre le polymère et le canal comme cela aurait été le cas avec du PDMS qui se serait déformé bien plus facilement.²²

2.2.2.1.2. Mise en place expérimentale

Afin de simplifier l'étude expérimentale de l'accroche des miARNs dans des canaux nanofluidiques, le choix a été fait de s'orienter vers une détection en fluorescence. Ce choix est justifié par trois points distincts et complémentaires pour rendre la détection la plus simple possible :

- i. Le capteur n'est autre qu'un plot en or fonctionnalisé biologiquement et intégré dans le canal. L'absence de verrou technologique important autorise la mise en place d'un capteur robuste.
- ii. Le matériel nécessaire pour la détection en fluorescence, i.e. microscope optique couplé à un ordinateur permettant l'acquisition des données via une caméra, est un matériel courant et commun aux laboratoires de biologie.
- iii. Il est facile de se procurer des séquences miARNs déjà marquées avec un fluorophore d'intérêt.

La mise en place expérimentale consiste donc en un microscope inversé sur lequel est posée la puce fluidique elle-même insérée dans un support. Ce dernier permet, à la fois, l'observation optique ainsi que la connexion des entrées et sorties fluidiques de la puce à des réservoirs contenant les solutions d'intérêt. Ces réservoirs sont connectés à un régulateur en pression qui contrôle les vitesses de solution à l'intérieur du système fluidique. Enfin, un ordinateur pilote les différentes consignes de pression et permet l'acquisition d'images optiques via une caméra (cf. Figure 2-5).

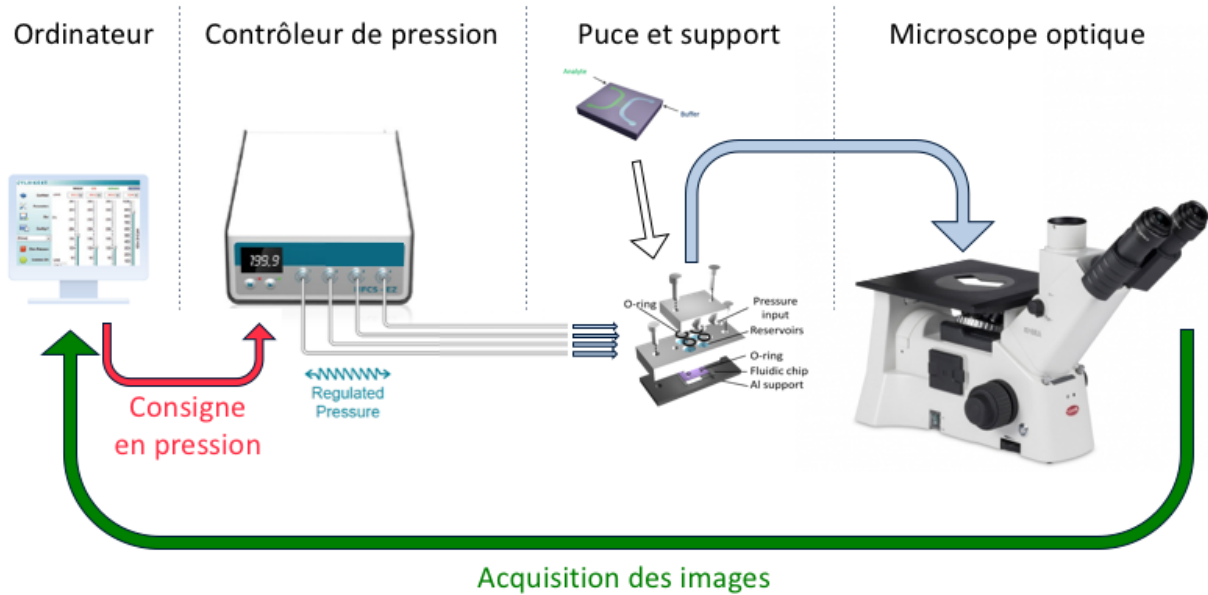
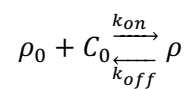


Figure 2-5 : mise en place expérimentale de la détection en fluorescence.

2.2.2.2. Implication du modèle biologique sur la détection

Le modèle biologique décrit a des conséquences directes sur la sensibilité du capteur. En effet, le choix des séquences sondes et leur greffage définit des constantes d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) entre les duplex spécifiques alors formés ainsi qu'une densité de sondes dépendante du protocole de greffage. Une réaction d'ordre 2 définit les interactions entre les cibles (C_0) et les sondes greffées en surface (ρ_0) :



La constante d'affinité (ou de dissociation à l'équilibre) d'un couple ADN/miARN est défini de la façon suivante:

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (1)$$

Dans notre cas, c'est-à-dire pour des couples ARN/ADN d'une vingtaine de bases azotées, la valeur de k_{on} est proche de $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et celle de k_{off} est de l'ordre de 10^{-4} s^{-1} comme décrit dans la littérature,^{23,24} ce qui correspond donc à une constante d'affinité de 2 nM. Ce nombre correspond à la concentration en cibles pour laquelle 50% des sondes sont hybridées à l'équilibre. Ainsi, plus la constante d'affinité est faible, plus la biorecognition est sensible car, pour une même concentration, le nombre de sondes hybridées est plus important.

L'affinité entre les deux séquences peut être améliorée en intégrant dans cette dernière des bases de différents types telles que les bases LNA (locked nucleic acid) qui ont une plus grande affinité avec, à la fois, les séquences ARN et l'ADN.²⁵ Cet analogue d'acide nucléique contient, en effet, un pont méthylène au niveau du sucre qui compose sa base azotée, lui conférant ainsi des propriétés au niveau de sa conformation spatiale qui rend l'interaction plus efficace. Il est également possible d'ajuster la température, le pH ou bien la salinité des solutions cibles, avec pour but de modifier la stringence de la solution, afin de favoriser ou non l'association et la dissociation des cibles avec leur sonde complémentaire. L'influence de ces paramètres est directement mesurée via la détermination de la constante d'affinité K_D , qui permet de calculer l'énergie libre nécessaire à la formation du duplex, à l'aide de la constante universelle R des gaz parfaits et de la température T à laquelle s'effectue l'interaction :

$$\Delta G^0 = -RT \times \ln(K_D) \quad (2)$$

La température de fusion correspond à la température pour laquelle la moitié des sondes est hybridée à l'équilibre, et ce en excès de cibles, ce qui dénote également l'importance de la densité de sonde sur la détection des cibles. En effet, plus cette dernière est élevée, plus le signal obtenu pour une surface donnée augmente. Cependant, la densité doit être ajustée avec prudence, en effet, à des densités en sondes trop importantes, des effets stériques peuvent survenir, entraînant une constante d'association plus faible car l'interaction devient plus difficile à mettre en place énergétiquement. Dans le cas des sondes ADN linéaires, l'ordre de grandeur de la densité optimale de sonde est de 10^{-7} mol/m^2 comme décrit dans plusieurs articles en fonction des conditions de greffage.^{18,19}

2.3. Construction d'un modèle 1D pour l'étude de la capture des miARNs

En guise d'introduction à cette partie, nous décrivons les cinétiques d'accroche sur des surfaces d'une simple réaction de second ordre, dans le cas où la surface est exposée à une concentration en cibles C_0 constante :

$$\rho(t + dt) = C_0 k_{on} \rho_0 \left(1 - \frac{\rho(t)}{\rho_0}\right) dt - k_{off} \rho(t) dt \quad (3)$$

Ce modèle permet de prédire le nombre de sondes hybridées pendant un intervalle de temps dt par la solution cible à une concentration C_0 . Pour ce faire, il est nécessaire de définir deux variables caractéristiques, et déjà décrites, qui sont (i) la constante d'association (k_{on}) et (ii) la constante de dissociation (k_{off}) (qui correspond à l'inverse du temps de résidence d'une molécule en interaction). La première est exprimée en $1/(M.s)$, et donc définie pour une concentration en cibles donnée, contrairement à la constante de dissociation qui est exprimée en $1/s$ qui est, quant à elle, indépendante du nombre de miARNs en solution.

Le nombre de sondes hybridées en fonction du temps, dans le cas d'une concentration en cibles constante, est bien connu et peut être déduit directement de l'équation différentielle (3) :^{26,27}

$$\rho(t) = \frac{k_{on} C_0 \rho_0}{k_{on} C_0 + k_{off}} \left(1 - e^{-(k_{on} C_0 + k_{off})t}\right) \quad (4)$$

Avec $\rho(t)$ la densité de sondes hybridées au temps t , C_0 la concentration en miARNs cibles et ρ_0 la densité de sonde sur la surface. De l'équation (4) il est possible de déterminer le taux d'hybridation à l'équilibre, c'est-à-dire lorsque t tend vers l'infini. On obtient alors :

$$\frac{\rho(t \rightarrow \infty)}{\rho_0} = \frac{k_{on} C_0}{k_{on} C_0 + k_{off}} \quad (5)$$

Cependant, dans notre système nanofluidique, la concentration en cibles au-dessus du capteur n'est pas connue car cette dernière est dépendante de l'interaction en début de capteur qui appauvrit la solution en cibles. Le modèle de Langmuir nous permet donc de prédire le comportement du capteur seulement en son début, où la concentration est celle de la solution.

Ainsi, il est impossible de prédire de manière analytique le taux d'hybridation à un instant t en tout point du capteur du fait de l'interaction non-uniforme sur la surface. De la même manière, il devient impossible de définir le taux de dissociation en chaque instant, en raison de notre incapacité à déterminer le nombre de sondes hybridées. Le modèle de Langmuir, habituellement utilisé pour caractériser les interactions en surface dans des systèmes microfluidiques, ne peut donc pas être appliqué dans notre cas à l'échelle du capteur.

2.3.1. Description du modèle

D'après les remarques effectuées ci-dessus, nous pouvons décrire notre système grâce à l'équation suivante :

$$\rho(t + dt, x) = C(t, x)k_{on}\rho_0 \left(1 - \frac{\rho(t, x)}{\rho_0}\right) dt - k_{off}\rho(t, x)dt \quad (6)$$

Nous pouvons remarquer que dans notre cas, le système n'évolue plus pour une concentration constante de cibles au-dessus du capteur, en raison du gradient de concentration en cibles qui se forme au-dessus de la surface d'interaction.

L'équation (6) est compliquée à résoudre analytiquement. Des méthodes de calcul par éléments finis ont été employées pour résoudre ce type de problème. C'est notamment cette méthode que Zimmermann *et al.* ont utilisé dans leurs travaux.²⁸ Bien que les auteurs se placent dans la situation d'un microcanal, une description similaire à notre approche peut être faite dans le cas de très faible vitesse de solution et de fortes densités de sonde. Nous verrons, dans la suite du mémoire, que les conclusions de cette publication sont très proches de notre analyse. Cependant, nous avons choisies une approche différente pour aborder l'équation (6).

La prédiction de l'accroche des molécules cibles sur le capteur a été réalisée à l'aide d'une dynamique moléculaire simulée via MATLAB (en anglais *matrix laboratory*). Le modèle est très simple et consiste

en un flux de molécules cibles à une concentration C_0 animées d'une vitesse v_m sur une surface où la densité de sondes est ρ_0 . Le duplex cible/sonde présente une probabilité d'association P_{on} et une probabilité de dissociation P_{off} (cf. Figure 2-6) qui sera défini plus en détail dans la suite du rapport de thèse. Le point central, ici, est que la probabilité d'association est donnée pour une molécule et appliquée à l'ensemble du système. Ceci, et contrairement au modèle présenté plus-haut, pour lequel l'association est déterminée pour une concentration constante de cibles, nous permet de décrire l'accroche des cibles sur le capteur dans le cas d'une concentration en cibles variable spatialement.

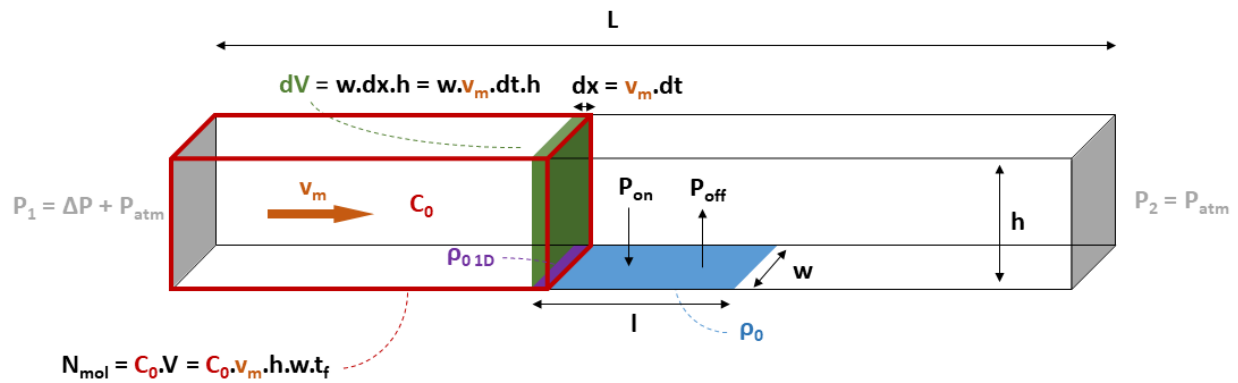


Figure 2-6 : principe du modèle 1D : des cibles à une concentration C_0 dans un nanocanal de longueur L , hauteur h et largeur w arrivent à une vitesse v_m au-dessus de la surface de capture d'une longueur l et dont la densité de sondes est ρ_0 . On considère pour chacune des cibles une probabilité d'association P_{on} et de dissociation P_{off} .

La question concernant l'interaction des cibles au niveau du capteur avec la surface reste entière. Afin de simplifier le problème, celui-ci est posé à une dimension, en négligeant volontairement le profil de vitesse dans la hauteur du canal et en définissant une vitesse moyenne, v_m , sans prendre en considération la hauteur de la molécule dans le canal :

$$v_m = \frac{h^2 \Delta P}{12 \mu L} \quad (7)$$

Avec h la hauteur du canal, L sa longueur, ΔP la différence de pression appliquée et μ la viscosité de la solution définie en fonction de la température T d'interaction²⁹ telle que :

$$\mu = 2,414 \times 10^{-5} \times 10^{\frac{247,8}{T-140}} \quad (8)$$

De plus, le bruit thermique, c'est-à-dire la diffusion des molécules dans la direction du flux, n'est également pas considéré dans le cas présent. Dans ce système, deux phénomènes physiques interviennent : la convection des molécules jusqu'au capteur et leur réaction avec la surface. Les différentes variables liées à l'expérience sont liées soit aux dimensions du canal et du capteur (h, w, l et L), au modèle biologique (ρ_0 , k_{off} et k_{on}) ou encore aux conditions de l'expérience (C_0 , T et ΔP) (cf. Tableau).

Symbole	Valeur	Unité	Définition
h	450.10^{-9}	m	Hauteur du canal
w	50.10^{-6}	m	Largeur du canal
L	500.10^{-6}	m	Longueur du canal
l	50.10^{-6}	m	Longueur du capteur
ρ_0	$1,7.10^{-7}$	mol/m ²	Densité de molécules sondes
k_{on}	50	m ³ /(mol.s)	Constante d'association
k_{off}	10^{-4}	1/s	Constante de dissociation
C_0	10^{-4}	mol/m ³	Concentration en molécules cibles
T	293,15 – 323,15	K	Température
ΔP	$10^3 - 10^5$	Pa	Différence de pression

Tableau 2-1 : variables liées à la géométrie de la puce, au modèle biologique et aux paramètres choisis pour la simulation.

La définition des probabilités d'association et de dissociation pendant le pas de temps dt de la simulation est essentielle au calcul numérique. La probabilité de dissociation P_{off} pendant un temps dt pour chaque molécule en interaction donnée par le modèle de Langmuir est indépendante de la concentration en cibles en solution :

$$P_{off} = k_{off} dt \quad (9)$$

Cependant l'association vaut pour une concentration globale de cibles. Qu'en est-il de la probabilité d'une molécule unique présente au-dessus du capteur d'interagir avec la surface ? Nous évoquons

donc ici une probabilité moyenne, c'est-à-dire que cette probabilité ne dépend pas de la position en z de la molécule dans le canal car nous sommes dans un modèle 1D.

En début de capteur, la concentration C_0 homogène pendant un temps dt permet de quantifier le nombre de molécules qui vont hybrider la surface ($N_{interaction}$) selon l'équation suivante :

$$N_{interaction} = C_0 k_{on} \rho_0 dx w \left(1 - \frac{\rho}{\rho_0}\right) dt = C_0 k_{on} \rho_0 v_m w \left(1 - \frac{\rho}{\rho_0}\right) dt^2 \quad (10)$$

Avec dx la longueur de capteur pour laquelle la concentration en cible est constante et w la largeur du capteur. De la même manière, il est possible de déterminer le nombre de molécules ($N_{molécules}$) qui ont la possibilité d'interagir avec la surface pendant le temps dt :

$$N_{molécules} = C_0 v_m dt w h \quad (11)$$

On obtient alors une probabilité d'interaction par molécule P_{on} qui correspond au ratio entre le nombre de molécules qui ont effectivement interagi et le nombre de molécules amenées au-dessus du capteur pendant un temps dt :

$$P_{on} = \frac{N_{interaction}}{N_{molécules}} = \frac{C_0 k_{on} \rho_0 v_m w \left(1 - \frac{\rho}{\rho_0}\right) dt^2}{C_0 v_m dt w h} = \frac{k_{on} \rho_0}{h} \left(1 - \frac{\rho}{\rho_0}\right) dt \quad (12)$$

On constate alors que la probabilité d'association d'une molécule dépend de :

- La hauteur du canal : plus ce dernier a une faible hauteur, plus la probabilité d'interaction est forte, cela est lié au confinement des molécules qui auront une probabilité plus importante de diffuser jusqu'à la surface.
- La constante d'association (c'est-à-dire la facilité énergétique à mettre en place l'interaction entre les deux molécules sonde et cible) : plus cette dernière est élevée, plus la probabilité d'association est grande.

- La densité de sonde disponible : dans des situations de déficit en sondes greffées, par exemple, la probabilité d'interaction est faible.

Il est donc possible de récapituler les différentes variables mises en place (cf. Tableau 2-2) et dépendantes des conditions de l'expérience (cf. Tableau).

Symbole	Formule	Unité	Ordre de grandeur	Définition
v_m	$\frac{h^2 \Delta P}{12\mu L}$	m/s	10^{-5} - 10^{-3}	Vitesse moyenne
μ	$2.414 \times 10^{-5} \times 10^{\frac{247.8}{T-140}}$	Pa.s	10^{-3}	Viscosité de la solution ²⁹
P_{on}	$\frac{k_{on}\rho_0}{h} \left(1 - \frac{\rho}{\rho_0}\right) dt$	1	$[0, 10^{-3}]$	Probabilité d'association
P_{off}	$k_{off} dt$	1	10^{-7}	Probabilité de Dissociation

Tableau 2-2 : récapitulatif des variables nécessaires à la simulation par dynamique moléculaire.

2.3.2. Approximations et résolution du modèle

Nous allons maintenant définir différentes variables afin de permettre une résolution plus rapide du calcul numérique.

2.3.2.1. Utilisation d'un nombre de molécules réduit

Dans un premier temps, il est important de considérer que le nombre réel de molécules qui peut interagir avec le capteur est très important. Dans le cas d'une pression de 500 mbar appliquée à une concentration en cibles de 100 nM pendant 10 min, le nombre de molécules à simuler est de l'ordre de 10^8 (soit 0,1 fmol). Afin de réduire le temps de calcul de la simulation, nous avons donc fixé un nombre de molécules réduit $N_{\text{molécules réduit}}$ équivalent à 10^4 . Il est alors possible de définir un facteur de réduction α , qui n'est autre que le rapport entre le nombre de molécules réduit et le nombre réel de molécules :

$$\alpha = \frac{N_{\text{molécules réduit}}}{N_{\text{molécules}}} = \frac{10^4}{C_0 v_m t_f w h} \quad (13)$$

Avec t_f le temps total de l'expérience.

Ce facteur de réduction peut alors être appliqué à la densité de sonde afin de l'adapter au choix fait sur le nombre réduit de molécules simulées ; on obtient alors une densité de sonde réduite :

$$\rho_0 \text{ réduit} = \alpha \times \rho_0 \quad (14)$$

Enfin, ce nombre de molécules réduit permet de connaître le pas de temps entre chaque molécule qui arrive au niveau du capteur, $dt_{\text{molécules}}$, tel que :

$$dt_{\text{molécules}} = \frac{t_f}{N_{\text{molécules réduit}}} \quad (15)$$

Nous avons donc défini ici de nouvelles variables nécessaires à la simulation, qui sont fixées par l'utilisateur (cf. Tableau 2-3).

Symbole	Valeur	Unité	Définition
t_f	600	s	Temps total de la mesure
$N_{\text{molécules}}$	$C_0 N_a h w v_m t_f \sim 10^8$	1	Nombre total de molécules
$N_{\text{molécules réduit}}$	10^4	1	Nombre de molécules réduit
α	$\frac{N_{\text{molécules réduit}}}{N_{\text{molécules}}} \sim 10^{-4}$	1	Facteur de réduction
$\rho_0 \text{ réduit}$	$\alpha \times \rho_0$	$1/\text{m}^2$	Nombre de sondes réduit
$dt_{\text{molécules}}$	$\frac{t_f}{N_{\text{molécules réduit}}} \sim 10^{-2}$	s	Flux de molécule réduit par unité de temps

Tableau 2-3 : variables permettant de réduire le temps de calcul en adaptant le nombre de molécules simulées et la densité de sonde.

2.3.2.2. Choix des pas temporel et spatial

Afin d'optimiser les temps de calcul, nous avons souhaité optimiser le pas spatial dx et, par conséquent, dt . On peut, dans un premier temps, définir un pas en x minimal, lié à la résolution de notre mesure. Dans notre cas, la taille d'un pixel lors d'expérience avec un objectif 10x en microscopie est de l'ordre du micromètre. Il est donc inutile d'obtenir une résolution spatiale inférieure au micromètre car la mesure ne sera pas plus résolue. On obtient donc :

$$dx_{min} = 1 \mu m$$

Afin d'optimiser le temps de calcul, il est utile de définir un pas en x maximal afin de pouvoir intégrer l'accroche des molécules sur plusieurs micromètres. Pour ce faire, il est essentiel de connaître la distance sur laquelle l'hybridation se fera de manière homogène (c'est-à-dire à C_0 constant) après un temps caractéristique t_i , qui correspond à l'intervalle de temps durant lequel nous souhaitons connaître la cinétique de la capture des molécules.

La vitesse v_i d'interaction, c'est-à-dire la vitesse à laquelle le front d'hybridation à C_0 constant progresse, est connue et définie dans la littérature par l'équation suivante :¹⁵

$$v_i = \left(1 + \frac{1}{\frac{C_0 h}{\rho_0} \left(1 + \frac{k_{off}}{k_{on} C_0} \right)} \right)^{-1} v_m \quad (16)$$

On peut noter que ce calcul de vitesse d'interaction n'est valable que pour des surfaces à forte capacité de réaction, c'est-à-dire que :

$$\frac{C_0 \times h}{\rho_0} \ll 1$$

Des cas limites peuvent alors intervenir selon la longueur du capteur l . Une variable intéressante à étudier, appelée deuxième nombre de Damkhöler (Da_s), correspond au ratio entre la vitesse de réaction et la vitesse de convection :

$$Da_s = \frac{k_{on}\rho_0 l}{v_m h} \quad (17)$$

Dans le cas où ce nombre est très grand par rapport à 1, nous ferons face à une avancée très lente du front de molécules cibles capturées ; dans le cas inverse, une hybridation homogène sur l'ensemble du capteur sera privilégiée. Le pas en x correspondant à la distance effectuée par ce front pendant l'intervalle de temps d'intérêt t_i , c'est-à-dire la résolution temporelle de la cinétique d'hybridation (expérimentalement, ce temps est de l'ordre de $10\text{-}10^2$ secondes), peut être défini de la façon suivante :

$$dx_{max} = v_i t_i \quad (18)$$

Dans le cas où dx_{max} est inférieur à dx_{min} , ce qui survient lorsque la vitesse de la solution au-dessus du capteur et la concentration en cibles sont très faibles, on définit $dx = dx_{min}$, et, dans le cas contraire, $dx = dx_{max}$. L'intérêt ici est donc d'obtenir une bonne résolution spatiale tout en optimisant le temps de calcul. En effet, pour ne prendre qu'un exemple, pour des duplex avec peu d'affinité ou des vitesses de solution très rapides, l'hybridation du canal peut devenir très uniforme, rendant ainsi possible l'utilisation d'un pas spatial de simulation plus important.

Nous définissons alors un pas temporel, dépendant de notre résolution spatiale ainsi que de la vitesse de la solution. Nous souhaitons que la distance parcourue pendant l'intervalle de temps dt soit négligeable par rapport au pas spatial, ce qui se traduit par :

$$dt \ll \frac{dx}{v_i}$$

On peut, encore une fois, récapituler les différentes variables définies ici afin d'optimiser le temps de calcul du programme MATLAB (cf. Tableau 2-4).

Symbole	Valeur	Unité	Définition
t_i	100	s	Intervalle entre chaque mesure
v_i	$\left(1 + \frac{1}{\frac{C_0 h}{\rho_0} \left(1 + \frac{k_{off}}{k_{on} C_0}\right)}\right)^{-1} v_m$	m/s	Vitesse du front de concentration en cibles dans le canal
dt	$dt \ll \frac{dx}{v_i} \sim 10^{-4}$	s	Pas de temps
dx	$[10^{-6}, dx_{max} = v_i t_i]$	m	Pas de distance

Tableau 2-4 : variables permettant d'optimiser les pas temporel et spatial.

2.3.2.3. Fonctionnement de l'algorithme

Une fois les différentes variables mises en place et définies, il est très facile de simuler l'accroche des cibles sur la surface via l'algorithme ci-dessous (cf. Figure 2-7) (cf. Annexe C pour le code MatLab complet).

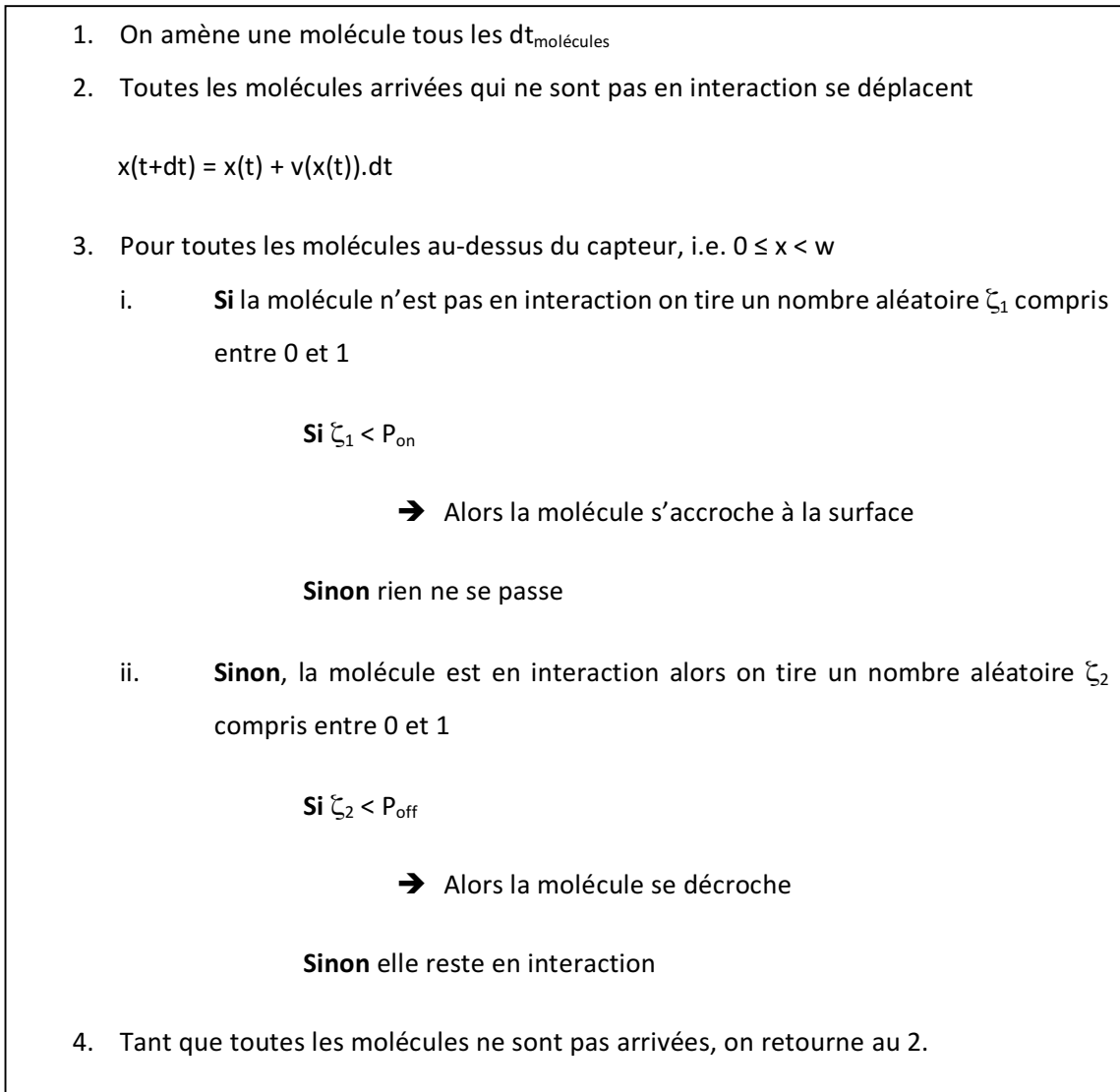


Figure 2-7 : algorithme permettant la simulation de l'accroche des cibles sur la surface.

De manière synthétique, on définit un pas spatial dx sur lequel une quantité de sondes est disponible et connue. Tous les $dt_{\text{molécules}}$, une cible arrive au niveau du capteur et peut alors commencer à interagir avec ce dernier. Pour toutes les molécules au-dessus du capteur, un changement de position le long du canal est effectué si elles ne sont pas en interaction, puis un dé est lancé (avec une valeur entre 0 et 1) et sa valeur est comparée à une probabilité associée au fait que la molécule rentre en interaction. Si le nombre aléatoire tiré a une valeur inférieure à P_{on} (dans le cas d'une molécule en solution) alors cette dernière est désormais considérée en interaction et ne changera pas de position jusqu'à une éventuelle dissociation. Pour qu'il y ait dissociation, il faut donc que la molécule soit en interaction et que le nombre aléatoire tiré soit inférieur à P_{off} . Ces conditions sont testées tous les pas de temps dt et ce jusqu'à l'arrivée de toutes les molécules au-dessus du capteur.

2.3.3. Comparaison avec un modèle COMSOL

Un modèle COMSOL très fin de calcul par éléments finis déjà décrit et validé dans des publications précédentes^{17,30} a été comparé avec ce nouveau modèle 1D. Brièvement, la référence COMSOL est un modèle en deux dimensions de simulation dans lequel interviennent (i) la convection des molécules due à l'application d'une pression à l'entrée du canal, (ii) la diffusion des molécules et (iii) le flux de réaction directement dérivé de l'adsorption en fonction de la concentration et la dissociation des molécules via le modèle de Langmuir. De la même manière que dans le modèle 1D, la viscosité est calculée en fonction de la température. En revanche, le champ de vitesse est, quant à lui, dépendant de la position de la molécule dans la hauteur du canal (contrairement au modèle 1D développé dans ce chapitre).

Toutes les simulations présentées dans la suite du chapitre ont été répétées avec le modèle COMSOL. Ces dernières balayent trois ordres de grandeur en pression appliquée (c'est-à-dire en vitesse de solution) de 5 mbar à 500 mbar et trois ordres de grandeur en concentration de 1 nM à 100 nM. Ceci correspond à neuf ordres de grandeurs différents en termes de nombre de cibles pouvant interagir avec la surface.

Afin de comparer les deux approches, nous avons évalué le coefficient de détermination entre les prédictions des deux modèles. Pour ce faire, les cinétiques du taux d'hybridation des sondes pour différentes longueurs de capteur analysées (1 μm , 5 μm , 10 μm , 25 μm et 50 μm) ont été simulées dans les cas des neuf conditions décrites ci-dessus. Les cinétiques prédites par les deux modèles pour une concentration en cibles de 10 nM, une longueur de capteur analysée de 50 μm et les trois conditions de pression appliquée sont présentées dans la Figure 2-8 en guise d'exemple.

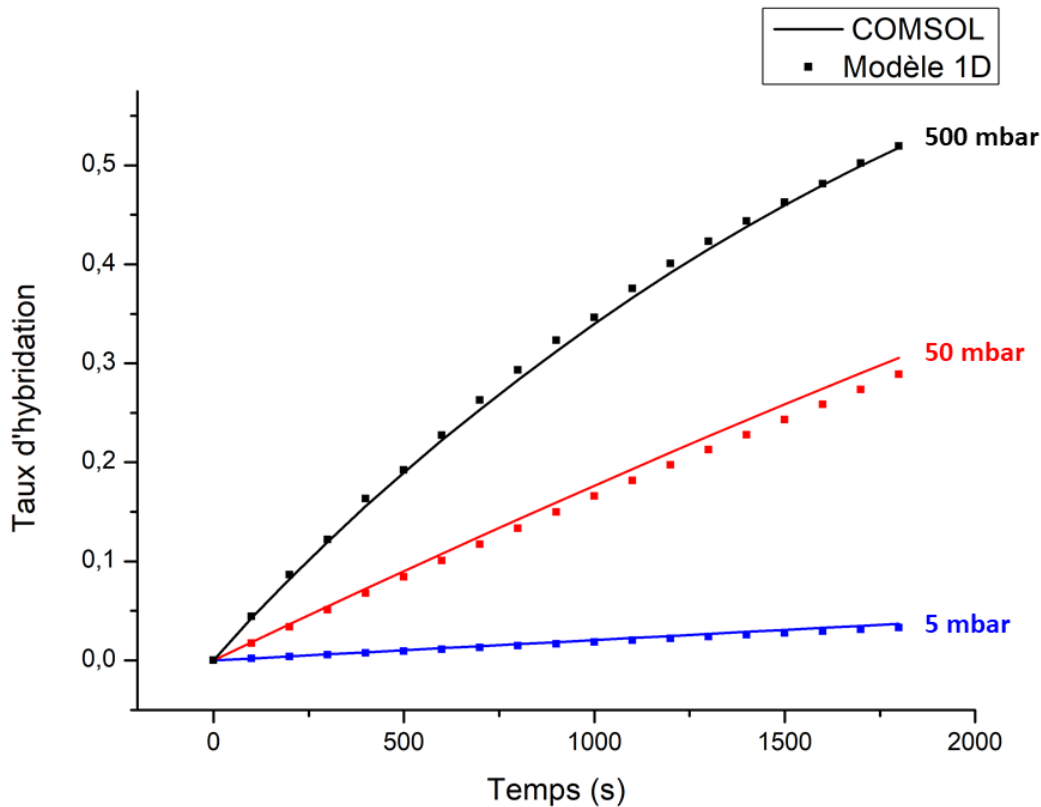


Figure 2-8 : comparaison des cinétiques des deux modèles pour une concentration en cible de 10 nM et une longueur de capteur analysée de 50 μm .

En élargissant cette analyse à l'ensemble des variables, on obtient le graphe présenté en Figure 2-9. On mesure un R^2 moyen de 0,98 entre les courbes cinétiques prédites par le modèles COMSOL et le modèle présenté dans ces travaux (cf. Figure 2-9). D'après ce graphe, on note quelques disparités avec des coefficients de déterminations inférieurs lorsque l'analyse est réalisée sur une longueur de 1 μm et que le nombre de cible amenée est faible (i.e. concentration et pression appliquée faibles). Ceci est dû au fait que lorsque la longueur de capteur analysée est plus faible, alors le nombre de sondes analysées l'est également. Un bruit important sur la vitesse d'hybridation est donc présent, ce qui provoque une erreur plus importante. C'est le cas par exemple lorsque la concentration en cible est de 1 nM et la pression appliquée de 5mbar. Si la valeur de R^2 est meilleure pour une pression de 50 mbar à une concentration de 1 nM, c'est en raison du fait qu'on atteint un régime où la vitesse d'hybridation est quasiment maximale pour ces conditions, c'est-à-dire que l'interaction est limitée par la vitesse de réaction. En revanche, pour une concentration de 10 nM et une pression de 5 mbar, c'est la convection qui devient limitante dans l'interaction (bien que le flux de cibles soit le même que dans le cas précédent), la vitesse d'hybridation n'est donc pas maximale et une erreur plus importante est de nouveau constatée.

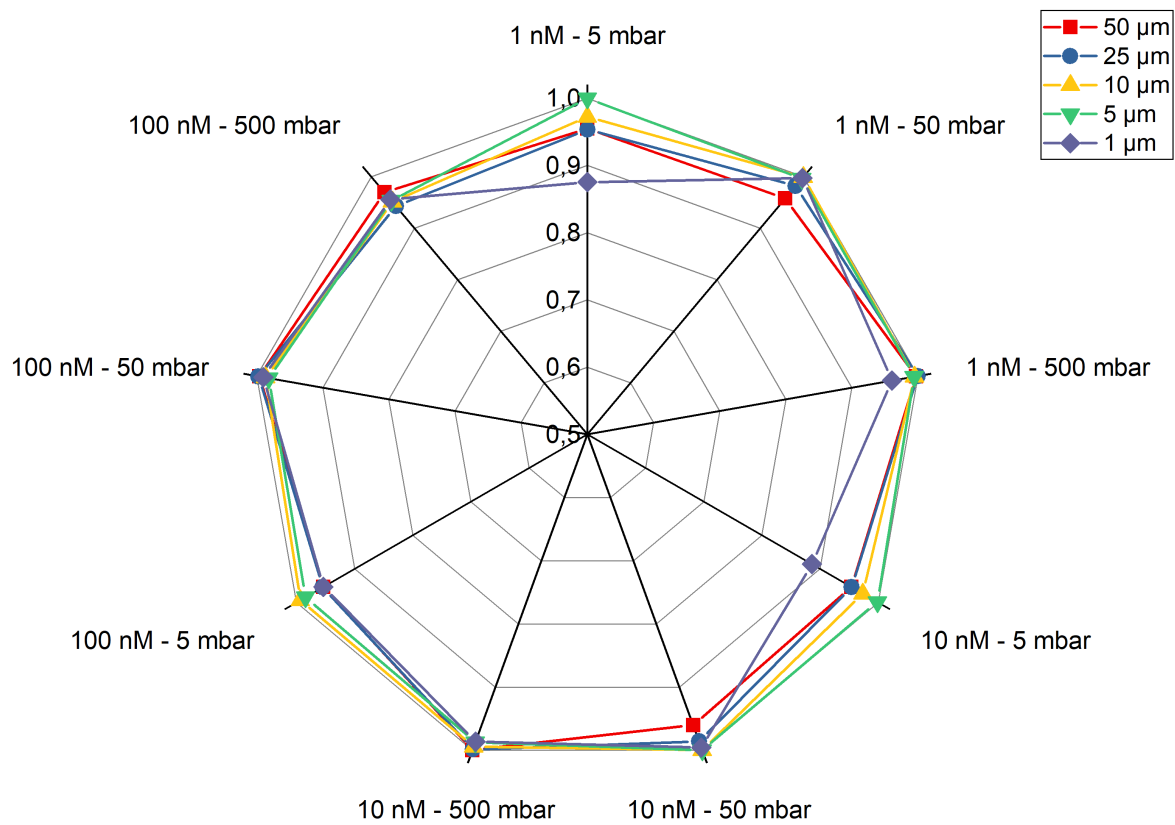


Figure 2-9 : variation du R^2 après comparaison du modèle de simulation par dynamique moléculaire avec le modèle de calcul par éléments finis COMSOL.

2.4. Influence des choix expérimentaux sur la capture de miARNs

Nous allons, au cours de cette partie, étudier la réponse du capteur en fonction des paramètres de l'expérience. Nous définissons, dans un premier temps, l'accroche de manière globale pour un capteur d'une longueur de 50 μm . L'influence de la différence de pression appliquée au niveau des nanocanaux sur le taux de capture sera alors décrite et mise en regard avec les volumes d'échantillon consommés. Dans une deuxième partie, nous verrons comment, dans nos conditions, la longueur de capteur analysée est une variable d'une importance capitale pour la lecture finale (cf. Figure 2-10).

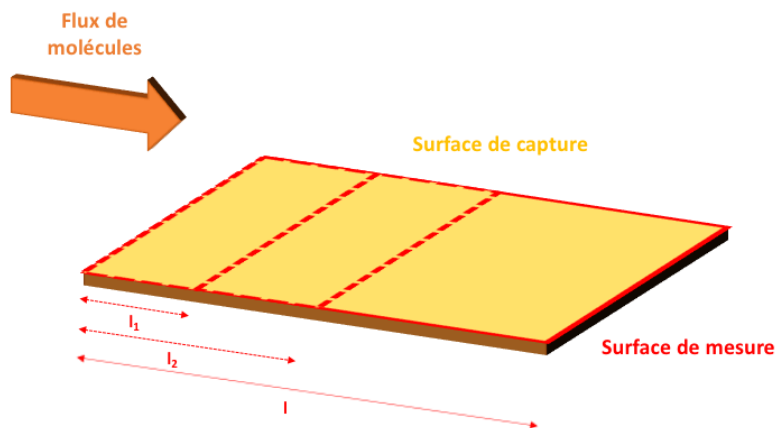


Figure 2-10 : principe de la mesure en fonction de la longueur de capteur analysée.

2.4.1. Cas d'une analyse globale du capteur : influence du flux sur la détection

Nous allons, dans un premier temps, nous intéresser au niveau d'hybridation en fonction de la différence de pression appliquée, c'est-à-dire du débit de solution dans le nanocanal. Pour ce faire, la concentration en cibles est fixée à 10 nM. Le capteur est considéré dans son intégralité, le niveau d'accroche étant défini sur toute sa longueur.

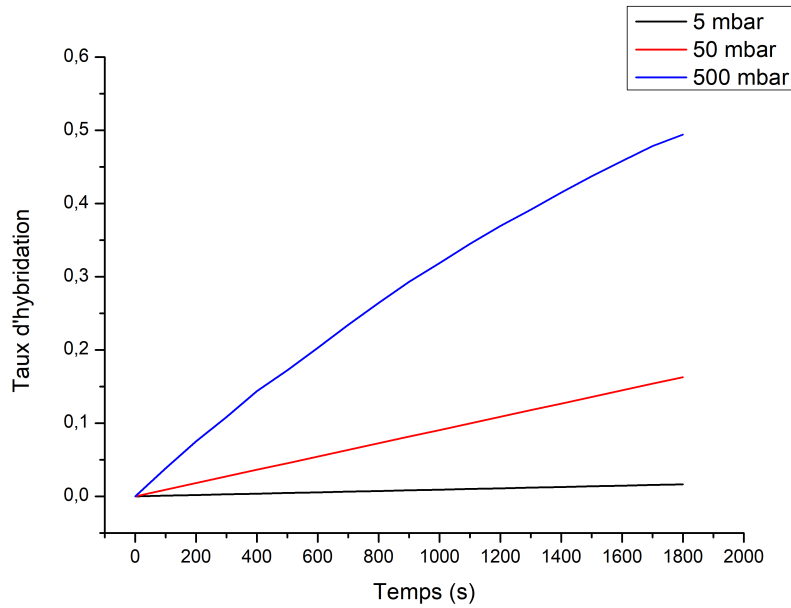


Figure 2-11 : cinétique d'hybridation pour une concentration en cibles de 10 nM à différentes pressions appliquées.

Les résultats des simulations obtenus démontrent une détection beaucoup plus rapide dans le cas d'une pression appliquée importante. Cependant, après 1800 s d'interaction à 50 mbar, le taux de capture de la surface intégrée est proche de 15%. Dans le cas d'une pression de 500 mbar, soit une convection 10 fois plus rapide, le taux de capture n'est alors que de 5% après 180 s (afin de comparer les données pour un nombre de cibles consommées constant). Ainsi, en appliquant une pression 10 fois plus importante, le taux de capture (pour un même nombre de cibles consommées) diminue d'un facteur 3 (cf. Figure 2-11). On peut donc aisément supposer qu'une partie des cibles n'entre pas en interaction dans le cas d'une différence de pression appliquée importante. Afin de quantifier cette perte de cibles, nous avons calculé le taux de capture, c'est-à-dire le rapport entre le nombre de cibles capturées et le nombre de cibles apportées au niveau du capteur en fonction de la durée de l'expérience (cf. Figure 2-12).

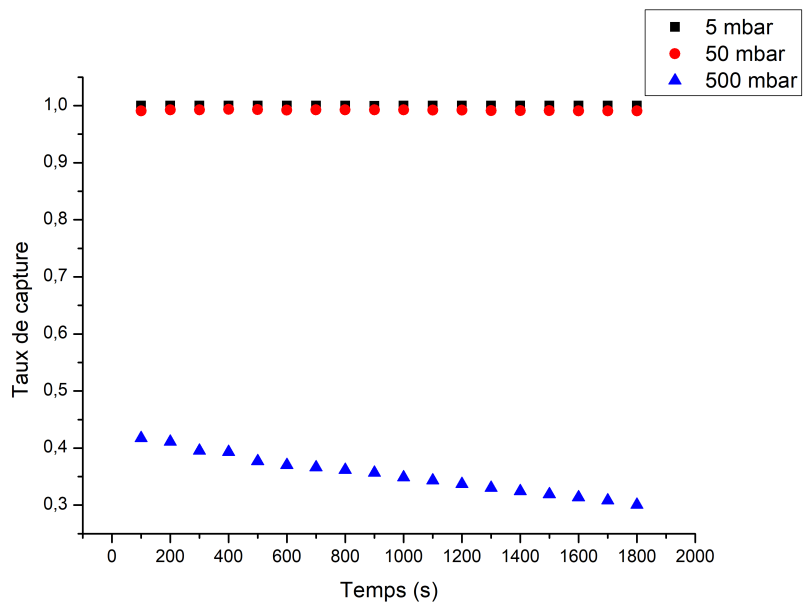


Figure 2-12 : taux de capture pour une concentration en cibles de 10 nM à différentes pressions appliquées.

Nous démontrons donc que dans le cas d’une pression de 500 mbar (soit une vitesse de solution supérieure à 1 mm/s) et après 30 min d’interaction, seulement 30% des cibles sont capturées alors que les 70% restantes sont perdues. Dans le cas des pressions appliquées plus faibles, au contraire, le taux de capture est très haut et proche de 100%.

Ce point peut devenir critique lorsque le matériel miARN est disponible en faible quantité. On peut noter, par exemple, qu’une interaction de trente minutes à une pression de 500 mbar consomme environ 1 μ L de solution dans notre cas. Ce chiffre est très grand en comparaison aux volumes habituellement manipulés en nanofluidique et il sera, de plus, compliqué d’augmenter davantage le débit au-dessus du capteur pour des raisons technologiques (possible désencapsulation due à une pression appliquée trop importante). Il est alors possible de définir un facteur de mérite correspondant au taux d’hybridation multiplié par le taux de capture. Plus ce facteur sera important, plus l’expérience sera optimisée pour obtenir un maximum de signal avec un minimum de matériel consommé.

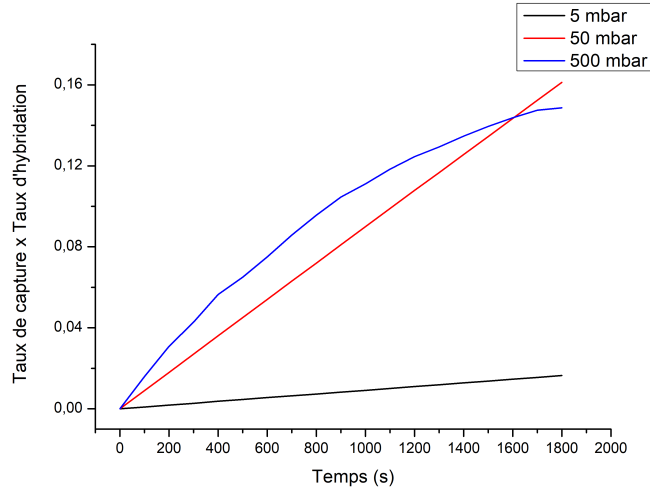


Figure 2-13 : évolution pendant le temps de capture du facteur de mérite correspondant au produit entre le taux d'hybridation des sondes par le taux de capture des cibles. Dans le cas d'une forte pression, une grande partie des sondes sont hybridées mais seulement une faible portion des cibles amenées au-dessus du capteur ont participé à l'interaction. Le phénomène inverse se produit dans le cas d'une pression très faible. Un optimum doit donc être trouvé en fonction de la sensibilité du moyen de transduction, du temps d'expérience souhaité et de la quantité de matériel à détecter disponible.

Compte tenu de la quantité de matériel consommée après un temps équivalent à 1600 s (cf. Figure 2-13), il devient plus pertinent d'appliquer une pression inférieure à 500 mbar. Ici, il est important de comprendre qu'il est possible d'optimiser la pression appliquée en fonction de la quantité de matériel disponible. Cependant, plus le débit de solution sera faible, plus le temps d'expérience pour atteindre un niveau d'hybridation détectable sera long. Il est, par conséquent, indispensable de définir une pression en fonction du temps d'expérience souhaité.

Dans le cas où la quantité de matériel n'est pas un facteur limitant, il sera alors possible de définir une pression maximale et optimale. Cette dernière est choisie de manière à obtenir une vitesse de convection égale à la vitesse de réaction du capteur, cela revient à avoir $Da_s = 1$. Nous aurons alors une vitesse optimale $v_{m \max}$:

$$v_{m \max} = \frac{k_{on}\rho_0 l}{h} \quad (19)$$

Dans notre cas la vitesse maximale permettant d'obtenir une vitesse de convection égale à la vitesse de réaction est de l'ordre de 900 $\mu\text{m/s}$ soit une différence de pression appliquée de 270 mbar.

On peut noter, cependant, qu'il est possible d'améliorer le taux de capture par unité de surface en réduisant la longueur du capteur analysée. En effet, dans le cas des nanocanaux, l'accroche a lieu, dans un premier temps, en début de capteur du fait de la déplétion de la solution en cibles après son passage au-dessus des premiers micromètres de la surface spécifique. Nous proposons donc, dans la suite du chapitre, d'adapter la longueur de capteur analysée afin d'optimiser à la fois le signal mesuré et le volume de solution consommé. Ceci n'est rendu possible qu'à partir du moment où le capteur autorise une bonne résolution spatiale, ce qui dans notre cas est dépendant de la détection en microscopie optique.

2.4.2. Cas d'un capteur résolu spatialement : effet de la longueur de capteur analysée sur le signal détecté

Dans cette partie, la concentration en cibles est fixée à 10 nM ; l'influence de la longueur de capteur analysée est étudiée pour les trois pressions appliquées.

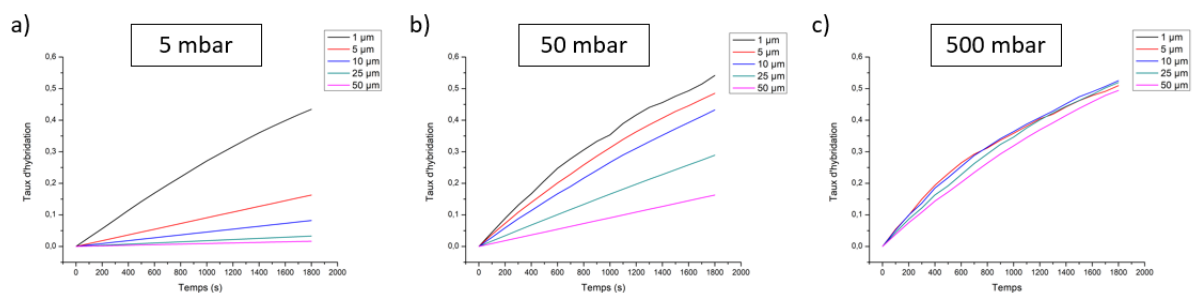


Figure 2-14 : comparaison de l'effet de la longueur de capteur analysée (de 1 μm à 50 μm) sur le taux d'hybridation pour des pressions appliquées de 5 mbar, 50 mbar et 500 mbar.

Ces résultats démontrent que la longueur analysée présente une influence très importante sur le niveau de détection et ce notamment pour les faibles pressions (cf. Figure 2-14). Ceci est dû au fait que plus la vitesse de solution est importante (i.e. la pression appliquée), plus le gradient de concentration au-dessus du capteur est faible. Dans le cas d'une pression appliquée de 500 mbar, la longueur de capteur présente peu d'influence sur le signal mesuré. Ceci est lié au fait que la concentration est homogène sur toute la longueur du capteur, ce qui engendre une hybridation

uniforme, quelle que soit la position spatiale sur le capteur. On se rapproche ici du cas pour lequel la convection est plus rapide que la réaction, ce qui entraîne une perte importante de matériel.

En revanche, dans le cas inverse où la pression appliquée est très faible (de l'ordre du mbar), le taux d'hybridation de la surface totale du capteur devient très faible lorsqu'on l'intègre dans son entièreté. Selon la sensibilité du capteur utilisé, il sera délicat de détecter l'accroche des miARNs. Ceci est dû au fait que les molécules sont en interaction seulement en début de capteur car un nombre insuffisant de cibles a été apporté pour interagir avec la suite du capteur. Cependant, si la résolution spatiale du transducteur le permet, il est possible de ne faire la mesure qu'en début de capteur, où l'interaction a lieu. Ainsi, en réalisant la mesure sur une longueur de 1 μm , il est possible d'atteindre les taux d'hybridation par unité de surface proches des taux mesurés sur l'ensemble du capteur à des vitesses de solutions plus élevées.

Il est important de souligner ici que l'analyse d'une longueur de capteur plus courte entraîne généralement une erreur type de mesure plus importante car le nombre total de sondes hybridées est plus faible. Il faudra donc adapter la différence de pression appliquée et la longueur de capteur analysée en fonction de la sensibilité du capteur afin de rendre possible la mesure de la capture des molécules cibles.

2.4.3. Influence de la concentration en cibles sur le niveau de détection

Nous étudierons dans cette partie l'influence de la concentration en molécules cibles sur le niveau de détection. Cette dernière sera inconnue dans le cas de la détection de miARNs. Il faudra donc pouvoir établir des conditions d'analyse optimales, et compatibles avec tout type d'échantillon.

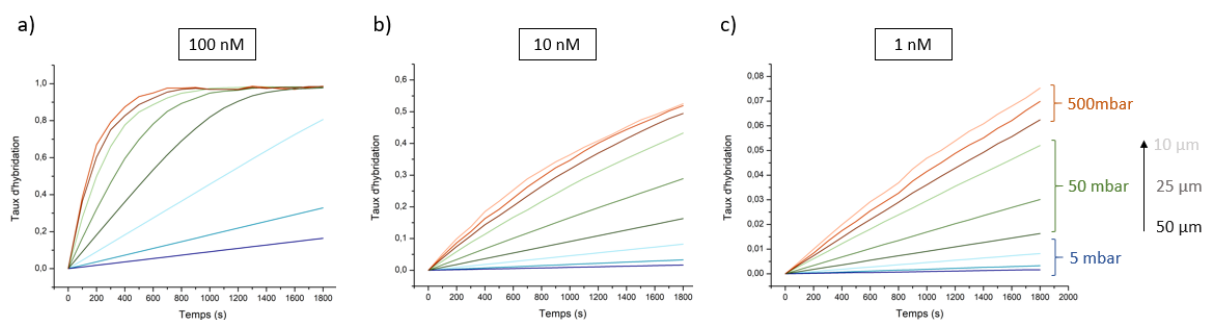


Figure 2-15 : variation du taux d'hybridation pour des longueurs de capteur mesurées de 10 μm (clair) à 50 μm (foncé) pour des pressions appliquées de 5 mbar (bleu), 50 mbar (vert) et 500 mbar (orange) et des concentrations en cibles de a) 100 nM, b) 10 nM et c) 1 nM.

Comme indiqué Figure 2-15, l'accumulation de cibles miARNs est d'autant plus rapide que la pression appliquée est forte et la longueur de capteur analysée peu importante, et ceci est valable quel que soit la concentration de cibles en solution. On remarque cependant que plus la concentration est forte, moins la longueur de capteur analysée devient critique car, comme explicité précédemment, le nombre de cibles amenées au-dessus du capteur sera très important et ainsi, la détection des miARNs sera limitée par le temps de réaction avec les sondes. C'est le cas lorsque 10 μm du capteur sont analysés pour une concentration en cibles de 100 nM et une différence de pression de 500 mbar. On observe en effet la superposition des courbes pour des longueurs de capteur de 25 μm et 10 μm . Il sera donc préférable, dans ce cas, d'analyser la longueur de capteur la plus importante possible afin d'augmenter le nombre de sondes analysées et réduire ainsi l'erreur type sur la mesure. Si, en revanche, la sensibilité du capteur est déjà suffisante sur une distance de 10 μm , alors il sera possible de réduire la pression appliquée afin d'économiser du matériel.

Notre intérêt s'est ensuite porté sur l'étude des vitesses de capture en fonction de différentes conditions ; ces dernières ont été calculées dans les premiers temps de la simulation lorsque l'accroche des cibles est linéaire (cf. Figure 2-16).

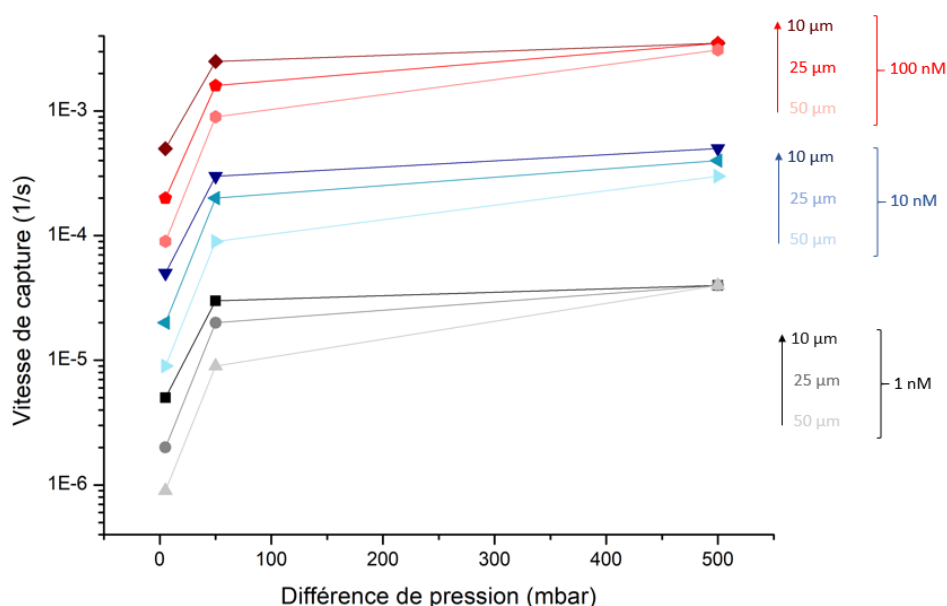


Figure 2-16 : variation de la vitesse d'hybridation en fonction de la pression appliquée et de la longueur de capteur analysée.

L'analyse de ces données démontre que la vitesse de capture sature rapidement avec une augmentation de la différence de pression appliquée (cf. Figure 2-16). Ce phénomène est d'autant plus fort que la longueur de capteur analysée est petite. On ne remarque cependant aucune optimisation particulière dépendante de la concentration en cibles dans la solution.

De manière générale, il est donc possible de définir quelques règles pour que la détection de miARNs couplée à un système nanofluidique soit optimale. Selon nos résultats, les cibles s'accumulent dans un premier temps en début de capteur. Il sera donc préférable de réduire la longueur de capteur analysée plutôt que d'augmenter la pression appliquée, et ce sur trois ordres de grandeur en termes de concentration en molécules cibles. Ce fait est clairement démontré lorsqu'on mesure les vitesses de capture en fonction de la pression et de la longueur de capteur étudiée. Dans ce cas précis, plus la longueur de capteur étudiée sera courte, plus la pression pour laquelle nous obtenons un taux de capture maximal sera faible. Ainsi pour une concentration en cibles de 1 nM, l'augmentation de la pression appliquée d'un facteur 10 (de 50 mbar à 500 mbar) permet d'augmenter la vitesse d'accroche de 30%, alors que réduire la longueur de mesure de seulement un facteur 5 (de 50 μm à 10 μm) permet d'augmenter la vitesse d'accumulation de 230% environ.

Ainsi, en réduisant au maximum la longueur de capteur analysée tout en gardant une sensibilité suffisante (c'est-à-dire une longueur analysée suffisamment importante pour permettre la mesure d'un signal sortant du bruit de fond de la mesure), nous pouvons optimiser le taux de capture (et ce, indépendamment de la concentration en cibles) en fixant Da_s à 1 pour la longueur de capteur intégrée. Cependant plus la concentration en cibles est faible, plus la résolution spatiale du transducteur devra être importante pour que la vitesse d'hybridation soit maximale. Afin de permettre une versatilité dans la longueur de capteur analysée, il sera préférable (si le moyen de transduction le permet) de privilégier une zone de détection suffisamment grande par rapport à la résolution spatiale de la détection. Pour des technologies basées sur de la fluorescence ou de la SPR, par exemple, il faudra donc une surface suffisamment longue. Dans le cas de résonateur type MEMS, il faudra multiplier le nombre de capteur dans le nanocanal car ces derniers ne permettent qu'une mesure intégrée de la capture sur leur surface.

Conclusion du chapitre 2

Dans ce chapitre, nous avons présenté le système nanofluidique utilisé pour la capture de miARNs, sa microfabrication, ainsi que le modèle biologique associé qui consiste en des sondes de type ADN complémentaires à la séquence miARN à détecter. La force de la nanofluidique qui permet d'accéder à des taux de capture très importants par comparaison avec une approche microfluidique plus conventionnelle a, elle aussi, été abordée. De plus, notre approche permet de révéler des propriétés intéressantes telles que l'hybridation non-uniforme du capteur et l'apparition d'un gradient en concentration de cibles.

A partir de ces considérations, nous avons développé un modèle de simulation en une dimension basé sur une approche de dynamique moléculaire. Ce modèle a de plus été confronté à une approche de calcul par éléments finis sur COMSOL déjà utilisée et validée dans de précédents travaux. Les prédictions entre les deux modèles s'avèrent très proches, bien que des limites à fortes pressions appliquées aient été entrevues.

Nous avons finalement utilisé le modèle 1D en dynamique moléculaire afin de prédire l'accroche des miARNs sur la surface, et donc l'approche la plus pertinente à mettre en place pour permettre la détection la plus rapide de la présence ou non de la molécule. On comprend donc que pour pouvoir prendre tout son sens, une détection en nanofluidique doit être couplée à une résolution spatiale très importante en termes de détection afin de gagner en performance au niveau du temps de détection et du volume de solution consommé.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons les résultats obtenus sur la capture de miARN synthétiques. De plus, nous mettons en avant l'originalité de notre capteur qui permet la discrimination de deux séquences miARNs très proches en termes de stabilité thermodynamique. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal ACS sensors.

Références du chapitre 2

1. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* (2006). doi:10.1038/nature05058
2. Turner, S. W., Perez, A. M., Lopez, A. & Craighead, H. G. Monolithic nanofluid sieving structures for DNA manipulation. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanometer Struct. Process. Meas. Phenom.* **16**, 3835–3840 (1998).
3. Chu, W.-H., Chin, R., Huen, T. & Ferrari, M. Silicon membrane nanofilters from sacrificial oxide removal. *J. Microelectromechanical Syst.* **8**, 34–42 (1999).
4. Abgrall, P. & Nguyen, N. T. Nanofluidic Devices and Their Applications. *Anal. Chem.* **80**, 2326–2341 (2008).
5. Ranchon, H., Cacheux, J., Reig, B., Liot, O., Teerapanich, P., Leichlé, T., Joseph, P. & Bancaud, A. Accelerated Transport of Particles in Confined Channels with a High Roughness Amplitude. *Langmuir* **34**, 1394–1399 (2018).
6. Han, J. & Craighead, H. G. Separation of long DNA molecules in a microfabricated entropic trap array. *Science* **288**, 1026–1029 (2000).
7. Volkmuth, W. D. & Austin, R. H. DNA electrophoresis in microlithographic arrays. *Nature* **358**, 600–602 (1992).
8. Wang, Y.-C., Stevens, A. L. & Han, J. Million-fold preconcentration of proteins and peptides by nanofluidic filter. *Anal. Chem.* **77**, 4293–4299 (2005).
9. Bakajin, O. B., Duke, T. A. J., Chou, C. F., Chan, S. S., Austin, R. H. & Cox, E. C. Electrohydrodynamic Stretching of DNA in Confined Environments. *Phys. Rev. Lett.* **80**, 2737–2740 (1998).
10. Reto B. Schoch, †, Lih Feng Cheow, † and Jongyoon Han*, †. Electrical Detection of Fast Reaction Kinetics in Nanochannels with an Induced Flow. (2007). doi:10.1021/nl0724788
11. Leichlé, T. & Chou, C.-F. Biofunctionalized nanoslits for wash-free and spatially resolved real-time sensing with full target capture. *Biomicrofluidics* **9**, 034103 (2015).
12. Squires, T. M., Messinger, R. J. & Manalis, S. R. Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nat. Biotechnol.* **26**, 417–426 (2008).
13. Delamar, E., Bernard, A., Schmid, H., Bietsch, A., Michel, B. & Biebuyck, H. Microfluidic Networks for Chemical Patterning of Substrates: Design and Application to Bioassays. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 500–508 (1998).
14. Ziegler, J., Zimmermann, M., Hunziker, P. & Delamar, E. High-Performance Immunoassays Based on Through-Stencil Patterned Antibodies and Capillary Systems. *Anal. Chem.* **80**, 1763–1769 (2008).
15. Gervais, T. & Jensen, K. F. Mass transport and surface reactions in microfluidic systems. *Chem. Eng. Sci.* **61**, 1102–1121 (2006).
16. Sadeghi, A., Amini, Y., Saidi, M. H. & Chakraborty, S. Numerical modeling of surface reaction kinetics in electrokinetically actuated microfluidic devices. *Anal. Chim. Acta* **838**, 64–75 (2014).
17. Teerapanich, P. *Fluorescence-based nanofluidic biosensor platform for real-time measurement of protein binding kinetics*. (Toulouse 3, 2015). at <<http://www.theses.fr/2015TOU30239>>
18. Steel, A. B., Levicky, R. L., Herne, T. M. & Tarlov, M. J. Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophys. J.* **79**, 975–981 (2000).
19. Wong, E. L. S., Chow, E. & Gooding, J. J. DNA Recognition Interfaces: The Influence of Interfacial Design on the Efficiency and Kinetics of Hybridization. *Langmuir* **21**, 6957–6965 (2005).

20. Häkkinen, H. The gold-sulfur interface at the nanoscale. *Nat. Chem.* **4**, 443–455 (2012).
21. ATDBio - Oligo synthesis experts - high quality modified oligos and fluorescent probes. at <<https://www.atdbio.com/>>
22. Choi, K. M. & Rogers, J. A. A Photocurable Poly(dimethylsiloxane) Chemistry Designed for Soft Lithographic Molding and Printing in the Nanometer Regime. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4060–4061 (2003).
23. Graugnard, E., Cox, A., Lee, J., Jorcyk, C., Yurke, B. & Hughes, W. L. Kinetics of DNA and RNA Hybridization in Serum and Serum-SDS. *IEEE Trans. Nanotechnol.* **9**, 603–609 (2010).
24. Lehr, H.-P., Reimann, M., Brandenburg, A., Sulz, G. & Klapproth, H. Real-Time Detection of Nucleic Acid Interactions by Total Internal Reflection Fluorescence. *Anal. Chem.* **75**, 2414–2420 (2003).
25. Vester, B. & Wengel, J. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry (Mosc.)* **43**, 13233–13241 (2004).
26. Vijayendran, R. A., Ligler, F. S. & Leckband, D. E. A Computational Reaction–Diffusion Model for the Analysis of Transport-Limited Kinetics. *Anal. Chem.* **71**, 5405–5412 (1999).
27. Wang, J.-Y. & Drlica, K. Modeling hybridization kinetics. *Math. Biosci.* **183**, 37–47 (2003).
28. Zimmermann, M., Delamarche, E., Wolf, M. & Hunziker, P. Modeling and optimization of high-sensitivity, low-volume microfluidic-based surface immunoassays. *Biomed. Microdevices* **7**, 99–110 (2005).
29. *Engineering Fluid Mechanics*. (Bookboon).
30. Teerapanich, P., Pugnère, M., Henriquet, C., Lin, Y.-L., Chou, C.-F. & Leichlé, T. Nanofluidic Fluorescence Microscopy (NFM) for real-time monitoring of protein binding kinetics and affinity studies. *Biosens. Bioelectron.* **88**, 25–33 (2017).

Chapitre 3 : mise en place de la plateforme nanofluidique couplée à une détection en fluorescence : analyse du profil d'hybridation et étude de sélectivité sur des miARNs exogènes

Durant ce chapitre, nous présenterons des résultats expérimentaux de détection de miARNs synthétiques obtenus à l'aide de notre plateforme : cette étude, présentée sous la forme d'un article publié dans le journal ACS sensors en février 2018, met en avant l'originalité du système qui permet une accroche non homogène des miARNs sur la surface. Cette particularité permet de déterminer en une seule étape l'affinité du miARN capturé avec la séquence sonde via l'étude du profil spatial d'hybridation sur la surface. Nous montrerons que la grande spécificité de l'approche choisie permet la discrimination rapide (moins de 10 minutes) de SND (différence d'un nucléotide, en anglais single nucleotide difference) en une seule étape, c'est-à-dire en absence de lavage.

3.1. Commentaires préliminaires

Comme décrit dans le chapitre 2, le confinement des molécules de miARNs permet d'augmenter considérablement leur probabilité d'accroche. De plus, le bruit de fond dû aux molécules cibles en solution au-dessus de la surface d'accroche est drastiquement réduit du fait de la réduction des échelles. Nous mesurons alors une accumulation des cibles marquées en fluorescence en début de capteur en temps réel (cf. Figure 3-1) dans le cas d'une pression appliquée suffisamment faible pour se trouver dans des conditions où la capture est limitée par la convection (c'est-à-dire la vitesse de la solution cible).

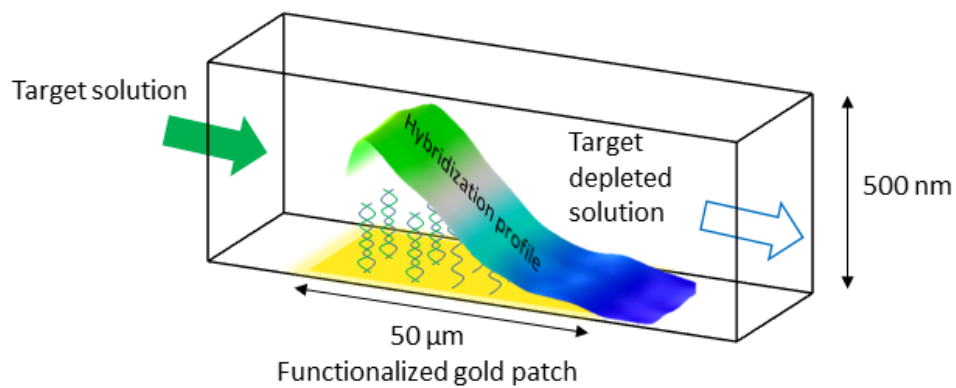


Figure 3-1 : principe de l'accroche de séquences miARNs dans un nanocanal.

Une analyse classique de l'accroche lors de l'étape d'association ne permet pas une différenciation claire de deux séquences très proches énergétiquement. De plus, des variations dans les cinétiques observées dans le cas d'échantillons inconnus peuvent être dues autant à une variation en concentration qu'à des différences de bases dans la séquence cible. Comment dans ce cas rendre le capteur spécifique ? Une approche consiste à établir une étape de rinçage pour mesurer la dissociation des molécules en interaction. Cette vitesse de dissociation n'est alors plus dépendante de la concentration en cible et permet de mesurer efficacement l'affinité du duplex alors formé.

Nous proposons dans ces travaux de mesurer le profil spatial formé lors de l'accroche des miARNs et montrons en quoi cette analyse permet une détermination efficace de l'affinité des molécules cibles avec les sondes greffées en surface.

3.2. Spatial analysis of nanofluidic-embedded biosensors for wash-free single-nucleotide difference discrimination

Jean Cacheux^{1,2}, Marie Brut¹, Aurélien Bancaud¹, Pierre Cordelier^{2}, Thierry Leïchlé^{1*}*

¹ LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France

² Université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées, Université Toulouse III Paul Sabatier, INSERM, CRCT, Toulouse, France

KEYWORDS: single-nucleotide difference; miRNA; nanofluidics; biosensing; fluorescence; depletion; hybridization

3.2.1. Abstract

In this work, we demonstrate that the analysis of spatially resolved nanofluidic-embedded biosensors permits the fast and direct discrimination of single-nucleotide difference (SND) within oligonucleotide sequences in a single step interaction. We design a sensor with a linear dimension much larger than the channel depth in order to ensure that the reaction over the whole sensor is limited by the convection rate. Thus, the targets are fully collected, inducing a nonuniform spatial hybridization profile. We also use the nanoscale height of the channel, which enables us to minimize the amount of labeled molecules flowing over the sensor and hence to reduce the fluorescence background, to carry out real-time hybridization detection by fluorescence microscopy. Taken together, these design rules allow us to show that the spatial hybridization profile depends on the duplex affinity, and we speculate that the on and off-rate constants can be inferred during target injection, which is not possible in local analysis where the dissociation step through rinsing must be conducted. We finally manage to discriminate a GT mismatch on a microRNA sequence by optimizing the interaction temperature and the probe design after a few minutes of interaction in a single step protocol. This work may be applied to any biosensing transduction scheme with spatial resolution, *e.g.* surface plasmon resonance imaging, integrated into nanofluidic channels for applications where high oligonucleotide sequence selectivity and short analysis times are required.

* Both authors contributed equally to this work.

3.2.2. Introduction

A single-nucleotide difference (SND) can originate from either a polymorphism or a mutation¹ of one base into an oligonucleotide sequence. The gold standard for the identification of such SND is Next Generation Sequencing,^{2,3} a costly and time-consuming approach that enables the systematic discovery of new SND. Sanger sequencing that targets specific sequences is another cheaper and faster solution to achieve SND analysis; however, it is not well-suited to short targets, *e.g.* miRNA, since cloning and amplification steps are carried out before sequencing.^{4,5} Following identification, target detection methods using an appropriate probe design, such as DNA microarrays,⁶ can be relevant. They mostly consist of measuring the ratio of hybridized duplexes while sweeping the temperature in order to detect a reduced melting temperature (the SND sequence is energetically less stable than the full-match target). Nevertheless, these methods always require a preamplification step via polymerase chain reaction (PCR) because of their low sensitivity.^{7,8} Alternative approaches include the use of specific rolling circle amplification,⁹ a multistep protocol based on enzymatic reaction and quantum dots labeling. Additional strategies are based on molecular beacons coupled to quantum dots¹⁰ or graphene sheets,¹¹ both using a specific revelation step and only revealing differences at equilibrium. Also, specific enzymes (T4 RNA ligase and DNAzyme) coupled to gel electrophoresis¹² offer good selectivity but involve multiple preparation steps. Finally, addressing the association and dissociation rates of the duplex formation may help discriminate single base differences^{13,14}. It was shown that the discrimination is clear only during the rinsing step because the dissociation rate is much faster when a mismatch is present in the duplex while no discrimination is possible when solely studying the association rate¹⁵.

Despite the fact that highly sophisticated detection methods have already been developed, none of them are compatible with direct detection and absolute quantification of oligonucleotides since they often require a cumbersome, multi-step protocol including target amplification. Moreover, such technologies rarely point out specificity at the base level (single nucleotide differences, SND) or the stability of the SND/probe duplex that strongly relies on the position and the nature of the bases involved in the mismatch^{16,17}.

Here, we present a novel nanofluidic-embedded biosensor functionalized with DNA probe sequences complementary to candidate oligonucleotides, specific enough to detect SND via affinity discrimination in a single-step real-time detection protocol. Our sensing platform relies on the analysis of the spatial hybridization profile along the sensor, derived through fluorescence imaging, that highly relies on the duplex affinity.

By optimizing the interaction temperature and the probe design, we manage to discriminate gold-standard, hard-to-detect mismatches on a 22 base single-stranded microRNA sequence within a few minutes of interaction, in the absence of preanalytical processing or a washing step. Taken together, the novel analysis method presented herein not only allows for the real-time identification of microRNA at the single-base level but can also be translated into further applications (DNA, proteins, etc.) with any transduction scheme (surface plasmon resonance, MEMS, etc.) as long as the biosensor is spatially resolved into nanochannels.

3.2.3. Results and discussion

3.2.3.1. Nanofluidic-embedded biosensing platform

The biosensor consists of a functionalized gold patch embedded in a nanochannel connected to two inlet/outlet microchannels. The nanoscale size of the fluidic channel results in several consequences unique to our platform. First of all, the time for molecules to diffuse over the channel height, which is within the millisecond range, is highly shortened in comparison with the travel time by convection over the gold patch. Hence, the sensor operates into a “full target collection” regime where upcoming molecules are consumed by the sensor and a depletion zone forms along the fluid flow (Figure 1a).¹⁸ Besides, because the sensor length (50 μm) is much larger than the channel height (500 nm), the biochemical reaction over the whole sensor surface is limited by the convection rate. As a result, the reaction rate is not uniform at the sensor surface, unlike what is usually observed in microfluidic devices. By defining a sensor with a high spatial resolution (< 1 μm), it is possible to locally study the molecular interaction and plot the nonuniform reaction rate along the sensor length.

The other consequence of using nanofluidics is that the number of labeled target molecules flowing above the sensor (concentration \times channel thickness) is reduced and the resulting fluorescent background is negligible. Thus, it is possible to observe the dynamic target/probe molecules reactions in real-time and without the need to wash the channel. Consequently, we can use our sensing platform with standard fluorescence microscopy to probe the sensor surface with high spatial resolution (determined by the camera pixel size) and study dynamic interactions with a simple and standard laboratory equipment.

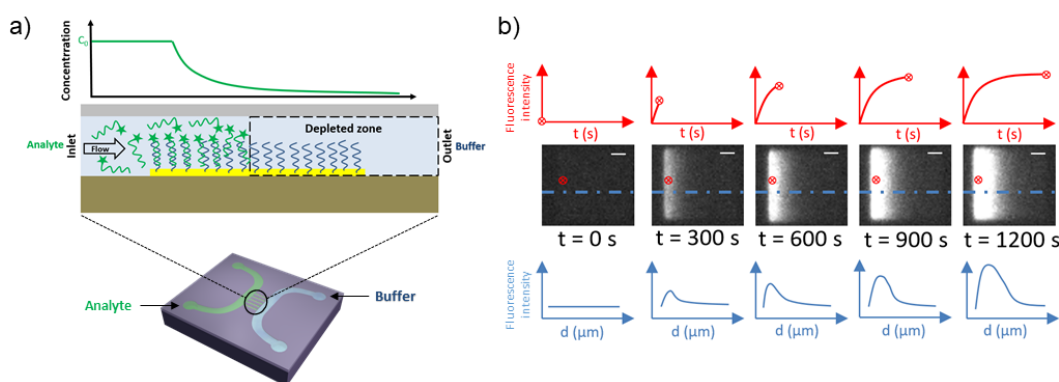


Figure 1: (a) Working principle of the nanofluidic biosensor: target molecules (green) injected in the nanochannel are trapped by the specific probes (blue) immobilized onto a gold patch. This results in a depleted zone, and the concentration of target molecules decreases along the fluid flow. (b) Time lap fluorescence images recorded onto the sensor (scale bar = 10 μm) and data analysis: classical kinetic study is obtained by plotting the fluorescence signal from a spatially resolved specific sensor location (one camera pixel) versus time (top, red), and profile analysis proposed in this work, obtained by plotting the fluorescence intensity along a line of pixels on the sensor versus the distance (bottom, blue).

Using fluorescence images of the biosensor, there are various ways to analyze the signal over the sensor and to derive information on molecular affinity (Figure 1b). The classical approach is based on the spatially localized data, where the fluorescence signal recorded as a function of time results in common kinetic sensorgrams and fitting methods are used to obtain association and dissociation constants. To this aim, the fluorescence signal, *i.e.* the reacting probe ratio, is measured with a continuous flow of labeled targets. Because the association rate depends on the target concentration, fluorescence intensity is taken at the forefront of the sensor where the target concentration above the sensor equates the solution concentration. Moreover, the signal is measured locally using only one (or a few) pixel in order to be in reaction-rate limited vs convection-limited interaction regime (Figure 1b, top). Then, the sensor is rinsed (by reversing the fluid flow in the nanochannel and allowing buffer solution to flow back on the sensor) to dissociate the probe/target duplexes. Association and dissociation constants are then derived from the kinetic sensorgram using a simple Langmuir fit of the data.

From the same data set, it is also possible to proceed to a global analysis of the sensor by plotting the fluorescence signal along the sensor length following a line of pixels at various times (Figure 1b, bottom). Because of the nonuniform reaction kinetics taking place along the sensor length due to the convection-limited regime and the target depletion layer, this analysis provides additional information on the probe/target interaction. Consequently, same association/dissociation constants can be obtained during a single association step without the need for time-consuming rinsing steps.

3.2.3.2. Hybridization profile analysis

When biomolecules with strong affinity interact in appropriate flow conditions, target molecules injected in the nanochannels are captured by the sensor until it saturates and the flowing solution is depleted. As a result, the fluorescence profile along the sensor length exhibits a sharp peak at the front and a rapid decay. Considering the same geometry and flow rate, weaker duplex affinities result in lower reaction rates. The direct consequence is that the amount of target molecules captured at the upcoming sensor surface is lower and a portion of injected targets can flow over the sensor and interact downstream. This leads to the leveling of the fluorescence profile where the signal peak at the front of the sensor is not as high and the decay, not as abrupt. In the extreme case, where the interaction is nonspecific, the reaction rate is low enough leading to a reaction rate uniform all over the sensor surface and so is the profile.

We have experimentally observed the aforementioned behavior and studied the dependence of the hybridization profile on the duplex affinity using microRNA targets. To this aim, we have selected two targets from the let-7 microRNA family that differ only from two nucleotides (hereinafter called “full-match” for the let-7c sequence and “DND”, i.e., double nucleotide difference, for the let-7f sequence) and one DNA probe sequence that includes locked nucleic acid (LNA) bases complementary to the full-match sequence (p-let-7c-6LNA sequence, see the Supporting Information Table S1). First, we studied the kinetics of interaction of each duplex in a classic configuration, where association and dissociation rates are obtained from spatial localized data using the procedure described in the previous section. Since similar affinities were measured at room temperature (see the supporting information Figure S1a), experiments were conducted at higher temperatures (the affinity of each duplex depends exponentially on the reciprocal of the temperature) to help better discriminate the two targets (Figure 2a and b). It is worth noting that the fluorescence signal could not be directly compared between experiments at different temperatures because the dye yield is temperature-dependent.^{19,20} Thus, data were normalized using the steady state fluorescence signal of the full-match sequence for each temperature (Figure 2a and b).

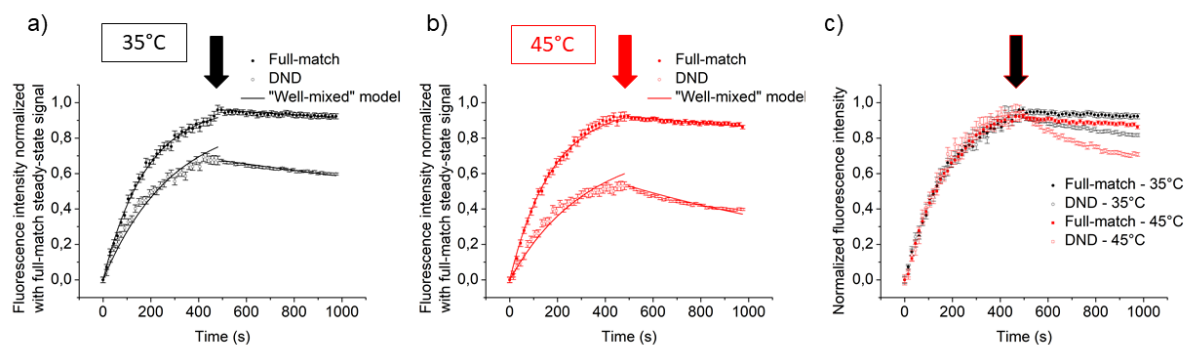


Figure 2: Kinetic sensorgrams of the full-match and DND targets at 35°C (a) and 45°C (b) after normalizing each set of data using the full-match steady-state value: during these experiments, a 100 nM analyte solution is injected in the nanochannel with a pressure of 10 mbar during 480 s, then the sensor is rinsed with pure buffer by reversing the pressure flow (at the time indicated by the arrow). (c) Same data as in (a) and (b) after normalizing each set of data with its steady state value.

Using the full-match target steady-state signal for data normalization, a difference between the plots for the two targets is clearly observed after target-probe interaction, even at 35°C (Figure 2a). As expected, better discrimination is obtained by increasing the temperature to 45°C (Figure 2b). However, experiments conducted at 55°C (see the Supplementary Information Figure S1b) show that the DND target is no longer detected (no hybridization occur on the sensor) while a significant fluorescence is still measurable with the full match target. Using the experimental sensorgrams, binding constants were extracted using a Langmuir fit,^{21,22} and then experimental Gibbs free energies were derived for each duplex. These experimental data are in very good agreement with the theoretical energies obtained with molecular dynamics simulations (see data in Table 1 and description of the theoretical data calculation in the Supporting Information).

An interesting point is that when the data normalization for full-match and DND is carried out using each steady state value (Figure 2c), no difference is observed during the association step between the signal from the full-match and from the DND targets whatever the operating temperature. Indeed, while the hybridized probe ratio is lower for the DND target, the dynamic behavior of the hybridization is similar. Nevertheless, a clear signal difference is measured during the dissociation step, even after normalization, because the DND unhook much faster than the full-match targets. Furthermore, the dissociation rate does not rely on sample concentration whereas the association rate does: this means that if the sample concentration is unknown, it is mandatory to carry out the dissociation step by rinsing the sensor to achieve proper target discrimination in the absence of reference.

target	interaction temperature (°C)	$\Delta G_{\text{Gibbs th}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{Gibbs-exp}}$ (kcal/mol)	error (%)
full-match (let-7c)	35	-12.49	-12.36	1.0
	45	-12.23	-12.18	0.4
DND (let-7f)	35	-11.39	-11.36	0.2
	45	-10.57	-10.59	0.2

Table 1: Experimental and theoretical Gibbs free energies of the two targets and the LNA probe at the working temperatures.

The alternative method to analyze data during the association step, as proposed in this work, is to plot the hybridization profile along the sensor instead of providing a local analysis vs time. Similar to kinetic analysis, the fluorescence response is first normalized using the steady state signal of the full-match target (Figure 3a and b). In addition, and because the flow velocity increases by approximately 20% due to the change in solution viscosity when shifting temperature, data are collected 360 and 300 s after injecting the sample for experiments performed at 35 and 45°C, respectively. This ensures an equivalent amount of molecules (~ 500 zeptomoles) injected into the sensor. As with the kinetic analysis, a clear signal difference between the two sequences is detectable at 35°C, because the duplex binding constant is weaker for the DND target. Consequently, the number of hybridized probes at equilibrium is lower and target molecules that do not interact with probes at the beginning of the sensor are carried out by the fluid flow and have the ability to do so downstream. This phenomenon may account for a lower response at the front of the sensor in case of the DND target while the measured fluorescence intensity is higher further down. The interesting feature of this analysis strategy is that when each profile is normalized with its own steady state value (Figure 3c), differences in the spatial profiles of the full-match and DND targets are still clear unlike what is observed on the association part of the sensorgrams (Figure 2c). A COMSOL simulation (fitting method in the Supporting Information) using the experimental affinity constants obtained from the sensorgram fits confirms the influence of the differences in affinity on the hybridization profile ($R^2 = 0.9903$).

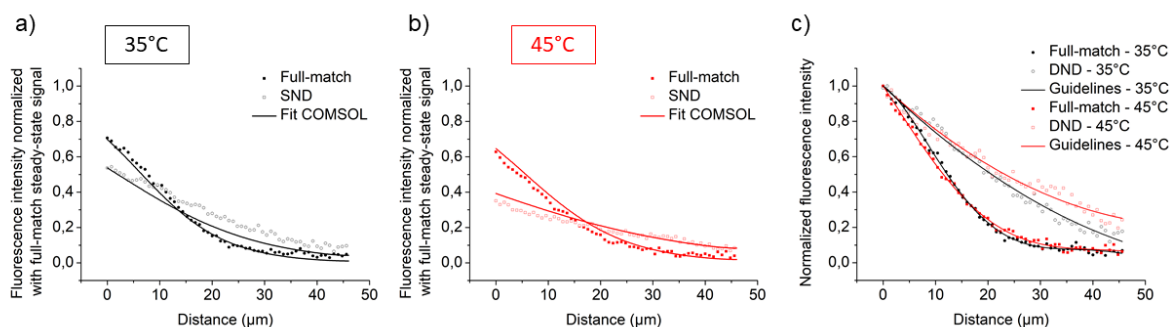


Figure 3: Hybridization profiles recorded during the association step (a) at 35°C after 360 s of interaction and (b) at 45°C after 300 s of interaction, all normalized using the full-match target steady state signal. (c) Same data as in (a) and (b) after normalizing each set of data with its steady state value.

3.2.4. Discrimination of single base difference within microRNA family members

To demonstrate the high selectivity of our nanofluidic-embedded biosensor platform coupled to the proposed spatial profile analysis, we have selected two microRNA targets very difficult to discriminate, let-7b and let-7c, belonging to the same microRNA family (let-7), in which sequences differ only by one nucleotide. The sixth adenine nucleotide (A) from the let-7c sequence is replaced by a guanine base (G) in the let-7b sequence leading to a guanine-thymine mispairing upon hybridization with the let-7c complementary probe (p-let-7c-3LNA), which is one of the most stable mismatches ($\Delta T_m \sim 1^\circ\text{C}$). To increase the probe affinity with the RNA targets and improve the selectivity of the probe,^{23,24} we have designed probes with added LNA nucleotides at the SND position and the two nearby bases (cf. Table S1 in the Supporting Information). Next, the hybridization temperature was optimized using melting curves, during which the ratio of hybridized probe is measured on the sensor at a constant target concentration with increasing temperature. Since a slight signal difference between the two target sequences was observed from 50 to 60°C (Figure S2, not seen with classic DNA probes), this temperature range was selected for the hybridization experiments. The resulting hybridization profiles for the full-match and SND sequences at both temperatures are shown in Figure 4: while discrimination is tenuous at 50°C, a difference between the profiles is clearly observed after a few minutes of interaction at 60°C, demonstrating that, following fine-tuning of the experimental conditions, the spatial analysis of the nanofluidic-embedded biosensor provides means to quickly and selectively distinguish SND in a single-step interaction.

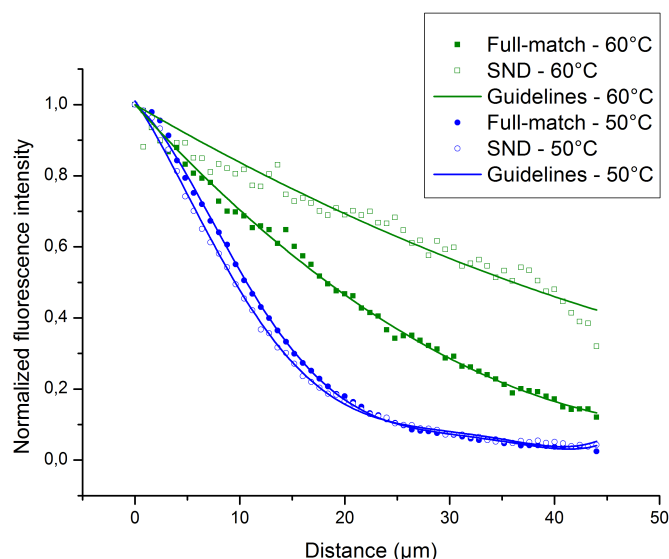


Figure 4: Hybridization profiles recorded after 1200 s of interaction at 50 and 60°C for the SND and the full-match targets (applied pressure: 5 mbar).

3.3. Conclusion

In this work, we present a novel microfluidic setting affording real-time detection of microRNA and selective enough to discriminate these tiny molecules at a single-base level. Moreover, this work describes for the first time a new analysis strategy for affinity biosensors operating in a convection-limited regime and full target collection with spatial resolution. Indeed, the hybridization profile measured at the sensor surface provides additional information compared to classically nonspatially resolved analysis due to the nonuniform hybridization rate along the sensor. Hence, kinetic data can possibly be derived during the association step only since it involves multiple binding and unbinding events along the fluid flow. This analysis stands out from classical kinetic approaches where full sensorgrams obtained not only through association but also dissociation require to rinse the sensor. Additionally, we have demonstrated that, by optimizing the operating temperature and the probe design, we could discriminate one of the most stable SNDs in a few minutes. Hence, this work opens doors to many applications where high-selectivity and short analysis times are requested. We suggest that it could be a suitable technique to detect DNA mutation or methylation, another landmark of (epi)genetic modification, which seems to modulate DNA duplex affinity²⁵. More generally, the presented analysis method can also be applied to any transduction scheme for spatially resolved biosensors integrated into nanofluidic channels.

3.4. Materials and methods

3.4.1. Materials and reagents

Oligonucleotides (targets and probes) sequences were synthesized by Eurogentec (Liège, Belgium) (cf. sequences in the Supporting Information Table S1). Buffer solution PBS 1× was purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA). Mercaptoethanol (MCE) was purchased from Sigma-Aldrich (USA).

3.4.2. Fabrication of bio-functionalized nanofluidic devices

The chip microfabrication process has been previously described.²⁶ The functionalization protocol used to graft the probe molecules onto gold patches embedded in the nanofluidic channels was carried out before chip sealing. Briefly, it consists in a 1 h incubation of thiolated DNA probes (p-let7-c-3LNA or p-let7-c-6LNA in Table S1) followed by a 1 h incubation of MCE after deionized water rinsing and N₂ drying.²⁷ Encapsulation of the fabricated micro- and nanochannels was carried out by means of a hard-PDMS coated cover glass activated with oxygen plasma at room temperature, as described previously.²⁸

3.4.3. Fluorescence interaction

After sensor functionalization and chip encapsulation, fluorescently labeled microRNA targets diluted at 100 nM in PBS 1× solution were introduced in the nanofluidic channels using pressure driven flow (MFCS, fluigent). Applied pressure during the experiments was 5 or 10 mbar. Binding of the fluorescent targets to the biosensor surface immobilized with probe molecules was monitored in real-time using an inverted fluorescence microscope (Olympus IX71) coupled to a light source (lumencor, SOLA 6-LCR-SB) and an EMCCD (iXon^{EM} + 885, Andor) with a 20× objective and a Cy3-dedicated filter set (41007a-Cy3, chroma). The exposure time was 200 ms, and the imaging period was 15 s or 30 s. Reverse buffer flow operation with PBS 1× was used to achieve full kinetic sensorgrams (association and dissociation phases). Temperature was controlled via the PE94 LinkPad temperature controller from Linkam (UK).

3.5. Associated content: supporting Information

3.5.1. Tables and figures

Type	Name	Sequence
SND probe (DNA)	p-let-7c-3LNA	5'-SH-(CH ₂) ₆ - AACCATACA CCTACTACCTCA-3'
DND probe (DNA)	p-let-7c-6LNA	5'-SH-(CH ₂) ₆ - AACCATACA AC CCTACTACCTCA-3'
Full-match (RNA)	Let-7c	5'-Cy3-GAAAUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU-3'
SND (RNA)	Let-7b	5'-Cy3-GAAAUGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU-3'
DND (RNA)	Let-7f	5'-Cy3-GAAAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU-3'

Table S1: Thiolated DNA probe and labeled RNA target sequences, locked nucleic acid (LNA) bases on the probe sequences are highlighted in bold and the changing nucleotides from the let7-c sequence to the let7-b and f sequences are highlighted in italic.

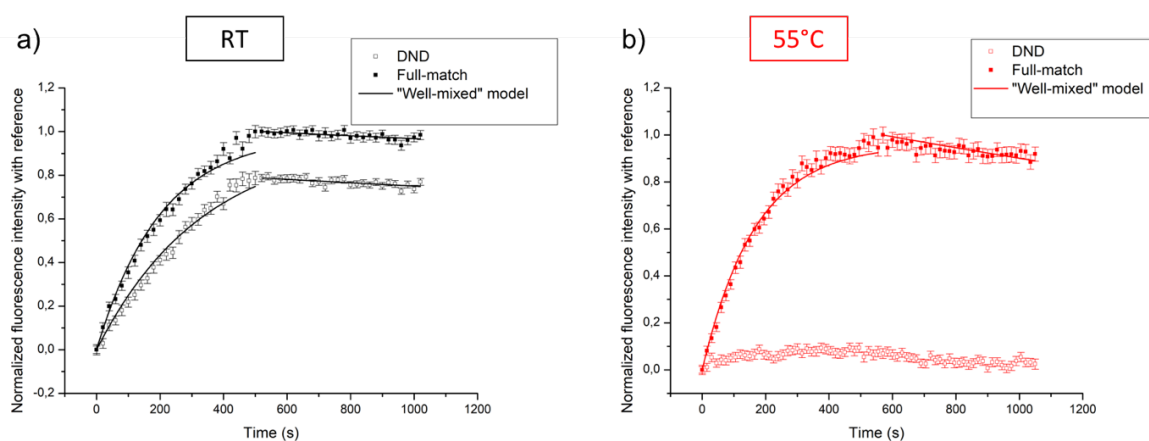


Figure S1: Kinetic sensorgrams of the full-match and DND targets at room temperature (a) and 55°C (b) after normalizing each set of data using the full-match steady-state value obtained for 100 nM analyte concentration at 10 mbar injection pressure.

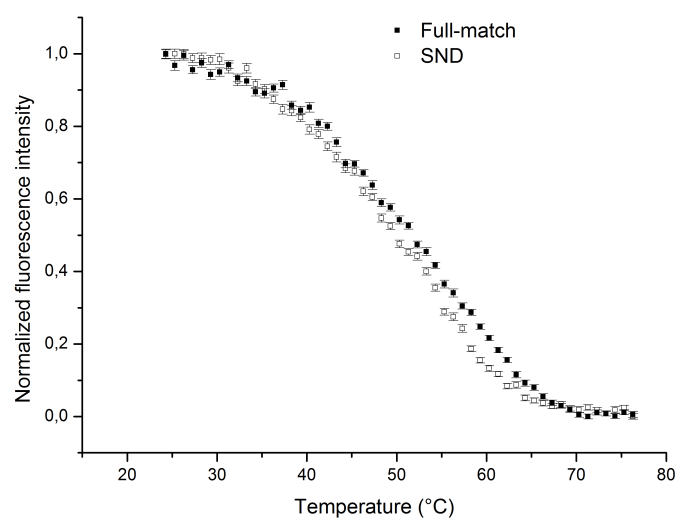


Figure S2: Melting curves measured on-chip of the full-match and the SND sequences. The fluorescence intensity was integrated on the entire sensor surface after signal saturation while bringing a constant target concentration

3.5.2. Profile fitting method

The simulation of the hybridized probe profile along the sensor was achieved with COMSOL multiphysics 4.3. Three main physical processes were simulated: (i) the convection and (ii) the diffusion of the target molecules above the sensor, and (iii) the surface reaction described with a simple first-order kinetic model. Association and dissociation binding constants were extracted from the experimental kinetic sensorgrams with a Langmuir model fit. Since the fluid viscosity and the molecular diffusion are temperature dependent^{29,30}, the average flow velocity was computed after calculating the fluid viscosity. Because probe density is not precisely known, computation was carried out for different probe density values and the experimental probe density was determined from the best fit between the experimental profile curve and the simulated one by means of the coefficient of determination (R-squared) calculated with MATLAB. Fitting all experiments (realized with the same biosensor, which means the same probe density) at the same time resulted in a probe density on the gold patch of 5.4×10^{12} molecules/cm², as expected³¹.

3.5.3. Theoretical Gibbs free energy calculation method

We used fully atomistic molecular dynamics simulation in explicit water and ions to evaluate the theoretical binding free energy of the duplexes. The starting atomistic models were constructed in a A-form configuration using the Nucleic Acids Builder tool available as part of the Amber package³².

Both full match and SND sequences were generated, run and analyzed.

Calculations were performed using the ff14SB force field³³. Explicit solvent was added in a cubic periodic box using the TIP3P water model³⁴ for a total of 5900 solvent molecules. Sodium ions were added to neutralize the charge (46 Na⁺) with the Joung/Cheatham ion parameters³⁵, as well as additional 14 Na⁺ and Cl⁻ ions to reach a total excess ion concentration of ~137 mM. To relax water and ions position, a first stage of 10000 steps of minimization was run, keeping the duplexes fixed with 25 kcal/mol restraints. The system was then heated up to 308 and 318K, maintaining 25 kcal/mol restraints on the duplexes, at constant volume, using Langevin thermostat and SHAKE algorithm to constrain bonds involving hydrogen. A subsequent 100 ps equilibration was run at constant temperature and pressure while relaxing the constraints. During the entire simulation, in order to mimic LNA stabilizing effect, 25 kcal/mol restraints were locally maintained on concerned ribose angles to lock them in a 3'-endo conformation. A final production stage was run for 10 ns while extracting the trajectories every 1 ps. A post processing analysis based on the Poisson–Boltzmann and surface area continuum solvation method (MM/PBSA) implemented in AMBER³⁵ was then applied to the system to calculate the binding free energy for the association of the DNA/RNA strands.

Conclusion du chapitre 3

Nous souhaitons à travers cet article, mettre en avant l'avantage des nanocanaux dans la discrimination de séquences miARNs avec des affinités très proches.

Nous avons donc mis en évidence dans ce chapitre la grande spécificité de notre plateforme nanofluidique couplée à une détection en fluorescence. Nous démontrons, en effet, la possibilité de discriminer rapidement deux séquences qui ne diffèrent que d'un seul nucléotide en une seule étape d'interaction. Ceci est rendu possible par les propriétés uniques de notre dispositif qui permet, à la fois, un taux de capture de cible important (et donc une hybridation non-uniforme de la surface fonctionnalisée) et un bruit de fond très faible qui autorise une détection en temps réel sans étape de lavage.

Nous avons pu voir que l'intérêt d'une détection nanofluidique est réel si cette dernière est couplée à un mode de transduction où la résolution spatiale est bonne. Pour étudier l'accroche des miARNs dans une configuration nanofluidique, il nous faut donc utiliser un capteur qui pourra bénéficier d'une bonne résolution, typiquement de l'ordre du micromètre. On peut cependant noter que cette étude se place dans le cas idéal de cibles marquées dans des concentrations importantes.

Afin d'orienter la plateforme vers la détection d'échantillons biologiques, une approche de détection par SPR aurait pu être choisie, cependant, sa mise en place expérimentale nécessite un actionneur Laser de puissance couplé à un spectromètre, matériels chers et consommateurs d'énergie. On peut noter, de plus, que ces éléments ne sont pas toujours présents dans les laboratoires de recherche.

De plus, comme décrit dans le premier chapitre, une détection par mesure électrique ou électrochimique nécessite souvent des étapes de révélation par réaction catalytique, ce qui empêche une détection en temps réel. Aussi, ces méthodes de détection nécessitent des niveaux de pureté d'échantillon importants, ce qui est en contradiction avec les objectifs du projet.

Enfin, l'utilisation d'un transducteur mécanique n'est pas compatible avec l'utilisation de nanocanaux. En effet, la réalisation de résonateurs à ces échelles ($< 1 \mu\text{m}$) pour la biodétection reste un challenge inachevé. Aujourd'hui, peu voire aucune méthode de micro fabrication ne permet l'intégration de tel dispositif de détection à cette échelle avec une robustesse satisfaisante à notre connaissance.

Notre choix, face à cette contrainte, s'est donc tourné vers une détection en fluorescence. On peut, en effet, noter qu'une détection avec, par exemple, un objectif 10x couplé à une caméra CCD, typiquement de 1004x1002 pixels, permet d'atteindre des tailles de pixel inférieures au micromètre

carré. De plus, la mise en place expérimentale, déjà décrite dans le chapitre 2, est très simple et réalisable dans la majorité des laboratoires de biologie.

Naturellement, la détection par fluorescence, contrairement aux autres modes de transduction décrits, nécessite le marquage des cibles, et cela peut engendrer alors des contraintes fortes sur la limite de détection du système. Nous abordons ce point dans le chapitre 4.

Références du chapitre 3

1. Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C. & Ferlini, C. Defining ‘mutation’ and ‘polymorphism’ in the era of personal genomics. *BMC Med. Genomics* **8**, (2015).
2. Nielsen, R., Paul, J. S., Albrechtsen, A. & Song, Y. S. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 443–451 (2011).
3. Li, R., Li, Y., Fang, X., Yang, H., Wang, J., Kristiansen, K. & Wang, J. SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing. *Genome Res.* **19**, 1124–1132 (2009).
4. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–5467 (1977).
5. Mullikin, J. C., Hunt, S. E., Cole, C. G., Mortimore, B. J., Rice, C. M., Burton, J., Matthews, L. H., Pavitt, R., Plumb, R. W., Sims, S. K., Ainscough, R. M., Attwood, J., Bailey, J. M., Barlow, K., Bruskiwich, R. M., Butcher, P. N., Carter, N. P., Chen, Y., Clee, C. M., Coggill, P. C., Davies, J., Davies, R. M., Dawson, E., Francis, M. D., Joy, A. A., Lambie, R. G., Langford, C. F., Macarthy, J., Mall, V., Moreland, A., Overton-Larty, E. K., Ross, M. T., Smith, L. C., Steward, C. A., Sulston, J. E., Tinsley, E. J., Turney, K. J., Willey, D. L., Wilson, G. D., McMurray, A. A., Dunham, I., Rogers, J. & Bentley, D. R. An SNP map of human chromosome 22. *Nature* **407**, 516–520 (2000).
6. Urakawa, H., El Fantroussi, S., Smidt, H., Smoot, J. C., Tribou, E. H., Kelly, J. J., Noble, P. A. & Stahl, D. A. Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2848–2856 (2003).
7. Upadhyaya, A., Smith, R. A., Chacon-Cortes, D., Revêchon, G., Bellis, C., Lea, R. A., Haupt, L. M., Chambers, S. K., Youl, P. H. & Griffiths, L. R. Association of the microRNA-Single Nucleotide Polymorphism rs2910164 in miR146a with sporadic breast cancer susceptibility: A case control study. *Gene* **576**, 256–260 (2016).
8. Qi, J.-H., Wang, J., Chen, J., Shen, F., Huang, J.-T., Sen, S., Zhou, X. & Liu, S.-M. High-resolution melting analysis reveals genetic polymorphisms in MicroRNAs confer hepatocellular carcinoma risk in Chinese patients. *BMC Cancer* **14**, (2014).
9. Zeng, Y., Zhu, G., Yang, X., Cao, J., Jing, Z. & Zhang, C. A quantum dot-based microRNA nanosensor for point mutation assays. *Chem. Commun.* **50**, 7160–7162 (2014).
10. Guo, Q., Bai, Z., Liu, Y. & Sun, Q. A molecular beacon microarray based on a quantum dot label for detecting single nucleotide polymorphisms. *Biosens. Bioelectron.* **77**, 107–110 (2016).
11. Khoshfetrat, S. M. & A. Mehrgardi, M. Dual amplification of single nucleotide polymorphism detection using graphene oxide and nanoporous gold electrode platform. *Analyst* **139**, 5192–5199 (2014).
12. Park, K., Choi, B.-R., Kim, Y. S., Shin, S., Hah, S. S., Jung, W., Oh, S. & Kim, D.-E. Detection of single-base mutation in RNA using T4 RNA ligase-based nick-joining or DNAzyme-based nick-generation. *Anal. Biochem.* **414**, 303–305 (2011).
13. Ryeon Yoon, H., Min Lee, J., Jung, J., Lee, C.-S., Hyun Chung, B. & Jung, Y. Highly improved specificity for hybridization-based microRNA detection by controlled surface dissociation. *Analyst* **139**, 259–265 (2014).
14. Peterson, A. W., Wolf, L. K. & Georgiadis, R. M. Hybridization of Mismatched or Partially Matched DNA at Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14601–14607 (2002).

15. Qavi, A. J., Mysz, T. M. & Bailey, R. C. Isothermal Discrimination of Single-Nucleotide Polymorphisms via Real-Time Kinetic Desorption and Label-Free Detection of DNA Using Silicon Photonic Microring Resonator Arrays. *Anal. Chem.* **83**, 6827–6833 (2011).
16. Naiser, T., Kayser, J., Mai, T., Michel, W. & Ott, A. Position dependent mismatch discrimination on DNA microarrays – experiments and model. *BMC Bioinformatics* **9**, 509 (2008).
17. Pan, S., Sun, X. & Lee, J. K. Stability of complementary and mismatched DNA duplexes: Comparison and contrast in gas versus solution phases. *Int. J. Mass Spectrom.* **253**, 238–248 (2006).
18. Squires, T. M., Messinger, R. J. & Manalis, S. R. Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nat. Biotechnol.* **26**, 417–426 (2008).
19. Sun, H., Xiang, J., Zhang, X., Chen, H., Shi, Y., Yu, L., Yang, Q., Li, Q., Guan, A. & Tang, Y. A colorimetric temperature sensor of a cyanine dye supramolecule and its application in reversible switch. *Appl. Phys. Lett.* **105**, 071914 (2014).
20. Sanborn, M. E., Connolly, B. K., Gurunathan, K. & Levitus, M. Fluorescence Properties and Photophysics of the Sulfoindocyanine Cy3 Linked Covalently to DNA. *J. Phys. Chem. B* **111**, 11064–11074 (2007).
21. Vijayendran, R. A., Ligler, F. S. & Leckband, D. E. A Computational Reaction–Diffusion Model for the Analysis of Transport-Limited Kinetics. *Anal. Chem.* **71**, 5405–5412 (1999).
22. Wang, J.-Y. & Drlica, K. Modeling hybridization kinetics. *Math. Biosci.* **183**, 37–47 (2003).
23. You, Y., Moreira, B. G., Behlke, M. A. & Owczarzy, R. Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res.* **34**, e60–e60 (2006).
24. Castoldi, M., Schmidt, S., Benes, V., Noerholm, M., Kulozik, A. E., Hentze, M. W. & Muckenthaler, M. U. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* **12**, 913–920 (2006).
25. Karberg, M., Leavitt, R., Cabaya, D. A., Eden, M. V. & Jia, X. Y. Abstract #5147: A method for quantifying DNA methylation percentage without chemical modification. *Cancer Res.* **69**, 5147–5147 (2009).
26. Teerapanich, P., Pugnère, M., Henriquet, C., Lin, Y.-L., Chou, C.-F. & Leichlé, T. Nanofluidic Fluorescence Microscopy (NFM) for real-time monitoring of protein binding kinetics and affinity studies. *Biosens. Bioelectron.* **88**, 25–33 (2017).
27. Wong, E. L. S., Chow, E. & Gooding, J. J. DNA Recognition Interfaces: The Influence of Interfacial Design on the Efficiency and Kinetics of Hybridization. *Langmuir* **21**, 6957–6965 (2005).
28. Leichlé, T., Lin, Y.-L., Chiang, P.-C., Hu, S.-M., Liao, K.-T. & Chou, C.-F. Biosensor-compatible encapsulation for pre-functionalized nanofluidic channels using asymmetric plasma treatment. *Sens. Actuators B Chem.* **161**, 805–810 (2012).
29. *Engineering Fluid Mechanics*. (Bookboon).
30. Avramov, I. Relationship between diffusion, self-diffusion and viscosity. *J. Non-Cryst. Solids* **355**, 745–747 (2009).
31. Steel, A. B., Levicky, R. L., Herne, T. M. & Tarlov, M. J. Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophys. J.* **79**, 975–981 (2000).
32. The Amber Molecular Dynamics Package. at <<http://ambermd.org/>>
33. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E. & Simmerling, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713 (2015).

34. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935 (1983).
35. Joung, I. S. & Cheatham, T. E. Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B* **112**, 9020–9041 (2008).

Chapitre 4 : vers une détection de miARNs endogènes dans des échantillons d'origine biologique

Dans ce dernier chapitre nous démontrerons l'intérêt du dispositif pour des applications au plus près des problématiques biologiques dans le cadre de la prise en charge du cancer du pancréas. Dans un premier temps, les effets d'une préparation d'échantillon sur des biofluides complexes tels que la salive ou le plasma seront étudiés. Par la suite, deux approches permettant la détection de miARNs endogènes (c'est-à-dire de miARNs non marqués et produits par des systèmes biologiques) seront décrites, comparées et leurs limites seront discutées. Enfin, la détection de la séquence spécifique micro-ARN 21 (miR-21) dans un extrait provenant de lignées cellulaires modèle du cancer du pancréas sera réalisée et comparée à l'approche classique d'une détection par RT-qPCR. Nous démontrerons ainsi les possibilités d'utilisation de la plateforme nanofluidique pour des applications biologiques pertinentes.

4.1. Vers une préparation d'échantillon dédiée à la détection de miARNs et compatible avec des systèmes nano et microfluidiques

Afin de prétendre utiliser notre dispositif pour une application clinique, il nous est paru important de mettre en place une préparation d'échantillons biologiques dédiée à notre plateforme nanofluidique permettant la manipulation de ces échantillons pour analyse. En effet, les étapes d'extraction utilisées en biologie (comme décrites dans le premier chapitre) sont difficiles à standardiser. De plus, la purification des échantillons (indispensable aux standards de la détection des miARNs) provoque des biais avec des conséquences sur la détection finale (perte de matériel, dégradation, etc.). Bien que des efforts soient faits pour tenter de caractériser ces méthodes d'extraction,¹ on remarque des disparités importantes d'un kit d'extraction à l'autre.²

Dans notre cas, la détection est effectuée indépendamment d'étapes d'amplification, et les niveaux de pureté nécessaires à la capture des miARNs sur le capteur ne sont pas aussi contraignants que dans le cas des standards de détection actuels, qui dépendent d'enzymes très sensibles à leur environnement réactionnel. Cependant, il est impossible de s'affranchir complètement d'une préparation d'échantillon. En effet, bien que qualifiés de « circulants », les miARNs sont rarement libres dans les biofluides complexes mais souvent en interaction avec des protéines (Ago2, etc.) ou bien encapsulés (et donc protégés) dans des vésicules (exosomes, etc.) comme le décrit largement la littérature.^{3,4} Nous allons développer, dans la suite du mémoire, une préparation d'échantillon adaptée et versatile (c'est-à-dire, adaptable à différentes origines d'échantillon) dans le cas de la salive et du plasma.

4.1.1. Les RNases ou l'impossibilité de trouver des miARNs libres en circulation

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, la présence de RNases dans les biofluides est une des origines de la digestion et, par conséquent, de la dégradation des miARNs en circulation. Nous allons ici, dans un premier temps, étudier la dégradation des miARNs dans les biofluides.

4.1.1.1. Quelle quantité de RNase dans les biofluides (cas de la salive et du plasma) ?

Tout d'abord, nous avons souhaité déterminer la concentration de RNases dans la salive et le plasma. Nous avons utilisé pour ces expériences une gamme de concentrations de RNase A (de 10 pg/mL à 10 ng/mL) incubée dans du PBS 1X (*phosphate-buffered saline*) en présence de 1 μ M de miR-21 synthétique. Par la suite, et via une mesure relative de fluorescence après marquage à l'aide d'un kit dédié (protocole en Annexe D), nous avons pu déterminer par extrapolation un ordre de grandeur des quantités d'enzymes présentant une activité RNase dans les biofluides.

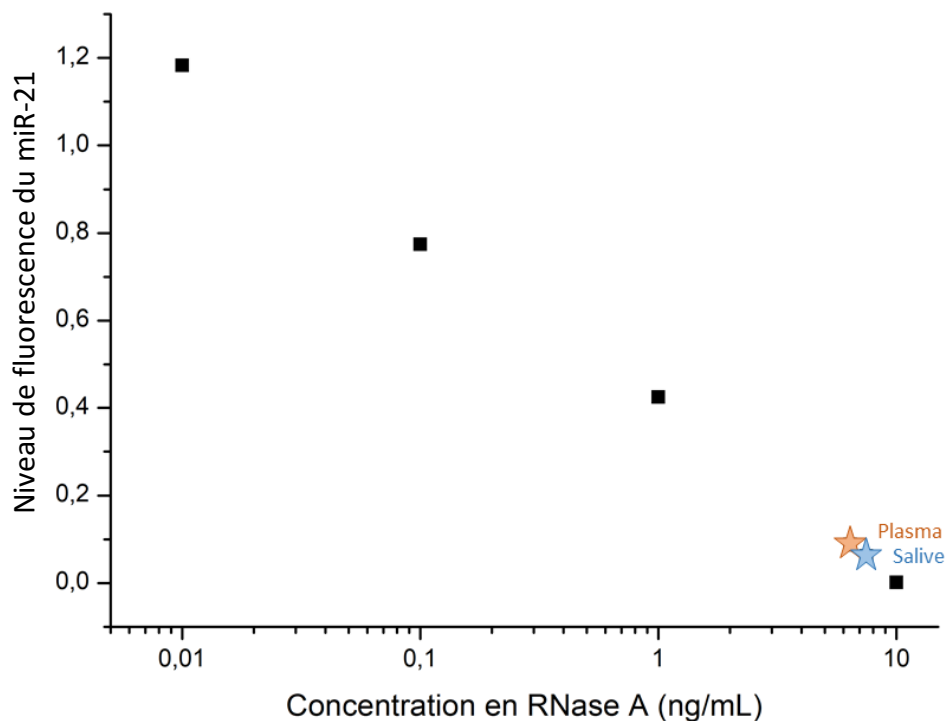


Figure 4-1 : effets de la concentration de RNase A sur 1 μ M de miR-21 synthétique après incubation dans du PBS 1X et marquage fluorescent à l'aide d'un kit dédié (cf. protocole en annexe D). On observe une chute du signal fluorescent avec l'augmentation de la concentration en RNase A. Ces données sont comparées avec les niveaux de fluorescence obtenus après ajout de la séquence dans du plasma et de la salive.

Les intensités de fluorescence mesurée pour la gamme en RNase ont été normalisées avec le signal mesuré pour un spike de miRNA dans du PBS 1X (sans ajout de RNase). De plus, nous avons pu comparer les intensités de fluorescence mesurées avec la gamme à celle obtenues en ajoutant les miARNs synthétiques dans de la salive ou du plasma (cf. Figure 4-1). On mesure une décroissance exponentielle du niveau de fluorescence en fonction de la concentration en RNase A dans l'échantillon.

Une concentration très importante en RNase (> 10 ng/mL) engendre une digestion des miARNs en solution qui rend impossible leur détection en fluorescence, car lorsque dégradé, l'interaction électrostatique des fluorophores avec la séquence devient impossible. En effet, le marquage nécessite la présence de plusieurs bases successives pour que l'interaction se mette en place. Dans le cas des mesures dans le plasma et la salive, on note une faible intensité de fluorescence, synonyme d'une dégradation des séquences importantes. On peut, suite à ces observations, conclure que les miARNs ne peuvent pas être totalement libres en circulation car, si tel était le cas, ils seraient très vite digérés par les enzymes présentes en quantité dans les fluides biologiques. De plus, nous pouvons estimer l'activité des RNases en circulation à celle de 1 et 10 ng/mL de RNases A.

4.1.1.2. La présence de RNases : seul mécanisme de dégradation ?

Compte tenu de l'activité néfaste des RNases sur les miARNs circulant, nous avons développé plusieurs approches afin de neutraliser leur activité. Nous avons utilisé dans un premier temps un inhibiteur de RNase (RNase inhibitor, ThermoFisher) qui consiste en une protéine de 49 kDa présentant une très forte affinité pour ces enzymes ($K_D \sim 50$ fM, cf. Figure 4-2) entraînant leur inhibition en raison d'interactions de nature électrostatique impliquant 18 ponts hydrogènes.^{5,6}

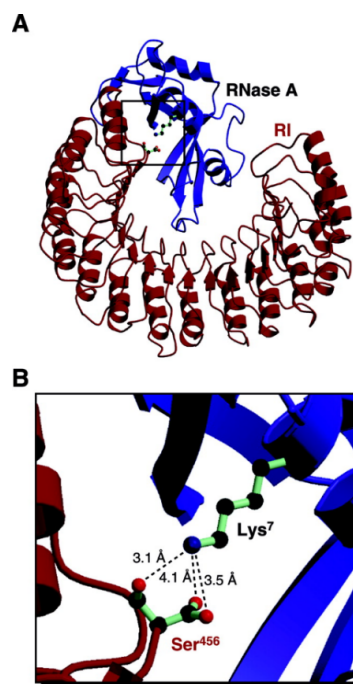


Figure 4-2 : interaction de l'inhibiteur de RNase avec la RNase A.⁷

Ainsi, nous avons ajouté 0,04 unité de cet inhibiteur de RNases (1 unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire au traitement d'une μmol de substrat en une minute) à la préparation contenant 1 μM de miR-21 synthétique. De la même manière que précédemment, une mesure de fluorescence est effectuée pour mesurer la quantité de miARN présent dans la solution, qui sera rapportée à la Figure 4-1 (cf. Figure 4-3).

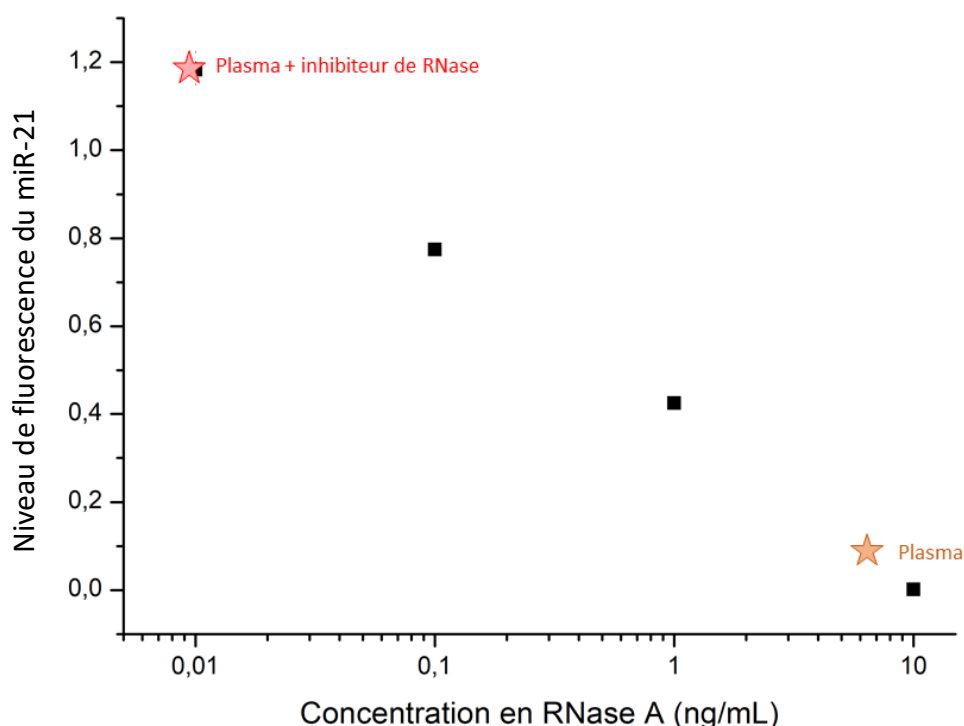


Figure 4-3 : effet de l'inhibiteur de RNase dans du plasma pré-traité ou non avec un inhibiteur de RNase sur la dégradation du miR-21 (1 μM) après marquage en fluorescence avec un kit dédié (cf. annexe D).

Les résultats présentés Figure 4-3 démontrent que l'inhibiteur de RNase empêche la dégradation des miARNs exogènes. Ces résultats suggèrent que les miARNs endogènes, beaucoup moins enclins à subir ce type de dégradation car relativement faciles à détecter et quantifier, sont chaperonnés et protégés en solution. Par conséquent, leur détection avec notre plateforme sera en théorie impossible tant qu'ils seront en interaction ou complexés avec des protéines ou autres vésicules biologique car notre capteur est basé sur une reconnaissance via hybridation de la séquence cible avec une sonde ADN complémentaire. Il est donc essentiel de définir de nouvelles approches pour s'assurer que les miARNs

endogènes soient « libérés » et donc capable d'interagir avec notre système de détection, tout en évitant leur dégradation par les RNases présentes dans les fluides biologiques.

4.1.2. Lyse des interactions entre les protéines ou les vésicules liées aux miARNs

Nous étudions dans cette partie la manière de briser les interactions entre les miARNs et des protéines, ou de les libérer des micro et nanovésicules présentes en circulation qui peuvent les transporter. Pour ce faire, il aurait été possible d'utiliser une solution de lyse, habituellement employée dans les protocoles de purification. Ces solutions sont cependant constituées d'éléments chimiques très agressifs (eg. HCl, NaOH, etc.). Leur utilisation nécessite, par conséquent, des étapes de purification *a posteriori* car leur présence en solution ne permettrait pas l'hybridation des miARNs avec les séquences sondes via notre plateforme.

Afin de simplifier le plus possible l'extraction, nous avons sélectionné une approche simple mais efficace qui consiste à appliquer un cycle de chauffage (95°C pendant 10 minutes puis refroidissement 0°C) pour permettre l'éclatement des vésicules extracellulaires riches en miARNs, et la dissociation des miARNs de ses molécules chaperonnes ou des protéines, comme préalablement rapporté.⁸

4.1.2.1. Effet d'un traitement thermique sur un plasma non traité

Lors du traitement du plasma par chauffage progressif, on constate un changement d'état d'une viscosité proche de l'eau à celle d'un composé gélatineux qu'il devient impossible de manipuler. Ces effets ont déjà été étudiés et seraient liés aux conditions de pH et de salinité du plasma dans lesquels la dénaturation des protéines est effectuée (ces effets n'ont par ailleurs pas été observés dans la salive).^{9,10} Ainsi, suite à leur dénaturation par chauffage, les protéines ont tendance à former des agrégats qui changent de manière irréversible l'état de l'échantillon. Afin d'éviter ces précipitations, il est possible d'effectuer préalablement un traitement à la protéinase K. Cette enzyme permet une digestion efficace des protéines (pendant 30 minutes à 37°C), et réduit considérablement la formation d'agrégats lors de l'étape de chauffage (cf. Figure 4-4). Il est cependant possible de se débarrasser des agrégats résiduels par centrifugation à 10 000 xg pendant 10 min.

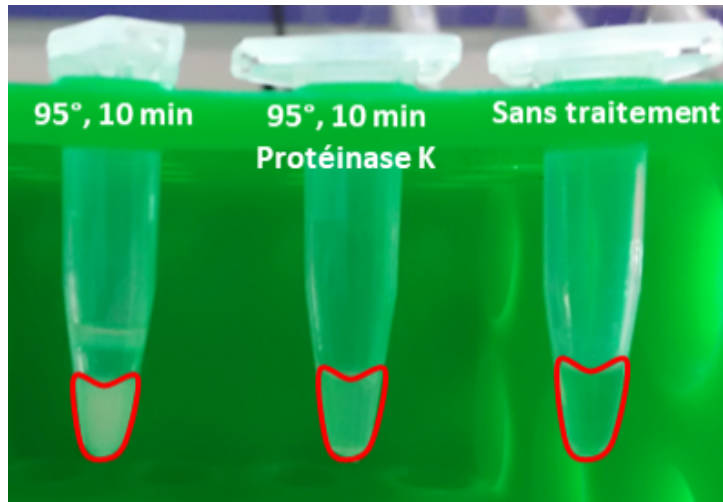


Figure 4-4 : effet d'un traitement à la protéinase K du plasma sur la formation d'agrégats, on observe une variation de la couleur de la solution passant d'une apparence blanchâtre (en l'absence de traitement à la protéinase et K), à une couleur proche du plasma avant chauffage (après traitement à la protéinase K). Ce changement de couleur est dû à la présence d'agrégats absorbants dans la solution.

Nous pouvons donc récapituler ici le protocole préliminaire : avant toute étape de chauffage, il est indispensable d'effectuer une étape de traitement à la protéinase K afin d'éviter une précipitation des protéines. Nous souhaitons maintenant vérifier l'effet de la température sur la libération des miARNs en interaction ou chaperonnés présents dans l'échantillon.

4.1.2.2. Effet de la température sur la libération des miARNs

4.1.2.2.1. Effet de la température sur l'intégrité des exosomes

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux exosomes, vésicules de très petites tailles (de la dizaine à la centaine de nanomètres) et produits par les cellules, dont le rôle est encore mal compris, bien qu'ils soient associés à de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques de communication intercellulaire. Il est, par ailleurs, largement admis dans la littérature que ces vésicules sont riches en messagers moléculaires, y compris les miARNs.^{3,4,11-13} Nous avons donc décidé, dans un premier temps, de les isoler puis de caractériser leur réponse suite au protocole de chauffage/refroidissement préalablement abordé.

4.1.2.2.1.1. Protocole d'extraction et isolement des exosomes

Il existe différentes méthodes permettant l'isolement des exosomes. Le standard actuel consiste à effectuer une ultracentrifugation (> 100 000 xg). Cette méthode est généralement laborieuse car elle nécessite une séparation différentielle des particules en solution en fonction de leur taille (cela signifie donc que des centrifugations successives à des vitesses différentes sont nécessaires). Par conséquent, nous avons privilégié un isolement via précipitation des exosomes avec un kit dédié (Total exosome isolation kit from plasma, Invitrogen) (cf. Annexe E pour le protocole détaillé). Les exosomes forment ainsi des amas via des interactions électrostatiques. Bien que moins spécifique que l'ultracentrifugation, cette méthode permet une concentration efficace des exosomes.

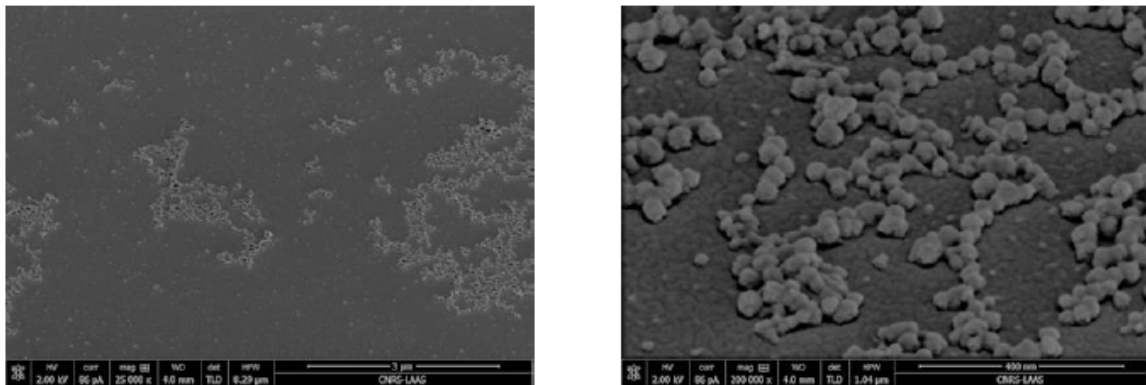


Figure 4-5 : observation au MEB des exosomes isolés avec un kit dédié à partir de plasma par précipitation (cf. annexe E) puis fixés sur une lame à l'aide de glutaraldéhyde 5% et déshydratés par passage successif dans des bains allant de 50% à 100% d'éthanol .

L'isolement des exosomes a pu être validée après caractérisations au MEB (cf. Figure 4-5). Pour ce faire, la solution d'exosomes est déposée sur une lame puis fixée à l'aide de glutaraldéhyde 5% pendant 3 minutes. La déshydratation des échantillons est ensuite réalisée de manière progressive grâce au passage des lames dans quatre bains successifs d'éthanol de 50 à 100%. Avant observation, les échantillons ont été métallisés avec une bicouche platine/or de 10 nm d'épaisseur pour faciliter l'analyse au MEB.

Nous retrouvons ainsi des amas d'objets sphériques d'un diamètre compris entre 50 et 100 nm correspondant typiquement à la taille des exosomes. Cette caractérisation nous a donc permis de valider le kit d'isolement des exosomes.

4.1.2.2.1.2. Caractérisation en taille après chauffage

L'influence de la température sur les exosomes a ensuite été étudiée. Afin de démontrer leur lyse, la taille des vésicules en solution a été déterminée par mesure de diffusion dynamique de la lumière (Zetasizer, Malvern Instruments, UK). Cette caractérisation a été effectuée après isolement des exosomes (via le kit d'extraction), chauffage à 95°C pendant 10 minutes puis centrifugation à 10 000 xg pendant 15 minutes comme décrit plus haut. La distribution en taille des exosomes (100nm) avant chauffage est en accord avec les données obtenues lors de la caractérisation effectuée au microscope électronique à balayage. Au contraire, cette distribution disparaît pour faire place à un pic aux environs du micromètre après chauffage, correspondant probablement à des agrégats protéiques contaminants malgré l'étape de centrifugation. Le pic d'environ 5 nm après chauffage correspondrait, typiquement, à la taille de petits oligonucléotides et de protéines qui n'auraient pas précipité.

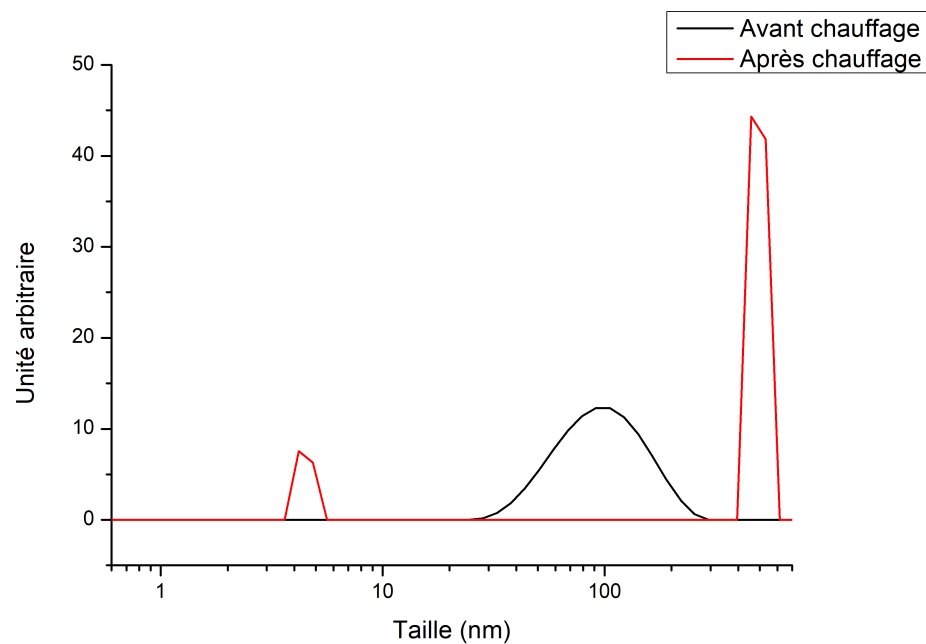


Figure 4-6 : effet de l'étape de chauffage suivie d'une centrifugation sur les exosomes par caractérisation de la taille des particules présentes en solution.

On pourrait donc conclure ici que la température semble permettre la libération des miARNs après lyse des exosomes ; cependant, nous n'effectuons ici qu'une mesure en taille et ne connaissons pas la

nature exacte des objets biologiques en solution. Afin de confirmer la libération des séquences, nous avons donc effectué une étape de RT-qPCR sur l'échantillon après chauffage.

4.1.2.2.2. Détection de la séquence miARN 21 (miR-21) après chauffage

Afin de vérifier la libération des miARNs endogènes, une détection spécifique de miR-21 plasmatique par RT-qPCR a été réalisée suite à la préparation d'échantillon décrite ci-dessus, ou après extraction et la purification par phénol-chloroforme et colonne de silice. Dans ces conditions, miR-21 est détecté après 31,9 cycles d'amplification, alors que miR-21 est indétectable si l'échantillon n'est pas préalablement chauffé. En référence, le protocole classique d'extraction purification par phénol-chloroforme et colonne de silice indique des valeurs d'amplification de miR-21 de l'ordre de 33 cycles. Cette expérience suggère donc la présence de séquences miARN dans l'échantillon, qui sont quantifiables de façon satisfaisante après application d'un protocole certes rudimentaire, mais efficace.

On peut donc ici récapituler le protocole permettant la lyse des exosomes (cf. Figure 4-7).

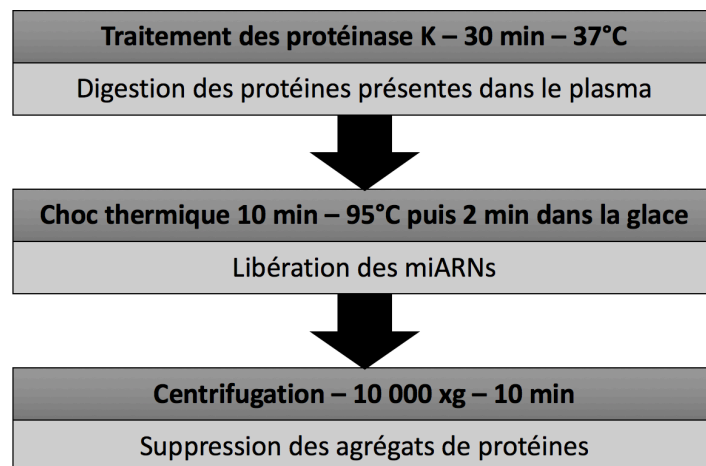


Figure 4-7 : protocole permettant la lyse des exosomes.

Bien qu'une détection des miARNs ait été effectuée après un simple chauffage de la solution, il est cependant important de mentionner que les exosomes avaient été préalablement purifiés ; nous

ignorons donc si ce protocole est applicable dans son intégralité dans le cas de substrats complexes tels que la salive ou le plasma, dans lesquels sont présentes des RNases qu'il faut absolument considérer dans l'équation et assurer leur inhibition avant libération des miARNs de leur chaperonnes protéiques ou des exosomes qui les transportent.

4.1.2.3. Inhibition des RNases avant libération des miARNs

Intuitivement, le protocole de choc thermique utilisé pour la libération des miARNs semble tout à fait capable d'inhiber les RNases présentes en solution, ce que nous avons pu valider expérimentalement. Cependant, les cinétiques de libération des miARNs et d'inhibition des RNases sont difficiles à étudier, et le risque que miARNs et RNases entrent tout de même en contact reste conséquent. Afin d'éviter toute dégradation des miARNs, l'inhibiteur de RNase a été dans un premier temps ajouté avant le chauffage. Cependant, il a été observé que ce produit n'était pas compatible avec l'utilisation préalable de protéinase K, cette dernière entraînant sa dégradation, libérant de ce fait les RNases. Dans des conditions particulières mais nécessitant une préparation d'échantillon plus longue, la protéinase K aurait pu être utilisée pour inhiber la RNase comme le décrit la littérature.¹⁴

Nous avons donc décidé d'utiliser du DTT (Dithiothréitol), dont le mécanisme principal est la réduction des liaisons disulfures protéiques, pour bloquer l'activité des RNases. Wang *et al.* ont ainsi montré que l'utilisation de 5 mM de DTT entraîne l'exposition des parties hydrophobes des protéines et leur agrégation.¹⁵ Ainsi, nous avons pu vérifier qu'un traitement avec 10 mM de DTT pendant 10 minutes à 60°C après digestion par la protéinase K et avant choc thermique permet d'éviter la dégradation des miARNs dans la salive (cf. Figure 4-8). Les résultats présentés ont, comme précédemment, été normalisés avec le signal fluorescent mesuré après marquage des miARNs dans du PBS 1X.

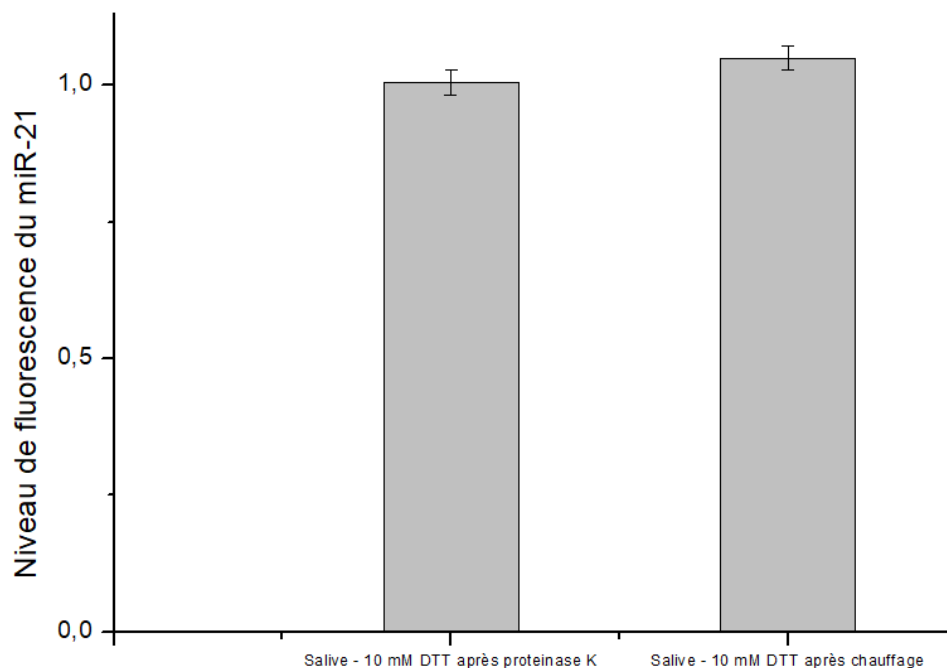


Figure 4-8 : effet du DTT sur la protection de la séquence miR-21 après le traitement à la protéinase K ainsi qu'après le choc thermique permettant la libération des miARNs. Ces données ont été normalisées avec le niveau de fluorescence du miR-21 mesuré dans du PBS 1X. Le contrôle négatif dans de la salive sans DTT est présenté dans la Figure 4-1

Nos résultats démontrent que le traitement par le DTT permet de préserver les miARNs synthétiques incubés dans la salive. Cet effet est, de plus, insensible à un traitement préalable à la protéinase K ainsi qu'à une étape de chauffage, ce qui le rend compatible avec les différentes étapes nécessaires à la libération des miARNs.

4.1.3. Bilan

Durant la première partie de ce chapitre, nous avons déterminé un protocole minimaliste afin de rendre disponible les miARNs pour une analyse via notre système (cf. Figure 4-9). Les étapes mises en jeu ne sont pas gourmandes en ressource et peuvent être entreprises dans tous les laboratoires de recherche. Enfin, cette préparation minimale permet d'éviter toute dilution ou perte d'oligonucléotides qui sont inhérentes à une préparation d'échantillon impliquant des étapes de séparation chimique ou de purification sur colonne.

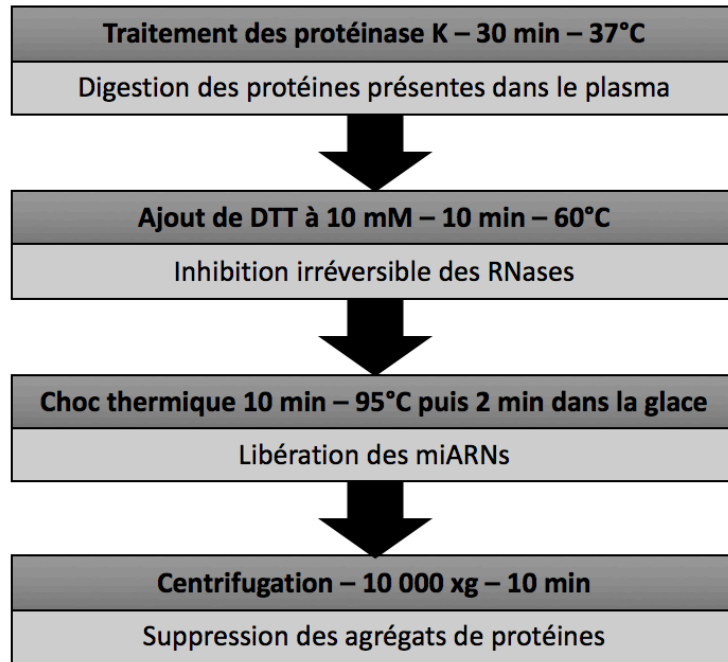


Figure 4-9 : bilan des étapes de préparation pour la détection des miARNs.

4.2. Méthodes de marquage pour la détection de miARNs endogènes

Afin de permettre la détection de miARNs endogènes, nous avons souhaité étudier deux approches basées sur une révélation en fluorescence. La première consiste à marquer directement les miARNs endogènes, en incorporant un fluorophore dans leur séquence. La seconde approche repose, quant à elle, sur l'utilisation de sondes marquées greffées en surface des nanocanaux fluidiques, et permet une quantification directe de la concentration de miARN sans étape de marquage.

4.2.1. Choix de la séquence cible

Contrairement à l'étude effectuée dans le chapitre 3 où nous avons choisi des miARNs avec des séquences très similaires de la famille let-7 afin d'établir la sélectivité de notre approche, nous souhaitons ici démontrer la possibilité de détecter un miARN endogène avec notre plateforme. Pour cela, nous avons sélectionné miR-21 en raison de sa surexpression dans le cancer du pancréas (cf. Tableau 4-1),¹⁶⁻¹⁸ et, car il est détectable dans la salive des patients.¹⁹

Nom	Séquence
Cible miR-21 (ARN)	5'-UAG-CUU-AUC-AGA-CUG-AUG-UUG-A-3'

Tableau 4-1 : séquence cible miR-21

4.2.2. Marquage des cibles par réaction enzymatique

Afin de marquer les miARNs endogènes, plusieurs méthodes peuvent être mises en place. Il est par exemple possible d'utiliser une séquence marquée et complémentaire à la première moitié de la séquence miARN cible. De la même manière, une séquence sonde immobilisée en surface est, quant à elle, complémentaire à la seconde moitié de la séquence de la cible. C'est typiquement cette approche qui est utilisée dans la technologie NanoString.²⁰ Il est aussi possible d'utiliser un anticorps marqué et spécifique au duplex ADN/miARN alors formée.²¹ Dans les deux cas, les affinités mises en jeu sont

faibles et les sensibilités atteintes sont donc affectées. De plus, ces approches demandent des étapes de révélation et rendent donc impossible une détection des miARNs en temps réel.

Il est aussi possible d'utiliser des fluorophores intercalants spécifiques aux séquences doubles brin formées lors de la détection comme c'est le cas lors d'une détection en PCR. Cependant, les niveaux de spécificité sont faibles, et ce type d'intercalant peut également interagir avec les séquences sondes simple brins (c'est-à-dire les séquences qui n'ont pas capturé de miARNs), engendrant ainsi un bruit de fond important. De plus, ces molécules intercalantes ne sont pas toujours optimales pour une utilisation en nanofluidique ; nous avons pu mesurer dans notre cas, une forte interaction non-spécifique des fluorophores avec les parois de la puce fluidique (résultats non montrés).

Nous avons, par conséquent, décidé de modifier chimiquement les séquences miARNs en incorporant un fluorophore de type cy3 (cyanine 3) en fin de séquence. Pour atteindre cet objectif, de multiples kits commerciaux sont disponibles tel que le mirVana miRNA Labeling Kit (Ambion), le miRNA Complete Labeling kit (Agilent) ou encore le miRCURY LNA™ microRNA Array Hi-Power Labeling kit (Exiqon). Ces kits sont généralement utilisés pour effectuer l'incorporation des fluorophores avant détection sur des plateformes de type *microarray* déjà décrites. Leur prix est cependant important (proche de 500 €), pour un nombre limité de réactions (environ 30). De plus, la biochimie impliquée dans l'incorporation du fluorophore est bien décrite dans la littérature. Nous nous sommes donc basés essentiellement sur la publication de Wang *et al.* qui décrit en détail le marquage des séquences miARNs afin de nous affranchir des kits vendus dans le commerce.²²

4.2.2.1. Protocole utilisé

La première étape de ce protocole consiste à déphosphoryler les séquences ARNs présentes dans l'échantillon étudié. Ainsi, en partant d'une quantité initiale de 100 ng d'ARN total, il est nécessaire d'ajouter 20 unités de CAIP (calf alkaline phosphatase) et d'incuber l'échantillon pendant 30 minutes à 37°C. Cette réaction enzymatique entraîne l'élimination des radicaux phosphoryles en fin de séquence ARN. Une étape de dénaturation est ensuite conseillée afin de casser les structures secondaires de certaines séquences ARNs. Pour ce faire, un chauffage à 100°C est réalisé pendant 5 à 10 minutes puis l'échantillon est refroidi dans la glace immédiatement pendant 2 à 15 minutes. L'ajout de DMSO aurait pu permettre une dénaturation efficace, cependant, nous n'avons pas souhaité ici la présence en solution de solvant incompatibles avec la détection, nécessitant alors une étape de purification supplémentaire postérieure au marquage. La dernière étape consiste à conjuguer le fluorophore pCp-Cy3 (cytidine-5'-phosphate-3'-(6-aminohexyl)phosphate, marquée avec un cy3) aux

groupes 3'-OH déphosphorylés des ARNs en solution (cf. Figure 4-10). Pour ce faire, 20 unités d'enzyme T4 RNA ligase sont utilisées pendant 2h d'incubation à 16°C. Afin de permettre un greffage avec un rendement efficace, nous utilisons une concentration finale de pCp-Cy3 de 2,5 µM. La réaction de ligation est ensuite désactivée après chauffage à 65°C pendant 15 min.

1. Déphosphorylation



2. Marquage

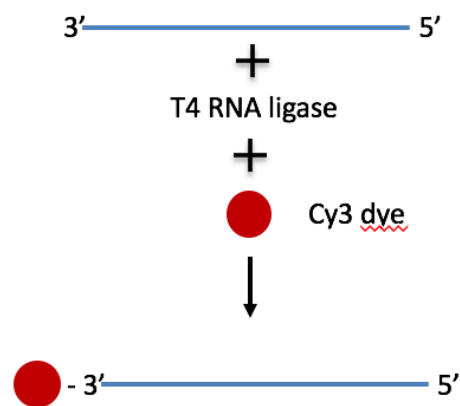


Figure 4-10 : principe de l'incorporation d'une fluorophore sur une séquence miARN.

Nous pouvons noter ici que suite à l'ajout des différents enzymes et des fluorophores, le volume final de solution est de 20 µL. Afin de permettre la détection des miARNs, la salinité de la préparation est ajustée à celle du PBS 1X par ajout de 2,2 µL de PBS 10X.

4.2.2.2. Marquage en solution de miARN et détection avec la plateforme nanofluidique

Tout comme dans le chapitre 3, nous avons utilisé des sondes linéaires thiolées pour rendre la surface de la plateforme nanofluidique spécifique. Le protocole utilisé pour le greffage est le même que dans l'article présenté dans le chapitre 3. Brièvement, une première étape d'incubation avec 1µM de sonde complémentaire à la cible miR-21 (cf. Tableau 4-2) conservées dans un tampon TE 1X, 1M KH₂PO₄ est effectuée pendant une heure, puis, la surface est incubée après rinçage et séchage en présence de 1

mM de mercaptoéthanol pour contrôler la densité de sondes et passiver le plot en or afin d'éviter toutes interactions non-spécifiques sur la surface. Ce protocole est, par ailleurs, décrit en détail par Tarlov *et al.*²³

Nom	Séquence
Sonde miR-21 (ADN)	5'-TCA-ACA-TCA-GTC-TGA-TAA-GCT-A-(CH ₂) ₆ -HS-3'

Tableau 4-2 : séquence de la sonde linéaire pour la détection du miR-21.

Le protocole de marquage décrit a, par la suite, été appliqué à un échantillon de 100 nM de miR-21 synthétique. Les images en fluorescence de détection sur puce ont été acquises avec un objectif 20x et un temps d'exposition par image de 500 ms. La différence de pression appliquée est de 50 mbar, ce qui signifie que $Da_s > 1$, c'est-à-dire que l'interaction est limitée par la convection sur toute la longueur de la surface en or. Ainsi, comme décrit dans le chapitre 2, nous sommes dans les conditions où l'hybridation n'est pas uniforme sur toute la longueur du capteur.

Il est important de souligner que la concentration de pCp-Cy3 est en excès d'un facteur 100 par rapport au nombre de séquences ARNs en solution. Ainsi, un nombre important de fluorophores non incorporés est encore présent dans l'échantillon au moment de la détection. Ce point amène un bruit de fond important, bien que fortement limité par la faible hauteur du canal. Cependant, du fait de l'interaction limitée par la convection, il est possible d'effectuer une mesure différentielle du signal spécifique (accroche en début de canal) par rapport au bruit de fond non spécifique dû aux fluorophores non incorporés (en fin de canal) (cf. Figure 4-11).

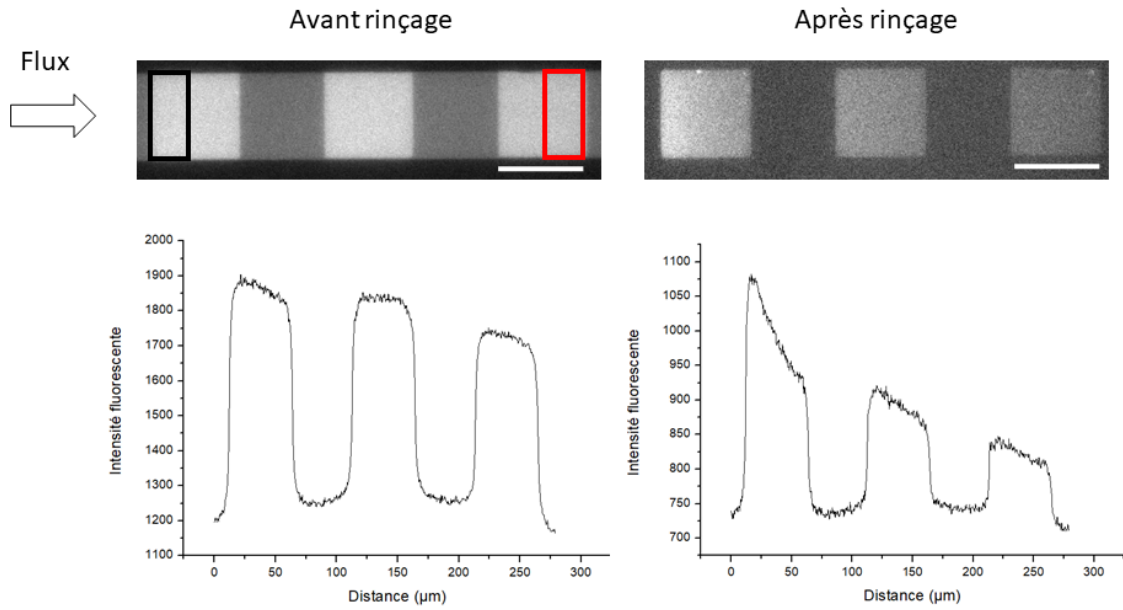


Figure 4-11 : principe de la mesure différentielle après marquage dans un nanocanal contenant trois plots en or (échelle : 50 μm) et mesure de la fluorescence avant et après rinçage.

Le rinçage de la puce avec une solution tampon en flux inversé permet de confirmer cette accroche décrite en début de capteur. Cette accumulation en début de capteur est difficile à observer lors de l'hybridation du fait du bruit de fond. Cependant, il est possible de soustraire le signal mesuré en fin de canal (en rouge) à celui mesuré en début de canal (en noir) afin de déterminer la fluorescence due à l'accroche des miARNs marqués (cf. Figure 4-12).

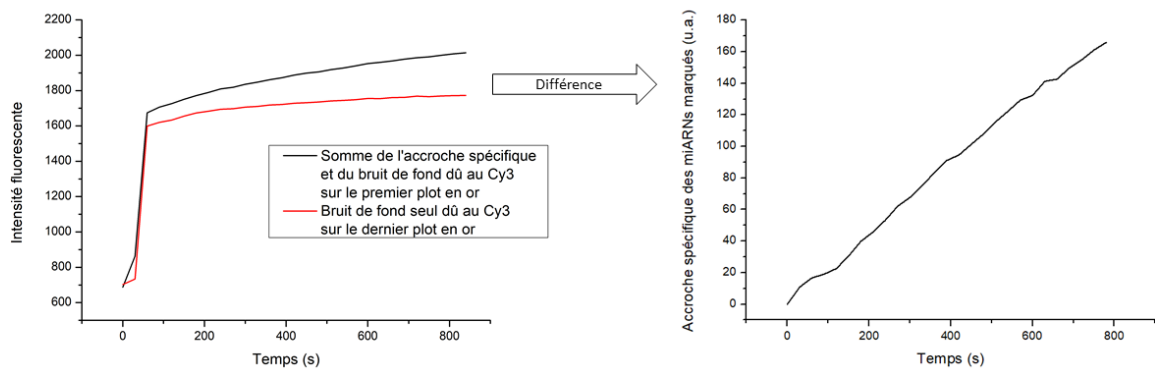


Figure 4-12 : niveaux de fluorescence mesurés en début et fin de canal, et soustraction du signal spécifique à l'accroche mesurée en début de capteur.

Cette approche permet donc une détection des miARNs en temps réel (via une mesure différentielle des niveaux de fluorescence spécifiques et non spécifiques) du fait des conditions particulières de confinement qui limite l'interaction par la convection. Nous avons ainsi démontré qu'il est possible de marquer et de détecter en fluorescence des miARNs synthétiques préalablement non marqués. On comprend ici l'avantage certain de la nanofluidique qui permet la mesure d'un signal spécifique du fait de la réduction du bruit de fond (bien que présent) dû à la réduction de la hauteur du canal en temps réel. De plus, le régime atteint, limité par la convection, entraîne une accroche uniquement en début de capteur et permet de déterminer la fluorescence non spécifique. Cependant, cette approche souffre de nombreuses limites qui seront détaillées dans le sous-chapitre suivant.

4.2.2.3. Limitation de la méthode et voies possibles d'amélioration

Bien que cette méthode semble être satisfaisante et permette la détection des miARNs préalablement non marqués, des limitations sont à noter. Tout d'abord, l'incorporation des fluorophores est très chronophage (environ 3h de préparation d'échantillon), ce qui limite l'intérêt de cette approche. De plus, elle nécessite des dilutions, limitées mais inévitables. Enfin, des réactions enzymatiques sont nécessaires à l'incorporation des fluorophores. Il devient alors compliqué de marquer des échantillons complexes. En effet, l'utilisation d'échantillons purifiés à concentration en ARN total quantifiable assurerait des rendements en termes de marquage reproductibles. En revanche, dans un échantillon complexe il n'est pas possible de travailler à quantité d'ARN total constante (nous reviendrons sur ce point en fin de chapitre) car la caractérisation de la concentration en ARN total est impossible du fait des multiples contaminations, et d'incompatibilité des systèmes actuels avec les fluides biologiques complexes. Ainsi, la quantité d'ARN totale ne sera pas constante d'un échantillon à l'autre, ce qui affectera le rendement sur l'incorporation des fluorophores. On comprend facilement que face à ce constat, l'approche décrite ne peut être utilisée que sur des échantillons extraits et purifiés. De plus, le temps de préparation inhérent à cette méthode ne remplit pas le cahier des charges défini pour une préparation d'échantillon moins contraignante et évitant toute perte de matériel que les standards actuels.

Face à ces différents points négatifs, nous avons recherché une autre approche en mesure de permettre la détection des miARNs endogènes. Plutôt que de marquer les molécules cibles, il nous est apparu judicieux de considérer l'utilisation de sondes en surface de type balise moléculaire, qui seront décrites dans la suite de ce chapitre.

4.2.3. Mise en place d'une détection avec des sondes marquées de types balises moléculaires

4.2.3.1. Principe de fonctionnement des balises moléculaires dans des nanocanaux

Les balises moléculaires sont des chaînes d'oligonucléotide de 15 à 30 bases azotées. L'originalité de telles séquences est qu'elles sont conçues de manière à présenter une structure en tête d'épingle, c'est-à-dire que ses extrémités 3' et 5' sont complémentaires. Ceci entraîne la formation d'une structure secondaire avec deux éléments distincts : un bras formé des séquences complémentaires et une boucle. Cette dernière est complémentaire à la séquence miARN recherchée. Afin de permettre une détection en fluorescence, un fluorophore est incorporé sur l'une des extrémités de la séquence, tandis que l'autre extrémité est munie d'un désactivateur (en anglais, *quencher*). Ainsi, en l'absence de la cible miARN, la séquence est fermée, ce qui entraîne l'absorption du signal émis par le fluorophore du fait de la proximité du désactivateur et donc l'absence de fluorescence. En revanche lorsque la cible est présente, la séquence s'ouvre et le fluorophore émet sans que le signal ne soit absorbé du fait de la distance qui le sépare du désactivateur (cf. Figure 4-13).

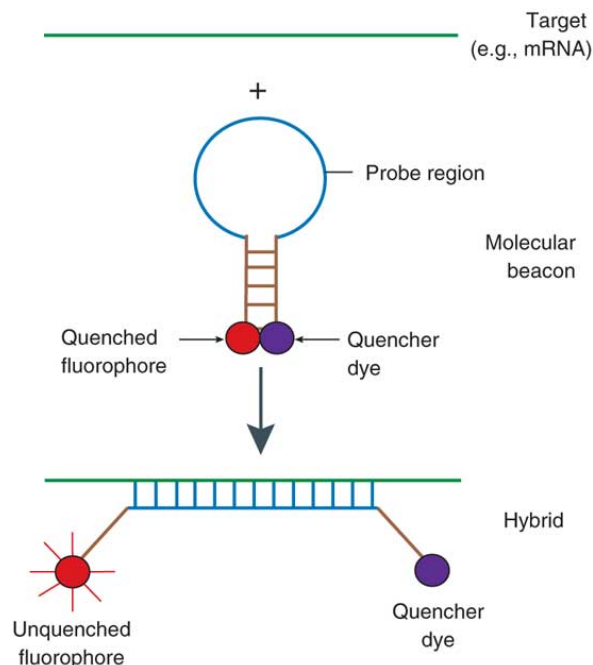


Figure 4-13 : principe de fonctionnement des balises moléculaire (*molecular beacon* en anglais).²⁴

Les balises moléculaires peuvent être utilisées en volume (cela signifie que les séquences sont utilisées en solution et non greffées à une surface) et donnent lieu à de multiples applications, notamment pour le diagnostic médical de l'hépatite B ou du HIV par exemple.²⁵⁻²⁷ Dans le cas de la détection de miARNs, Baker *et al.* atteignent des limites de détection inférieures à 1 nM.²⁸ Cependant, les balises moléculaires sont toujours à un équilibre thermodynamique, avec certaines séquences ouvertes même en absence de cible miARN. Cela engendre, irrémédiablement, un bruit de fond qui limite la sensibilité de la méthode de détection.

Afin d'améliorer la limite de détection via des balises moléculaires, il est possible d'immobiliser ces dernières en surface. Cependant les détections mises en place sont très proches des technologies *microarray*, déjà décrites dans le premier chapitre, et nécessitent des temps d'incubation très longs sans possibilité d'étude en temps réel.²⁹⁻³² Nous avons, par conséquent, choisi de coupler cette immobilisation de balises moléculaires en surface avec notre dispositif nanofluidique. Ce type d'approche, à notre connaissance, n'a jamais été étudié dans la littérature (cf. Figure 4-14).

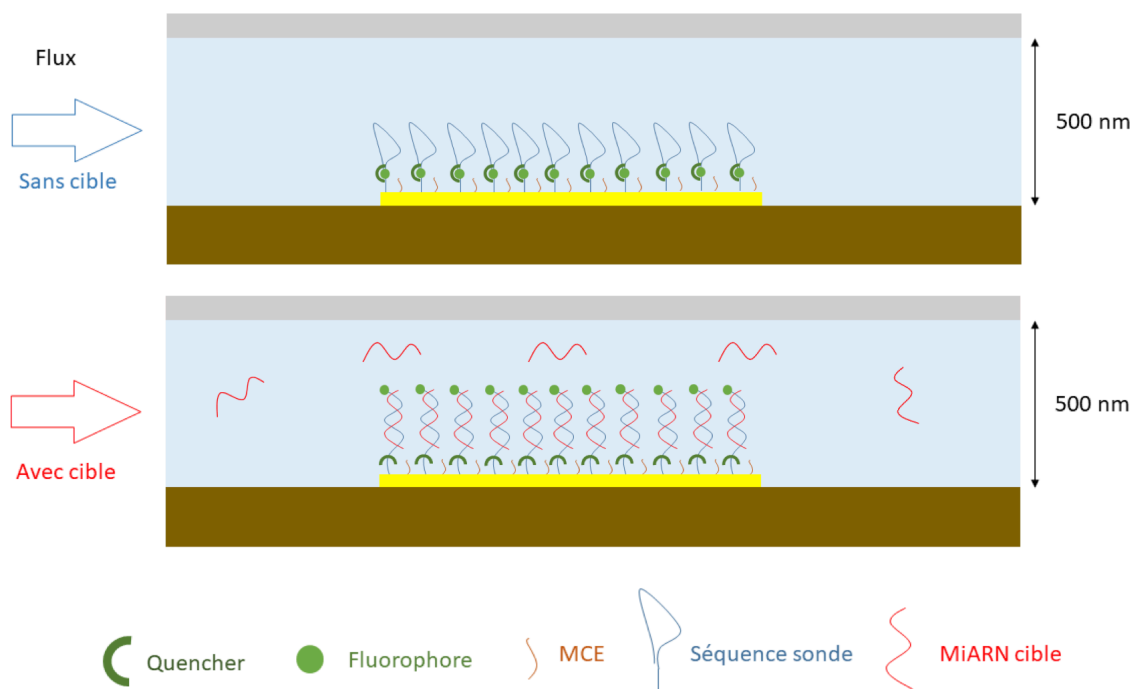


Figure 4-14 : principe de l'intégration d'une détection avec des balises moléculaires dans un nanocanal contenant des cibles ou non (le schéma n'est pas à l'échelle).

4.2.3.2. Particularités des balises moléculaires en comparaison avec des sondes linéaires

Les balises moléculaires représentent une solution idéale pour éviter un marquage des cibles et, ainsi, une préparation d'échantillon laborieuse. Cependant, ce type de séquences sondes ne se comporte pas comme une séquence linéaire, comme celles utilisées lors des expériences présentées dans les parties précédentes du mémoire. En effet, leur constante d'association est plus faible que celle des sondes linéaires, en raison de leur conformation spatiale « repliée », qui rend l'accessibilité et, par conséquent, une mise en place de l'interaction plus difficile en termes énergétiques. Cette facilité d'ouverture de la séquence sonde est bien sûr dépendante des longueurs du bras et de la tête d'épingle. Il est donc possible de travailler sur le choix de la séquence pour changer la constante d'association. De manière générale, et comme le montre Tsourkas *et al.*,³³ plus les bras sont courts, plus l'ouverture sera facile. Cependant, si l'ouverture est trop facile, le bruit de fond sera, quant à lui, plus important. Il faut donc identifier le compromis idéal entre bruit de fond et facilité d'ouverture en fonction de l'affinité de la séquence miARN ciblée avec la tête d'épingle complémentaire.

De plus, la densité de sondes doit être très finement contrôlée, si les molécules sont trop proches les unes des autres (dans le cas d'une forte densité) alors l'ouverture des balises moléculaires ne pourra pas avoir lieu en raison de contraintes stériques. Si, en revanche la densité est trop faible alors le signal mesuré en fluorescence sera trop faible. De manière générale les densités atteintes sont généralement un ordre de grandeur en deçà de celles obtenues avec des sondes droites.

On comprend alors les conséquences directes de ces deux points sur le deuxième nombre de Damkholer qui, pour rappel, définit si l'interaction est limitée par la réaction ou la convection. Ainsi, une constante d'association plus faible couplée à une densité de sondes en surface amoindrie mène à un régime limité par la réaction. Il faudra donc, dans le cas d'échantillon clinique où la quantité de matériel est limitée, optimiser la vitesse de convection (i.e. $Da_s > 1$) de la solution au-dessus du capteur afin de se placer dans le cas décrit dans le chapitre 3 pour lequel l'hybridation est limitée par la convection conduisant à un profil non-uniforme. Ceci est possible, soit par l'augmentation de la longueur L du canal, soit en réduisant sa hauteur h , ce qui conduit à une augmentation de la résistance hydrodynamique du canal, soit en réduisant la différence de pression appliquée au niveau des nanocanaux ΔP ou encore en modifiant la viscosité μ de la solution (cf. Equation (20)).

$$Da_s > 1 \Leftrightarrow \frac{k_{on}\rho_0 l}{v_m h} > 1$$

(20)

$$\Leftrightarrow \frac{k_{on}\rho_0 l \times 12\mu\text{L}}{h^3 \Delta P} > 1$$

Dans notre cas, le plus simple est d'ajuster la pression appliquée afin de faire varier la vitesse de solution dans les nanocanaux. Tsourkas *et al.* ont par ailleurs mesuré une constante d'association de l'ordre de $5.10^3 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$.³³ Les valeurs de densité de sonde optimales ont aussi été estimées à 2.10^{12} molécules. cm^{-2} .³⁰ On peut donc considérer une valeur de pression optimale de l'ordre du millibar, ce qui est compatible avec les contrôleurs de pressions utilisés pour les expériences.

Bien que l'interaction soit plus compliquée à mettre en place, elle permet, en revanche, une excellente sélectivité. En effet, l'ouverture de la séquence est très sensible à la présence d'une paire de bases non appariées et la grande spécificité des balises moléculaire par comparaison avec les sondes linéaires a été démontrée dans la littérature.³⁴ De plus, et tout comme pour les sondes linéaires, plus la séquence cible est longue, plus il est difficile de discriminer la présence d'une base non appariée.

4.2.3.3. Mise en place du protocole de greffage

Tout comme dans le cas de la détection après marquage, nous avons choisi de nous concentrer sur miR-21 pour les raisons déjà évoquées. La séquence sonde choisie est la même que celle utilisée en volume par Baker *et al.* adaptée à un greffage en surface (cf. Tableau 4-3).²⁸

Nom	Séquence
Sonde balise miR-21 (ADN)	5'-6-FAM- GCG-CGT -CAA-CAT-CAG-TCT-GAT-AAG-CTA- CGC-GC -(CH ₂) ₆ -HS-3'

Tableau 4-3 : séquence de la balise moléculaire pour la détection du miR-21, en gras les bases complémentaires formant le bras et en italique la séquence complémentaire à la cible.

Dans un premier temps, nous avons, établi un protocole de greffage adapté aux balises moléculaires. Contrairement aux greffages effectués précédemment, ici, la séquence sonde comporte un fluorophore 6-FAM (6-Carboxyfluorescein). Cela est problématique car les étapes de séchages et d'encapsulation nécessaires au greffage des sondes linéaires peuvent engendrer la dégradation et le

photoblanchiment du fluorophore, ce qui entraîne des performances en deçà de l'optimum en termes d'amplitude de fluorescence. Ainsi, les séchages ont été effectués à l'air en laissant évaporer l'eau déionisée après rinçage. De même, une attention particulière a été prise pour effectuer les étapes de greffage et d'encapsulation sans exposition à la lumière.

Ainsi, dans un premier temps, et comme décrit par Du *et al.*,³⁰ nous avons souhaité optimiser la densité de sondes greffées. Pour ce faire, et contrairement aux travaux présentés dans le chapitre 3, nous avons effectué une fonctionnalisation en une seule étape avec une solution de tampon TE 1X composé de phosphate de monopotassium (1 M) et contenant à la fois les sondes balises moléculaires et le MCE pendant 2h à température ambiante. Afin de faire varier la densité de sonde greffée en surface, nous avons fait varier la concentration en MCE à concentration en balise moléculaire constante (1 μ M). Afin de déterminer la concentration en MCE optimale, nous avons ensuite effectué une étape d'interaction avec la cible miR-21 pendant 2h à 40°C dans un tampon TE (Tris EDTA, 1x) contenant 500 mM de NaCl. Après rinçage de la surface avec de l'eau déionisée, la puce a été incubée pendant un temps supérieur à 10 minutes dans le tampon d'interaction, afin de permettre la reconstitution des balises moléculaires qui n'auraient pas interagi avec des cibles. Les images ont été prises pour un temps d'exposition de 100 ms et un binning de 4, ce qui correspond au groupement de 4 pixels afin de réduire au maximum le bruit électronique de la caméra.

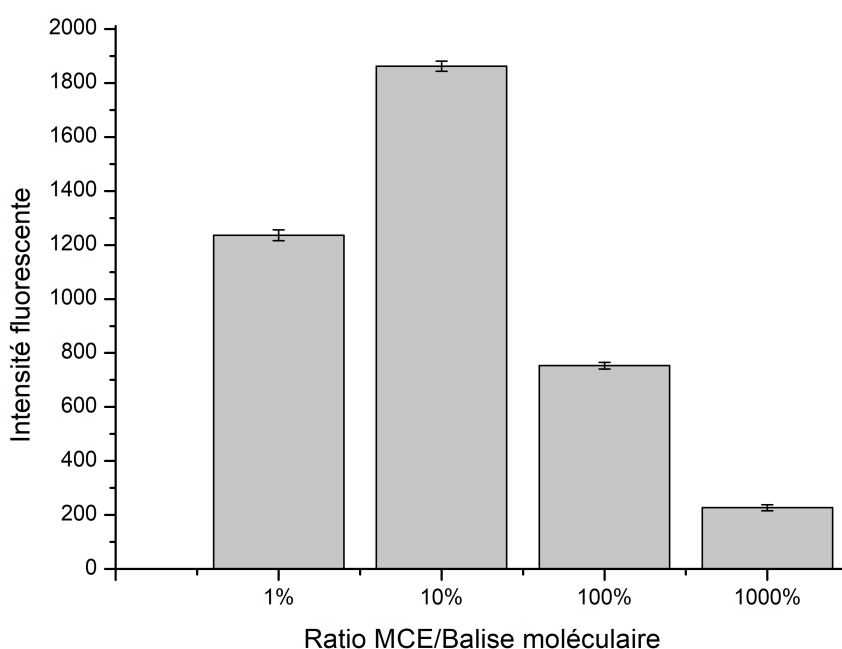


Figure 4-15 : variation du niveau d'hybridation pour des concentrations de MCE (0.01-0.1-1-10 μM) à une concentration en sondes constante (1 μM).

Nos résultats démontrent que l'efficacité de l'hybridation n'est pas optimale dans le cas d'une concentration trop faible en MCE (cf. Figure 4-15). Comme déjà rapporté dans la littérature, ceci pourrait être dû à une densité en sondes trop importante qui ne permet pas une ouverture idéale des balises moléculaires. A plus forte concentration de MCE (1 et 10 μM), la détection est négativement impactée en raison d'une densité en sondes trop faible. Nous mesurons qu'une concentration de 0,1 μM de MCE pour 1 μM de balises moléculaires (soit un rapport 10 entre les concentrations) permet d'atteindre des niveaux en fluorescence satisfaisants.

4.2.3.4. Influence de la température sur la détection de cibles miARNs

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité déterminer les conditions optimales pour permettre l'hybridation des séquences miR-21 synthétiques. Afin de faciliter l'association des cibles avec les balises moléculaires, nous avons étudié l'influence de la température sur l'ouverture des sondes, en présence du tampon d'interaction (TE 1X, 500 mM NaCl) (cf Figure 4-16), en augmentant la température de façon graduelle à une vitesse de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$.

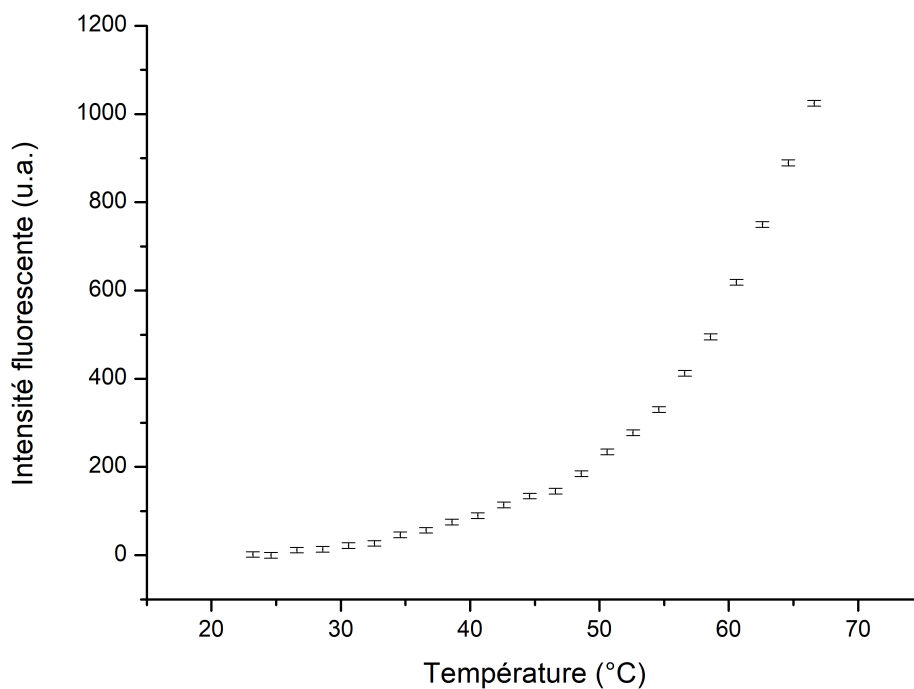


Figure 4-16 : variation en intensité fluorescente des balises moléculaires en température.

Les résultats présentés Figure 4-16 démontrent une augmentation exponentielle du signal en fluorescence du fait de l'ouverture des balises moléculaires en fonction de la température. Afin de limiter le bruit de fond tout en facilitant l'ouverture des balises moléculaires en présence des cibles miR-21, nous avons choisi de nous placer à une température de 40°C pour les expériences de détection décrites dans la suite du mémoire afin de limiter le bruit de fond à une valeur inférieure à 5% du signal à saturation après hybridation tout en favorisant la mise en place de l'interaction.

4.2.3.5. Dégradation de la fluorescence

La reproductibilité des expériences peut être impactée par le fait que les sondes soient marquées en fluorescence. En effet, il est possible de provoquer le photoblanchiment (i.e. une perte de fluorescence) des fluorophores du fait de leur excitation répétée. Pour vérifier ce point, la fluorescence des sondes après hybridation a été mesurée après excitation pendant 100 ms toutes les 10 s pendant 2000 secondes, soit une durée totale d'excitation de 20 s (cf. Figure 4-17).

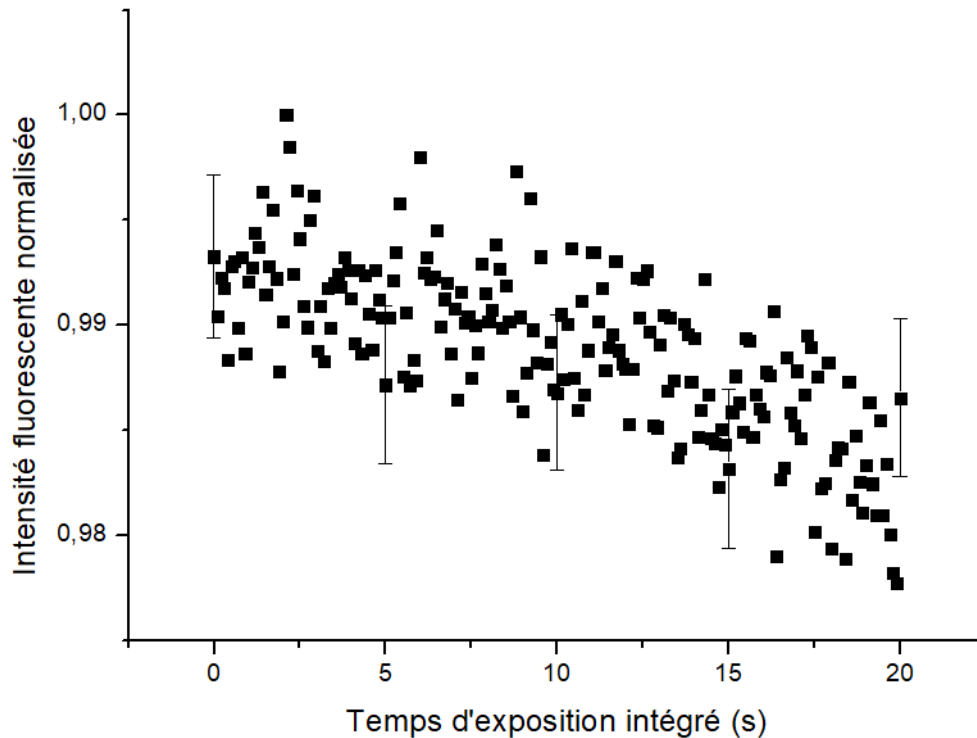


Figure 4-17 : photoblanchiment des sondes balises moléculaires pour un temps d'exposition de 100 ms toutes les 10 s pendant 2000 s soit un temps total d'exposition de 20 s.

On peut noter ici le très faible photoblanchiment des fluorophores, en raison du maintien de la fluorescence malgré les expositions répétées. Ce résultat valide la possibilité d'utiliser la même puce nanofluidique pour plusieurs expériences, car cette dernière peut être régénérée avec une solution de NaOH à une concentration de 100 mM pour dissocier les duplex formés. Cette étape doit être suivie d'une étape de rinçage avec du tampon TE contenant du chlorure de sodium à une concentration de 500 mM afin de permettre la restauration des balises moléculaires.

4.2.3.6. Détection de miARNs synthétiques non marqués

Nous avons ensuite entrepris de détecter miR-21 synthétique dans le tampon d'hybridation (TE, 500 mM NaCl) sans étape de marquage. Cette détection a été effectuée à 40°C, pour une pression appliquée de 25 mbar. Les images ont été acquises toutes les minutes avec un temps d'exposition de 100 ms et un objectif 10x.

Une gamme en concentration variant de 1 nM à 100 nM de miR-21 a été utilisée. Nous avons mesuré une saturation rapide du signal fluorescent dans le cas des concentrations les plus hautes. Une sensibilité limite de 1 nM après 20 minutes d'interaction a pu être atteinte dans ces conditions (cf. Figure 4-18). L'intensité de fluorescence a été mesurée sur l'ensemble de la surface du capteur afin d'obtenir un signal peu bruité. On remarque qu'ici également, les cinétiques mesurées ne correspondent pas à une concentration constante au-dessus du capteur.

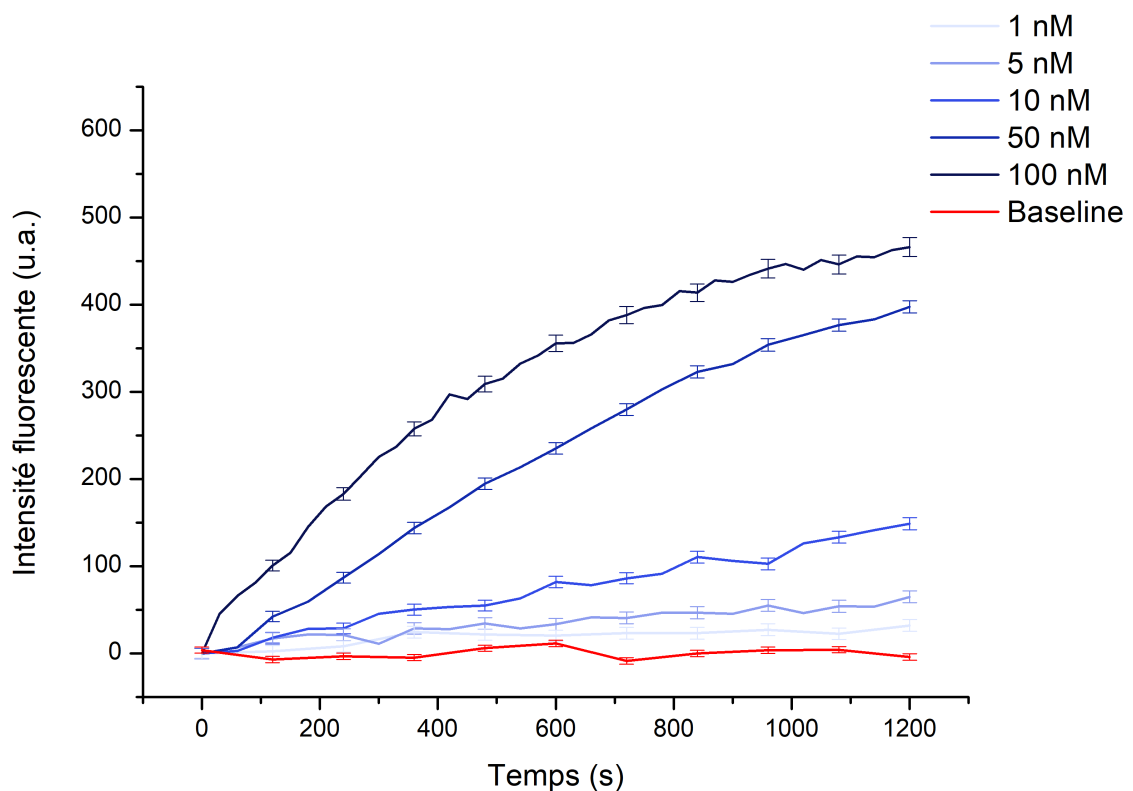


Figure 4-18 : gamme étalon de la capture de la séquence miR-21 avec des balises moléculaires pour des concentrations allant de 1 nM à 100 nM dans un tampon (TE 1X, 500 mM NaCl), une pression appliquée de 25 mbar et une température de 40°C. Le temps d'exposition était de 100 ms et un binning de 2 a été utilisé.

Il reste cependant possible d'améliorer la sensibilité de la plateforme en travaillant sur l'optique utilisée. En effet, l'utilisation d'un objectif à plus fort grossissement (20x ou 40x) tout en réduisant la pression appliquée afin d'avoir une interaction seulement en début de capteur pourrait améliorer la sensibilité du capteur. Un temps d'exposition plus long lors de l'acquisition des images pourrait aussi permettre d'atteindre une meilleure sensibilité, il faudrait cependant prendre garde au photoblanchiment potentiel des fluorophores des balises moléculaires qui pourrait altérer les niveaux

de fluorescence mesurés. Enfin, nous avons limité les manipulations à 20 minutes ; des temps d'interaction plus longs permettraient aussi une détection plus sensible. Tous ces points seraient donc à optimiser dans des travaux ultérieurs afin d'accroître les performances de la plateforme nanofluidique couplée à des balises moléculaires.

4.2.3.7. Détection dans de miARNs synthétique non marqués dans la salive

Enfin, nous avons effectué la détection de miARNs synthétiques dans un échantillon de salive dans les conditions pré-analytiques (inhibition RNase + choc thermique) préalablement décrites. La salive ainsi préparée a été diluée de moitié dans le tampon d'hybridation auquel le miR-21 synthétique non marqué a été ajouté à une concentration finale de 50 nM (cf. Figure 4-19).

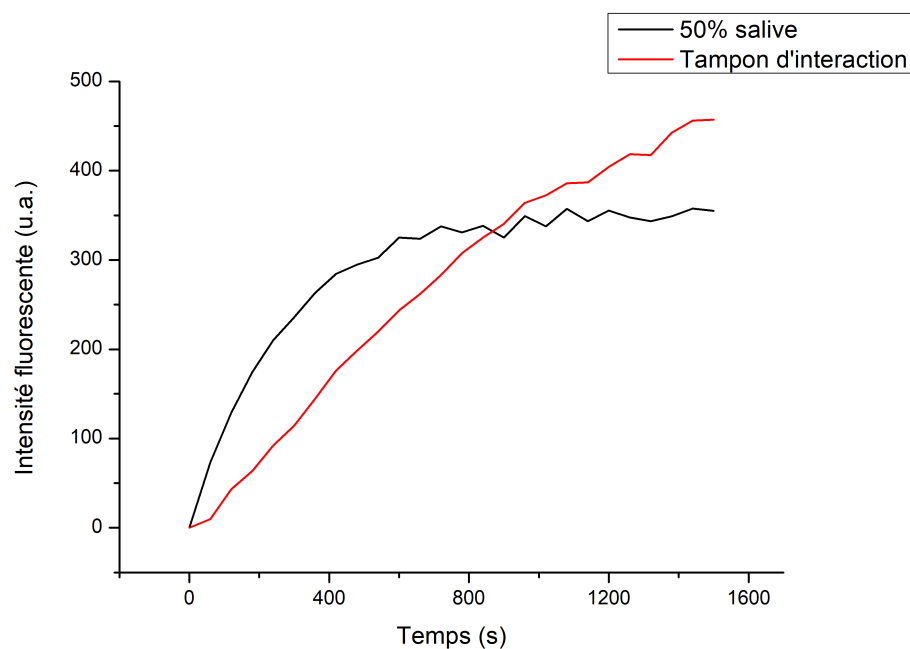


Figure 4-19 : cinétique d'hybridation dans un échantillon contenant 50% de salive et comparaison avec un tampon (TE 1X, 500 mM NaCl) pour une concentration en miR-21 de 50 nM, à une température de 40°C et pour une pression appliquée de 25 mbar. Le temps d'exposition était de 100 ms et un binning de 2 a été utilisé.

Nos résultats mettent en évidence une cinétique d'hybridation plus rapide dans le cas de l'échantillon contenant 50% de salive et des miR-21 synthétiques. Par contre, le niveau final de fluorescence atteint

est plus faible. Une explication possible à ces observations viendrait du fait que des éléments présents dans la salive pourraient écranter l'interaction, c'est-à-dire réduire la constante d'association du duplex, et, par conséquent, leur formation. Dans ce cas, une densité plus faible de sonde est hybridée, ce qui permettrait d'expliquer ces deux observations. Cependant, nous démontrons ici la compatibilité de notre méthode de détection avec des fluides complexes.

4.2.4. Quelle attitude adopter pour détecter et quantifier les miARNs endogènes

Suite aux différentes observations faites dans les parties précédentes, il apparaît évident que la détection de miARNs endogènes avec des balises moléculaires semble la plus adaptée. Cette approche permet en effet une détection de la séquence sans préparation d'échantillon lourde et chronophage, en absence de réactions enzymatiques. L'utilisation de balises moléculaires permet, de plus, d'effectuer la détection dans des échantillons moins purifiés, ce qui n'est pas le cas si une étape de marquage est nécessaire. Dernier point négatif, l'efficacité de marquage est très dépendante de la quantité d'ARN total, et du niveau d'intégrité des séquences en solutions.

4.3. Dosage des miARNs dans des extraits de lignées cellulaires

Nous souhaitons, dans cette dernière partie, démontrer la possibilité de détecter des miARNs endogènes avec la plateforme nanofluidique couplée à une fonctionnalisation de surface avec des balises moléculaires. Les échantillons étudiés, des extraits de cultures cellulaires, ont dans un premier temps été caractérisés en RT-qPCR.

4.3.1. Gamme étalon et sensibilité de la RT-qPCR

Dans un premier temps nous avons réalisé une courbe étalon de dosage des miARNs par RT-qPCR, puis avons déterminé le taux intracellulaire de miR-21 selon la même approche.

4.3.1.1. Gamme étalon et réflexions sur la sensibilité de la RT-qPCR

Dans un premier temps, une courbe étalon a été réalisée avec des concentrations de miR-21 connues, variant de 10 fM à 1 nM (cf. Figure 4-20). Cette caractérisation permettra, par la suite, de déterminer la concentration de la séquence miR-21 dans des extraits biologiques par RT-qPCR, et de corrélérer ces résultats avec ceux obtenus à l'aide de la plateforme nanofluidique.

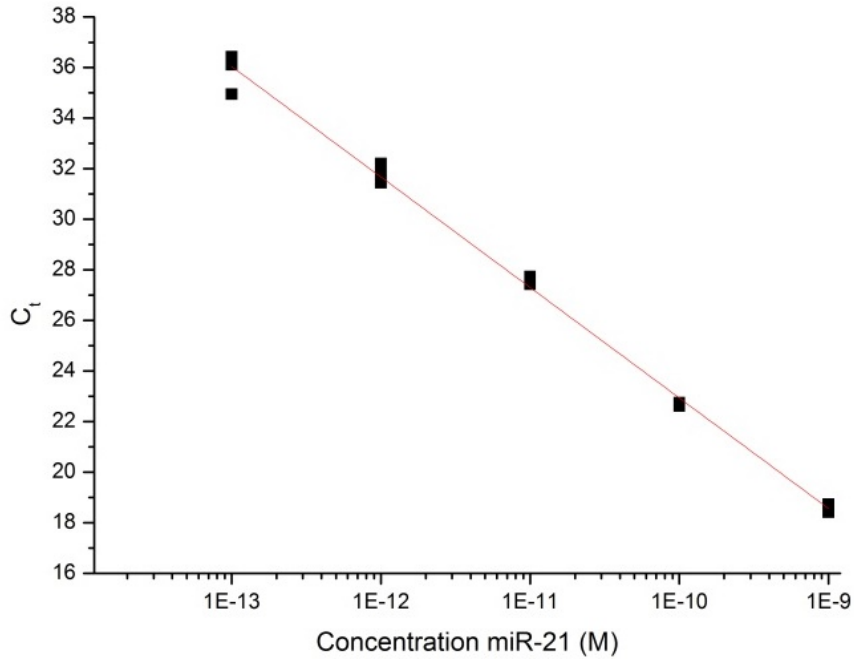


Figure 4-20 : gamme étalon entre le nombre de cycles de PCR nécessaire à la détection et la concentration en miR-21 dans l'échantillon.

On note ici une relation exponentielle inverse de la concentration en séquence miR-21 et le nombre de cycles d'amplification nécessaires à sa détection. La limite de détection de la RT-qPCR est de 10 fM dans ces conditions. Il est important de souligner ici le fait que l'échantillon de départ a été dilué plusieurs fois avant sa détection à proprement parler. Si la transcription inverse présente un rendement idéal de 100%, ce qui est usuellement admis, alors miR-21 présent à une concentration initiale de 10 fM avant la RT sera dilué à une concentration de 10 aM dans le mélange réactionnel final avant détection. Ce chiffre est intéressant car il signifie que dans ce volume de 10 μ L, seulement 60 molécules seront présentes en solution. On comprend donc la grande difficulté à détecter des miARNs en plus faible concentration car la probabilité de rencontrer une molécule dans le mélange réactionnel devient faible. On remarque aussi que la RT-qPCR est peu limitée par l'amplification. Ce sont les différentes étapes de dilution, nécessaires à la mise en place des réactions enzymatiques, qui rendent impossible la détection d'une concentration plus faible en miR-21.

4.3.1.2. Protocole expérimental

La première étape consiste à effectuer une RT (pour transcription inverse, *reverse transcriptase*) de la séquence miARN en ADNc (ADN complémentaire). Pour ce faire, 2 µL d'échantillon, correspondant à 10 ng d'ARN total, sont ajoutés à un mélange réactionnel contenant les sels et produits nécessaires à la RT (enzymes, base azotée, etc.). Selon la concentration en ARN total de l'extrait, il sera donc nécessaire d'effectuer une dilution si ce dernier est trop concentré. Le volume final de réaction est de 10 µL (cf. Figure 4-21).

Reagent	Volume (µL), RT reaction
5x Reaction buffer	2
Nuclease-free water	4.5
Enzyme mix	1
Synthetic RNA spike ins, optional replace with H ₂ O if omitted	0.5
Template total RNA (5 ng/µL)	2
Total volume	10

Figure 4-21 : protocole pour la réaction de RT.

Suite à cette étape de RT, la détection par amplification d'une séquence miARN spécifique peut être mise en place via une amplification par PCR couplée à une détection en fluorescence comme décrit dans le chapitre 1. Suivant ce protocole, l'ADNc de la RT est dilué 200 fois dans le mélange réactionnel (enzyme, amorces, etc.) (cf. Figure 4-22).

Reagent	Volume (µL), 96/384-well plate, tubes or strips
PCR Master mix	5
PCR primer set ⁴⁾	1
Diluted cDNA template	4
Total volume	10

Figure 4-22 : protocole pour la réaction d'amplification.

4.3.2. Dosage du miR-21 dans des extraits de cellules

Nous avons choisi d'étudier des échantillons de lignées cellulaires modèles du cancer du pancréas et utilisés en routine dans notre équipe, qu'elles soient d'origine humaine (Mia PACA-2), ou murines (R211, PKP16).

4.3.2.1. Protocole d'extraction

Pour permettre le dosage en RT-qPCR, il est nécessaire de procéder à l'extraction des ARNs présents dans les cellules en culture. Dans un premier temps, les cellules sont trypsinées afin de les décoller entre elles et de leur support plastique de culture, puis comptées à l'aide du ZI Coulter. En fonction de la quantité désirée, le volume de cellule nécessaire est prélevé afin de travailler avec un nombre constant de cellules. Une étape de centrifugation (1500 rpm, 5 minutes) suivi de l'élimination du surnageant permet de culotter le matériel cellulaire, qui sera repris dans 50 μ L de PBS et conservé le cas échéant à -20°C pour un court laps de temps, ou à -80°C pour un stockage à long terme. Une étape d'extraction au phénol-chloroforme est ensuite mise en place, puis la phase aqueuse contenant les ARNs est purifiée à l'aide d'une colonne de silice, comme préalablement décrit. Les ARNs sont finalement élués dans 50 μ L d'eau déionisée sans RNases. On peut souligner le fait que ces étapes d'extraction nécessitent un temps de manipulation de l'ordre de 2h pour un utilisateur expérimenté.

La quantité d'ARN total ainsi extraite est dosée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop, Thermo Scientific). On note dans le cas de cultures cellulaires des quantités en ARN total très importantes, variant de 100 ng/ μ L jusqu'à plus de 1 μ g/ μ L. La réaction de RT est pratiquée à quantité d'ARN total constante, ce qui peut alors nécessiter des dilutions, avant la quantification de miR-21, comme nous l'avons déjà décrit. Ainsi les données présentées ci-après sont pour des quantités en ARN total constantes.

4.3.2.2. Dosage et concentration estimée

A l'aide la courbe de calibration présentée ci-dessus, il nous est possible d'estimer au plus près la concentration en miR-21 à partir du nombre de cycle mesurés en PCR. Nous présentons ici les résultats

bruts (cf. Figure 4-23, colonnes rouges) ainsi que les résultats réels calculés après application du facteur de dilution pratiqué lors de la RTqPCR (cf. Figure 4-23, colonnes noires).

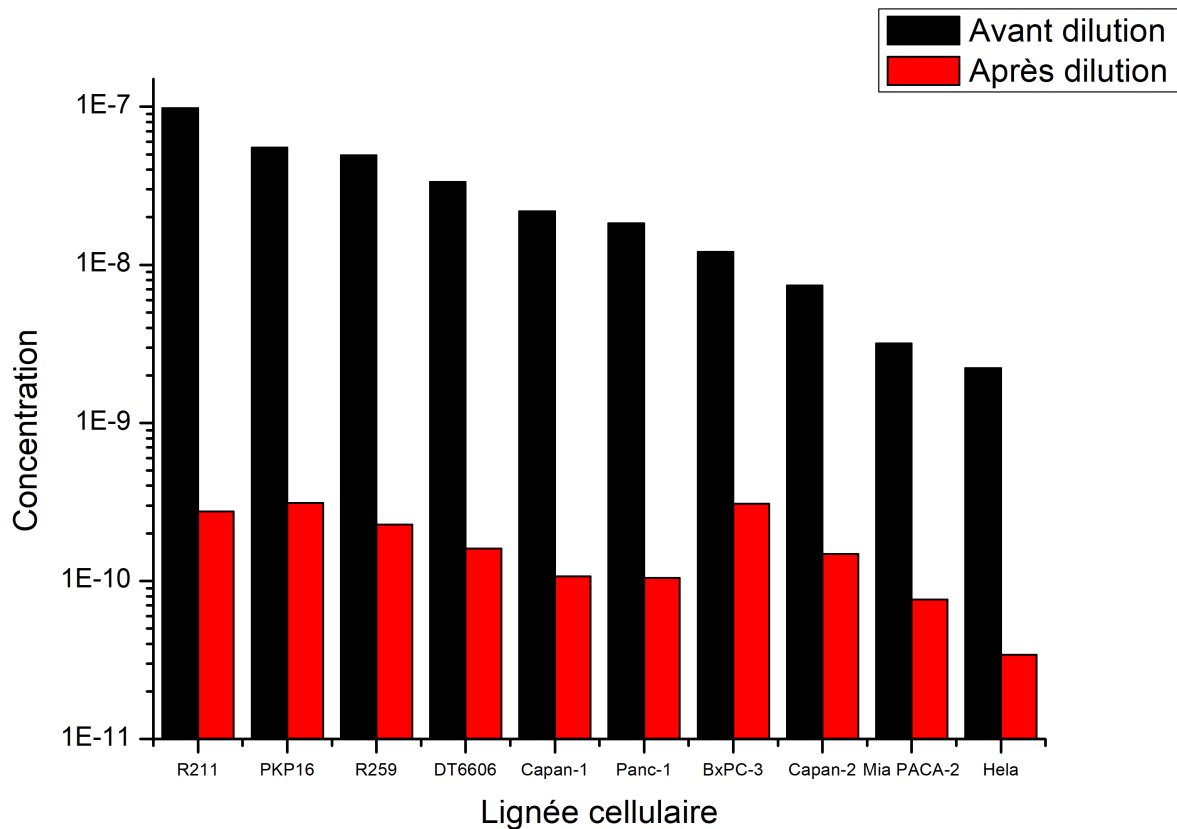


Figure 4-23 : concentration en miR-21 estimée à l'aide de la courbe étalon pour différentes lignées cellulaires modèles du cancer du pancréas avant et après dilution lors des étapes de préparation inhérentes à la RT-qPCR.

La sensibilité de la plateforme nanofluidique a été évaluée à 1 nM pour un temps d'exposition de 100 ms. Les quantifications effectuées nous permettent donc de conclure que l'approche nanofluidique a les performances requises pour détecter la séquence miR-21 à partir des échantillons non dilués. La mise en place de la détection restera, *a priori*, un challenge avec des échantillons dilués à 5 ng/μL car la concentration en miR-21 dans ce cas est réduite considérablement à des niveaux de l'ordre de la centaine de picomolaire.

4.3.2.3. Détection des extraits cellulaires en nanofluidique avec des balises moléculaires

Les premières expériences ont donc été mises en place avec la plateforme nanofluidique. Ainsi, l'extrait provenant de la lignée PKP16, que nous avons sélectionné en raison de la forte concentration de miR-21 dans ces cellules, a été soumis à une détection de cette cible en nanofluidique. En témoin positif, nous avons utilisé le miR-21 synthétique à concentration connue (cf. Figure 4-24).

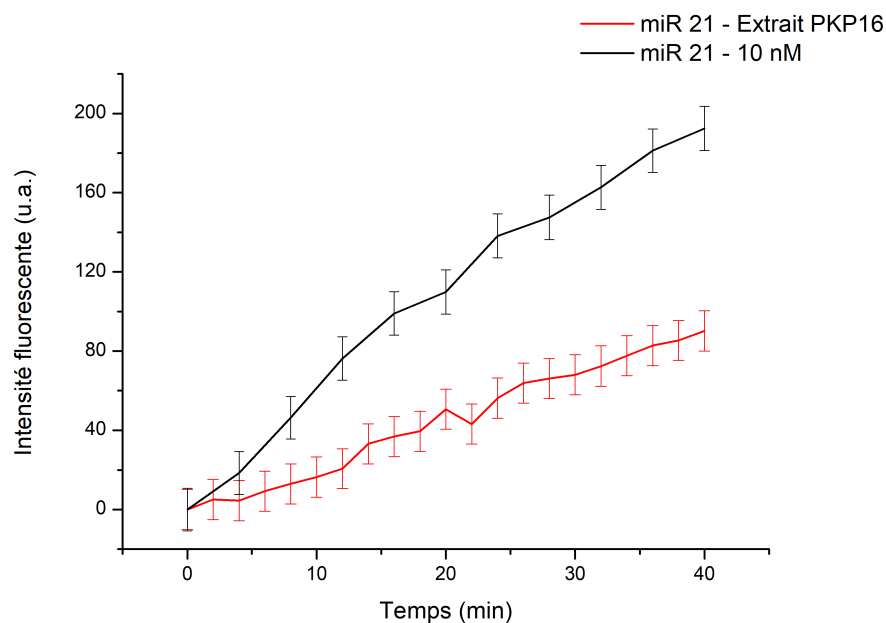


Figure 4-24 : détection en nanofluidique de la séquence miR-21 présente dans l'extrait provenant de la lignée PKP16 et comparaison avec un échantillon à une concentration connue de 10 nM.

Pour rendre possible la détection en nanofluidique, nous avons préalablement ajusté la concentration saline de l'échantillon cellulaire (9 μ L d'extrait + 1 μ L de tampon TE 10x contenant 5 M de chlorure de sodium). Lors de ces nouvelles expériences, le temps d'exposition a été augmenté jusqu'à 800 ms afin d'améliorer notre niveau de signal sur bruit ; de plus le binning a été réduit à 2 pour éviter la saturation de la caméra. Les images ont été acquises toutes les 2 ou 4 minutes.

Nos résultats démontrent que ce système nanofluidique est capable de détecter et de quantifier la séquence miR-21 endogène dans des ARNs totaux extraits de cellules cancéreuses pancréatiques. En référence au témoin utilisé, notre méthode de quantification absolue mesure une concentration en miR-21 de l'ordre de 5 nM, alors que ce dernier a été estimé à 55 nM via la RT-qPCR dans ce même échantillon. Ce résultat suggère que les mesures de la RTqPCR sont en partie biaisées par la non

spécificité relative de l'approche, qui est connue pour être favorisée par la présence d'ARNs totaux dans la réaction,³⁵ mais également par la nécessité pour cette approche de procéder à des cycles d'amplifications qui sont des sources d'erreurs et de dérives expérimentales.

Conclusion du chapitre 4

Dans ce chapitre, nous avons étudié les effets d'une préparation d'échantillon sur l'intégrité des miARNs. Nos résultats suggèrent également que les miARNs sont rarement retrouvés libres dans des biofluides tels que la salive ou le plasma. Nous avons proposé un protocole dédié, simple, efficace et compatible avec la détection à l'aide de la plateforme nanofluidique.

Des efforts importants ont été mis en place pour permettre la détection de cibles endogènes en fluorescence. La première approche étudiée consiste à marquer les cibles en solutions, les limites de cette méthode sont discutées et nous avons, par la suite, choisi d'utiliser des sondes greffées en surface de type balise moléculaire. La versatilité et les performances des balises moléculaires sont démontrés, c'est donc vers ce choix que nous nous sommes tournés pour progresser vers la détection de miARNs endogènes.

Enfin, une étude des niveaux de miR-21 a été mise en place en RT-qPCR. Plusieurs lignées cellulaires modèles du cancer du pancréas ont été étudiées et caractérisées. Enfin, nous avons démontré la capacité de la plateforme nanofluidique à détecter miR-21 endogène dans une lignée cellulaire modèle du cancer du pancréas (PKP16).

Références du chapitre 4

1. Duy, J., Koehler, J. W., Honko, A. N. & Minogue, T. D. Optimized microRNA purification from TRIzol-treated plasma. *BMC Genomics* **16**, (2015).
2. El-Khoury, V., Pierson, S., Kaoma, T., Bernardin, F. & Berchem, G. Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
3. Cheng, L., Sharples, R. A., Scicluna, B. J. & Hill, A. F. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J. Extracell. Vesicles* **3**, (2014).
4. Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. & Illei, G. G. The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. *PLOS ONE* **7**, e30679 (2012).
5. Lee, F. S., Shapiro, R. & Vallee, B. L. Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor. *Biochemistry (Mosc.)* **28**, 225–230 (1989).
6. Kobe, B. & Deisenhofer, J. Mechanism of Ribonuclease Inhibition by Ribonuclease Inhibitor Protein Based on the Crystal Structure of its Complex with Ribonuclease A. *J. Mol. Biol.* **264**, 1028–1043 (1996).
7. Haigis, M. C., Kurten, E. L., Abel, R. L. & Raines, R. T. KFERQ sequence in ribonuclease A-mediated cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **277**, 11576–11581 (2002).
8. Mariner, P. D., Korst, A., Karimpour-Fard, A., Stauffer, B. L., Miyamoto, S. D. & Sucharov, C. C. Improved Detection of Circulating MiRNAs in Serum and Plasma Following Rapid Heat/Freeze Cycling. *MicroRNA Shariqah United Arab Emir.* (2018). doi:10.2174/2211536607666180416152112
9. Denmat, M. L., Anton, M. & Gandemer, G. Protein Denaturation and Emulsifying Properties of Plasma and Granules of Egg Yolk as Related to Heat Treatment. *J. Food Sci.* **64**, 194–197 (1999).
10. Anton, M. & Gandemer, G. Composition, Solubility and Emulsifying Properties of Granules and Plasma of Egg Yolk. *J. Food Sci.* **62**, 484–487 (1997).
11. Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., Liang, M., Dittmar, R. L., Liu, Y., Liang, M., Kohli, M., Thibodeau, S. N., Boardman, L. & Wang, L. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* **14**, 319 (2013).
12. Rekker, K., Saare, M., Roost, A. M., Kubo, A.-L., Zarovni, N., Chiesi, A., Salumets, A. & Peters, M. Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling. *Clin. Biochem.* **47**, 135–138 (2014).
13. Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J. & Mi, S. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **13**, 17–24 (2015).
14. Rauber, N. R., Jany, K. D. & Pfeleiderer, G. Ribonuclease A digestion by proteinase K. *Z. Naturforsch. [C]* **33**, 660–663 (1978).
15. Wang, S., Gong, G., Su, H., Liu, W., Wang, Z. & Li, L. Self-assembly of plasma protein through disulfide bond breaking and its use as a nanocarrier for lipophilic drugs. *Polym. Chem.* **5**, 4871–4874 (2014).
16. Qu, K., Zhang, X., Lin, T., Liu, T., Wang, Z., Liu, S., Zhou, L., Wei, J., Chang, H., Li, K., Wang, Z., Liu, C. & Wu, Z. Circulating miRNA-21-5p as a diagnostic biomarker for pancreatic cancer: evidence from comprehensive miRNA expression profiling analysis and clinical validation. *Sci. Rep.* **7**, 1692 (2017).

17. Wang, P., Zhuang, L., Zhang, J., Fan, J., Luo, J., Chen, H., Wang, K., Liu, L., Chen, Z. & Meng, Z. The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of advanced pancreatic cancer, and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL. *Mol. Oncol.* **7**, 334–345 (2013).
18. Giovannetti, E., Funel, N., Peters, G. J., Chiaro, M. D., Erozcenci, L. A., Vasile, E., Leon, L. G., Pollina, L. E., Groen, A., Falcone, A., Danesi, R., Campani, D., Verheul, H. M. & Boggi, U. MicroRNA-21 in Pancreatic Cancer: Correlation with Clinical Outcome and Pharmacologic Aspects Underlying Its Role in the Modulation of Gemcitabine Activity. *Cancer Res.* **70**, 4528–4538 (2010).
19. Humeau, M., Vignolle-Vidoni, A., Sicard, F., Martins, F., Bournet, B., Buscail, L., Torrisani, J. & Cordelier, P. Salivary MicroRNA in Pancreatic Cancer Patients. *PLOS ONE* **10**, e0130996 (2015).
20. Technical Support Documentation | NanoString Technologies. *SITE* at <<https://www.nanostring.com/support/product-support/support-documentation>>
21. Qavi, A. J., Kindt, J. T., Gleeson, M. A. & Bailey, R. C. Anti-DNA:RNA Antibodies and Silicon Photonic Microring Resonators: Increased Sensitivity for Multiplexed microRNA Detection. *Anal. Chem.* **83**, 5949–5956 (2011).
22. Wang, H., Ach, R. A. & Curry, B. Direct and sensitive miRNA profiling from low-input total RNA. *RNA* **13**, 151–159 (2007).
23. Steel, A. B., Levicky, R. L., Herne, T. M. & Tarlov, M. J. Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophys. J.* **79**, 975–981 (2000).
24. Mhlanga, M. M. & Tyagi, S. Using tRNA-linked molecular beacons to image cytoplasmic mRNAs in live cells. *Nat. Protoc.* **1**, 1392–1398 (2006).
25. Wang, T.-H., Peng, Y., Zhang, C., Wong, P. K. & Ho, C.-M. Single-Molecule Tracing on a Fluidic Microchip for Quantitative Detection of Low-Abundance Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5354–5359 (2005).
26. Xi, C., Raskin, L. & Boppart, S. A. Evaluation of Microfluidic Biosensor Development Using Microscopic Analysis of Molecular Beacon Hybridization Kinetics. *Biomed. Microdevices* **7**, 7–12 (2005).
27. Tyagi, S. & Kramer, F. R. Molecular Beacons in Diagnostics. *F1000 Med. Rep.* **4**, (2012).
28. Baker, M. B., Bao, G. & Searles, C. D. In vitro quantification of specific microRNA using molecular beacons. *Nucleic Acids Res.* **40**, e13 (2012).
29. Du, H., Disney, M. D., Miller, B. L. & Krauss, T. D. Hybridization-Based Unquenching of DNA Hairpins on Au Surfaces: Prototypical ‘Molecular Beacon’ Biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4012–4013 (2003).
30. Du, H., Strohsahl, C. M., Camera, J., Miller, B. L. & Krauss, T. D. Sensitivity and Specificity of Metal Surface-Immobilized ‘Molecular Beacon’ Biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 7932–7940 (2005).
31. Cederquist, K. B. & Keating, C. D. Hybridization Efficiency of Molecular Beacons Bound to Gold Nanowires: Effect of Surface Coverage and Target Length. *Langmuir* **26**, 18273–18280 (2010).
32. Paleček, E. Surface-attached molecular beacons light the way for DNA sequencing. *Trends Biotechnol.* **22**, 55–58 (2004).
33. Tsourkas, A., Behlke, M. A., Rose, S. D. & Bao, G. Hybridization kinetics and thermodynamics of molecular beacons. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1319–1330 (2003).
34. Marras, S. A. E., Kramer, F. R. & Tyagi, S. Genotyping SNPs with molecular beacons. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **212**, 111–128 (2003).

35. Ruiz-Villalba, A., van Pelt-Verkuil, E., Gunst, Q. D., Ruijter, J. M. & van den Hoff, M. J. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomol. Detect. Quantif.* **14**, 7–18 (2017).

Conclusion générale et perspectives

La prise en charge du cancer du pancréas bénéficierait grandement de nouvelles modalités permettant un diagnostic précoce, à un stade où la maladie ne présente pas de métastases et pour lequel des solutions thérapeutiques existent. Il paraît difficile de mettre en place des campagnes de dépistage, mise à part dans les groupes dits à risque (patients atteints de pancréatite et familles à risque héréditaire) compte tenu de la rareté relative de ces tumeurs dans la population générale. En absence de symptômes spécifiques pour ce cancer, les tumeurs du pancréas sont souvent découvertes de manière fortuite, puis confirmées grâce à l'imagerie médicale couplée à l'analyse de tissus issus de biopsies.

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de biomarqueurs dont la spécificité et la sensibilité permettent un diagnostic précoce. On retiendra cependant l'utilité clinique de la mutation activatrice de l'oncogène KRAS pour le diagnostic différentiel cancer du pancréas vs la pancréatite pseudotumorale, et l'utilisation du marqueur sang CA19.9 pour le suivi de la maladie ou de la réponse au traitement. Dans ce contexte, notre équipe de recherche au CRCT a démontré que l'expression des miARNs est altérée dans le cancer du pancréas, notamment dans les stades précoces, ou en réponse à un traitement innovant de thérapie génique anticancéreuse. De plus, nous avons été capables de quantifier certains miARNs candidats non seulement dans les tissus, mais également dans le sang et la salive des patients. Malgré un intérêt certain, ces biomarqueurs ne sont pas encore utilisés en pratique clinique courante. Ceci peut s'expliquer en partie par l'absence de standardisation pour la quantification de ces molécules en clinique.

Ce travail de thèse a été l'occasion de mettre à jour des biais à tous les niveaux de l'analyse standard des miARNs, du prélèvement jusqu'à la méthode de détection à proprement parler, en passant par les différentes phases d'extraction et de purification de l'échantillon. De plus, ces méthodes d'analyse sont coûteuses, ce qui limite leur transfert vers la clinique. C'est dans ce cadre que nous avons décidé de développer un dispositif nanofluidique portable couplé à une détection par microscopie en fluorescence afin de quantifier et qualifier la présence de séquences miARNs spécifiques dans les échantillons biologiques, avec comme objectif d'accélérer le transfert vers la clinique courante.

Plusieurs résultats marquants ont pu être établis au cours de cette thèse. Tout d'abord, nous avons démontré, via la mise en place d'un modèle de simulation par dynamique moléculaire à une dimension, l'originalité d'une approche en nanofluidique pour étudier l'accroche des miARNs sur une surface fonctionnalisée. On mesure, dans le cas d'un régime fluide limité par la convection, une hybridation

concentrée en début de capteur. Ce résultat est dû à la réduction de la hauteur de canal à une échelle nanométrique, qui rend alors la vitesse de diffusion des molécules ciblées jusqu'à la surface très courte et permet, par conséquent, d'atteindre des taux de capture proches de 100%.

Les prédictions effectuées ont, de plus, pu être validées expérimentalement. Nos travaux, publiés dans le journal *ACS sensors*, démontrent la possibilité de déterminer l'affinité des duplex miARNs/ADN sondes formés par mesure en fluorescence du profil d'hybridation le long du capteur. Cette méthode d'analyse nous permet de discriminer très rapidement (~ 10 min) la présence d'une différence de nucléotide sur la séquence cible et, ce, en une seule étape d'association (c'est-à-dire sans rinçage de la surface) après optimisation du design de la séquence sonde et ajustement de la température d'interaction.

Par la suite, nous nous sommes concentrés sur l'étude de différentes approches de préparation d'échantillon, mais aussi de détections en fluorescence, optimisées et compatibles avec notre plateforme nanofluidique afin de rendre possible la quantification et la qualification de miARNs endogènes, au plus près des applications biologiques et cliniques, et ce en maintenant un objectif avoué de mode préparatoire minimal. Nous avons, dans ce sens, mis en place un protocole de préparation d'échantillon compatible avec une détection en micro et nanofluidique et qui permet d'éviter toute perte de miARNs. Nous avons, de plus, établi la compatibilité de notre plateforme avec la détection de séquences miARNs non marquées directement dans de la salive diluée à 50%. Ces résultats sont importants car nous démontrons ici que, contrairement à la RT-qPCR, nous ne sommes pas limités par la pureté d'échantillon. Ceci est dû au fait que notre approche ne nécessite aucune réaction enzymatique. De plus, le couplage des sondes de type balise moléculaire avec notre système a été retenu dans le but de garantir une grande versatilité et des performances permettant l'étude d'échantillons biologiques pertinents en temps réel et sans marquage. Nous avons ainsi démontré la possibilité de détecter miR 21 dans des extraits de lignée cellulaire modèle du cancer du pancréas (PKP16), avec un temps d'analyse réduit et sans transcription inverse des séquences, le tout en consommant une quantité d'ARN total très faible (de l'ordre de 1-10 pg d'ARN total).

Ces résultats ont été comparés avec l'approche standard de RT-qPCR. Après étalonnage à l'aide d'une courbe étalon, nous rapportons des disparités dans les niveaux mesurés entre la RT-qPCR et la plateforme nanofluidique pour un même extrait cellulaire. En effet, la concentration mesurée avec la RT-qPCR est supérieure d'un facteur 10 par rapport au résultat en quantification absolue obtenu avec notre approche. Bien que ces données doivent être confirmées pour d'autres miARNs, ce résultat suggère que les mesures obtenues à l'aide de la RTqPCR peuvent être en partie surestimées en raison

d'ARNs totaux présents dans la réaction, mais également en raison des cycles d'amplifications inhérents à cette méthode.

Les premiers résultats obtenus avec notre plateforme reposant sur l'utilisation de balises moléculaires suggèrent une sensibilité en adéquation avec la détection de miR-21 dans les ARNs purifiés à partir de tumeurs. Au contraire, il semble que la sensibilité de notre dispositif ne permette pas d'obtenir une quantification robuste de l'expression des miARNs dans le plasma et la salive. Bien que cela reste à confirmer expérimentalement, nous avons pris les devants et déjà envisagés deux approches afin d'améliorer la sensibilité de notre plateforme.

La première réside dans la préparation de l'échantillon clinique. Pour les biologistes, le niveau de pureté est le point essentiel avant analyse de l'échantillon. Cela vient du fait que les méthodes standards de détection nécessitent des étapes d'amplification par réactions enzymatiques. Les protocoles d'extraction utilisés ne sont donc pas optimisés pour récupérer une quantité d'échantillon maximale. On peut souligner ici que malgré les différentes étapes de purification, les échantillons ainsi extraits sont souvent trop concentrés pour une détection en RT-qPCR et il est donc nécessaire de les diluer. Dans notre cas, la détection est directe, i.e. sans amplification, il est donc indispensable que l'échantillon à analyser soit le plus concentré possible. La méthode d'extraction mise en place dans le dernier chapitre est un premier pas vers une préparation d'échantillon minimale permettant d'éviter toute perte de miARNs ; encore faudrait-il s'assurer expérimentalement qu'elle permette d'accéder à toutes les molécules de l'échantillon. Il serait, par la suite, astucieux de travailler sur la concentration de l'échantillon. Il existe dans le commerce des colonnes qui permettent la récupération du matériel biologique dans des volumes de solution très faibles comme le RNeasy MinElute Cleanup Kit. Au LAAS-CNRS, une technologie microfluidique permettant la concentration et la séparation de séquences oligonucléotides a été mise en place. La concentration s'effectue via l'application d'un champ électrique opposé à un flux de solution dans des liquides viscoélastiques.¹ Il serait très intéressant de développer cette technologie pour concentrer les miARNs dans l'optique de la coupler à notre plateforme nanofluidique.

Afin de permettre, à moyen terme, la détection des miARNs directement dans les fluides complexes (plasma, salive, urine, etc.) plusieurs verrous technologiques (essentiellement en termes d'intégration) devront être débloqués. Tout d'abord, nous savons que la plupart des miARNs circulants ne sont pas libres dans les biofluides, il faudra donc mettre en place, sur puce, un étage permettant leur libération compatible avec l'échantillon analysé et l'étape de détection. On peut citer ici les travaux de Richards *et al.* qui ont réalisé la lyse d'exosomes directement sur puce.² Cependant, leur méthode de détection électrique n'autorise pas la manipulation de fluides complexes. Ainsi, l'influence de l'environnement

du milieu sur les étapes de préparation ainsi que la détection finale devra être étudiée avec précaution. La mise en place d'interactions non spécifiques dues au milieu environnant complexe pourrait, en effet, modifier la lecture finale selon l'origine de l'échantillon. Ces différents points seront donc à étudier en détail.

Le second point à aborder dans le but de doser les biomarqueurs miRNAs dans les biopsies liquide concerne l'amélioration de la sensibilité de notre plateforme. Dans notre cas, et dans un premier temps, il serait intéressant de travailler sur l'optimisation de la détection optique afin de repousser la limite de détection en fluorescence (objectif utilisé, temps d'exposition, gain, etc.). On peut noter que les expériences de détection de miARNs endogènes effectuées dans ces travaux de thèse ont été mises en place dans des conditions très souples pour l'expérimentateur : objectif 10x, temps d'exposition inférieur à 1s pour éviter le photoblanchiment des balises moléculaires, absence de gain, etc.

Pour gagner en sensibilité, il serait aussi envisageable de changer notre mode de transduction et de faire appel aux capteurs microfabriqués issus de la microélectronique. Notre équipe MEMS au LAAS-CNRS développe des microsystèmes électromécaniques dans le but de réaliser une reconnaissance biologique avec des sensibilités excellentes. Ces dispositifs peuvent être assimilés à des microbalances qui permettent la détection d'ajout de masse très faible en surface. En effet, les équipes leader dans le domaine ont récemment démontré la possibilité détecter la présence d'une molécule unique sur des leviers mis en vibration sous vide.³

Le mode opératoire permettant d'atteindre les meilleures sensibilités est d'utiliser ces systèmes dans des régimes dynamiques, c'est-à-dire en vibration. On mesure alors un changement de fréquence de résonance dû à l'ajout de masse sur la surface du résonateur. En d'autres termes, lorsque des molécules cibles sont capturées, la masse augmente et on observe une baisse de la fréquence de résonance (cf. Figure C-1). La grande force de ces dispositifs est qu'ils sont très sensibles et intégrables, c'est à dire que la mesure ne nécessite plus l'utilisation de la microscopie en fluorescence mais se fait par simple mesure électrique via une connexion à un ordinateur.

Cette méthode de transduction a été explorée lors de cette thèse et les premiers dispositifs MEMS ont été réalisés. Malheureusement, la description détaillée de ces travaux n'a pas pu trouver de place dans ce mémoire faute de résultats pertinents, i.e. de détection biologique concrète. De plus, des défis supplémentaires tels que l'intégration de ces capteurs dans des systèmes micro et nanofluidiques restent encore à traiter. Ces travaux préliminaires pourront faire office de support pour une future thèse.

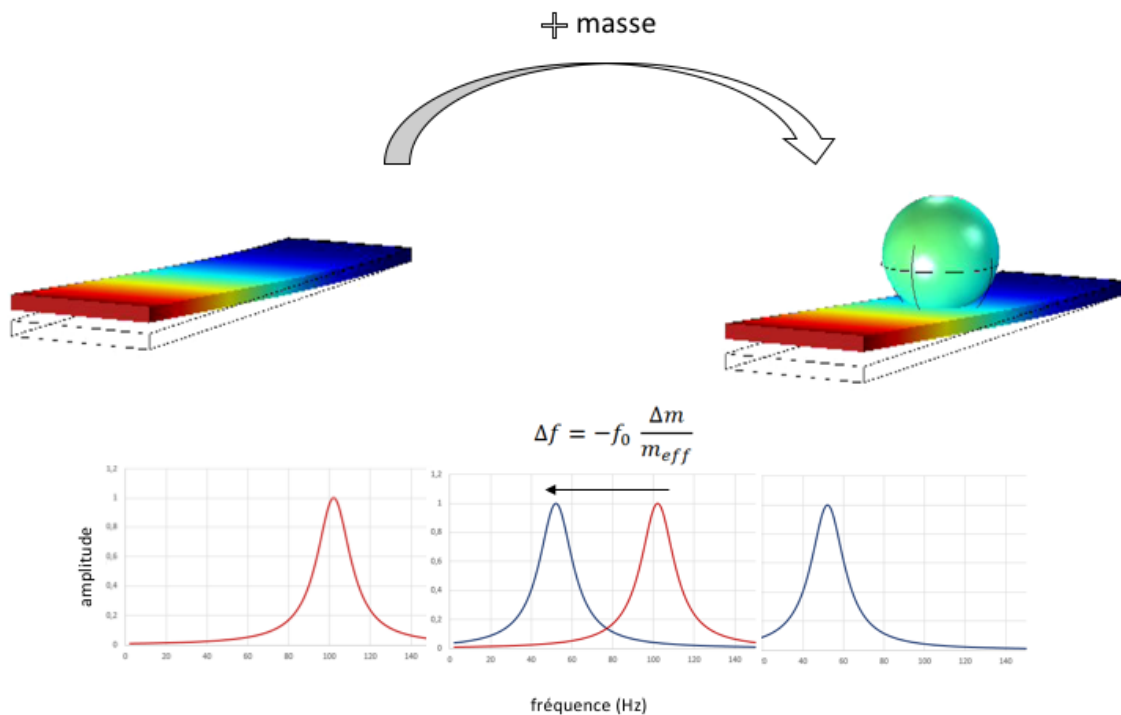


Figure C-1 : principe de détection MEMS, on observe un décalage de la fréquence de résonance (Δf) directement proportionnel à la masse effective du résonateur (m_{eff}) et sa fréquence de résonance avant (courbe rouge) et après un ajout de masse Δm (courbe bleue).

La possibilité de détecter plusieurs cibles à la fois est une autre question d'importance que nous souhaitons aborder dans ces travaux de thèse. Ce point est en effet crucial pour permettre aux cliniciens d'établir un diagnostic de la maladie avec précision. Contrairement aux tests de dépistage comme les tests de grossesse, il est difficile (voire impossible aujourd'hui) dans le cas du cancer de donner une réponse franche en termes de diagnostic moléculaire avec un seul biomarqueur. Des études statistiques effectuées sur les cancers démontrent que par l'analyse de plusieurs cibles biologiques, il est possible d'atteindre des taux de sensibilité et de sélectivité des diagnostics excellents.⁴ Les travaux récents menés à l'aide de l'approche Cancerseek confirment cette tendance.⁵ Le couplage de plusieurs cibles sur une même plateforme de détection est donc un défi scientifique à fort potentiel clinique. Le LAAS-CNRS possède, de plus, des compétences qui permettent la fonctionnalisation de surface de manière localisée (avec des résolutions de l'ordre de la dizaine de micromètres) tel que le microcontact printing ou l'utilisation de technologies MEMS capable de prélever et déposer des volumes de solution très faibles (appelé bioplume).^{6,7} Il serait très intéressant d'effectuer à court terme la fonctionnalisation de la plateforme nanofluidique avec des séquences de type balises moléculaires spécifiques à différentes cibles miARNs. Cette expérience serait un premier pas vers la détection de plusieurs cibles en même temps avec notre système. Il serait aussi très

intéressant, à plus long terme, de coupler la détection des miARNs à des cibles d'origines différentes telles que des protéines (CA19.9) et de l'ADN (mutation KRAS).

Enfin, la réalisation d'un système intégré permettant l'analyse directe des fluides corporels permettrait d'effectuer une analyse au plus proche du patient. On note effectivement que les mesures utilisées actuellement en clinique se basent sur des prélèvements réalisés à un instant t sans notion de « flux » des événements biologiques *in situ*. La détection de biomarqueurs en temps réel serait une solution optimale pour une prise en charge efficace et la mise en place d'une médecine personnalisée. Il faudrait, pour ce faire, réaliser des capteurs portatifs, voire implantables, capable de communiquer à distance afin d'adapter le traitement ou le suivi aux réponses moléculaires mesurées en temps réel. Ce type de système intervient, évidemment, dans une vision du projet à plus long terme, mais la réalisation de travaux comme ceux décrits dans cette thèse sont les premiers blocs qui permettent de prédire un avenir radieux à cette thématique considérée il y a encore peu comme de la science-fiction.

Références de la conclusion générale et des perspectives

1. Ranchon, H., Malbec, R., Picot, V., Boutonnet, A., Terrapanich, P., Joseph, P., Leichlé, T. & Bancaud, A. DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids. *Lab. Chip* **16**, 1243–1253 (2016).
2. Richards, K. E., Go, D. B. & Hill, R. Surface Acoustic Wave Lysis and Ion-Exchange Membrane Quantification of Exosomal MicroRNA. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1580**, 59–70 (2017).
3. Sader, J. E., Hanay, M. S., Neumann, A. P. & Roukes, M. L. Mass Spectrometry Using Nanomechanical Systems: Beyond the Point-Mass Approximation. *Nano Lett.* **18**, 1608–1614 (2018).
4. Flores-Fernández, J. M., Herrera-López, E. J., Sánchez-Llamas, F., Rojas-Calvillo, A., Cabrera-Galeana, P. A., Leal-Pacheco, G., González-Palomar, M. G., Femat, R. & Martínez-Velázquez, M. Development of an optimized multi-biomarker panel for the detection of lung cancer based on principal component analysis and artificial neural network modeling. *Expert Syst. Appl.* **39**, 10851–10856 (2012).
5. Cohen, J. D., Li, L., Wang, Y., Thoburn, C., Afsari, B., Danilova, L., Douville, C., Javed, A. A., Wong, F., Mattox, A., Hruban, R. H., Wolfgang, C. L., Goggins, M. G., Molin, M. D., Wang, T.-L., Roden, R., Klein, A. P., Ptak, J., Dobbyn, L., Schaefer, J., Silliman, N., Popoli, M., Vogelstein, J. T., Browne, J. D., Schoen, R. E., Brand, R. E., Tie, J., Gibbs, P., Wong, H.-L., Mansfield, A. S., Jen, J., Hanash, S. M., Falconi, M., Allen, P. J., Zhou, S., Bettegowda, C., Diaz, L. A., Tomasetti, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Lennon, A. M. & Papadopoulos, N. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* **359**, 926–930 (2018).
6. Cau, J.-C., Ludovic, L., Marie, N., Adriana, L. & Vincent, P. Magnetic field assisted microcontact printing: A new concept of fully automated and calibrated process. *Microelectron. Eng.* **110**, 207–214 (2013).
7. A Microcantilever-Based Picoliter Droplet Dispenser With Integrated Force Sensors and Electroassisted Deposition Means - IEEE Journals & Magazine. at <<https://ieeexplore.ieee.org/document/4586166/>>

Table des abréviations

6-FAM : 6-carboxyfluorescéine
Ago-2 : argonaute-2
AND : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
BRET : en anglais *bioluminescence resonance energy transfer*
CAIP : calf alkaline phosphatase
CpG : cytosine-phosphate-guanine
CTC : cellule tumorale circulante
ddPCR : en anglais *droplet digital PCR*
DGCR8 : en anglais *DiGeorge syndrome chromosomal (or critical) region 8*
DMSO : diméthylsulfoxyde
DTT : dithiothréitol
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
FRET : en anglais *Förster resonance energy transfer*
h-PDMS : hard-polydiméthylsiloxane
LNA : en anglais *locked nucleic acid*
lncRNA : long acide ribonucléique non codant
MATLAB : en anglais *matrix laboratory*
MEB : microscope électronique à balayage
MEMS : microsystème électromécanique
MiARN : micro acide ribonucléique
MOS : en anglais *metal oxide semiconductor*
MCE : mercaptoéthanol
NGS : en anglais *next generation sequencing*
pCp : phosphate-cytidine-phosphate
PCR : réaction en chaîne par polymérase
PEG : polyéthylène glycol
Pre-miARN : micro acide ribonucléique précurseur
Pri-miARN : micro acide ribonucléique primaire
PSA : antigène prostatique spécifique
PNA : en anglais *peptid nucleic acid*
qPCR : réaction en chaîne par polymérase quantitative
RBP : en anglais *RNA binding protein*
RISC : en anglais *RNA-induced silencing complex*
RNase : ribonuclease
RT : en anglais *reverse transcription*
RT-qPCR : en anglais, *reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*
SND : différence d'un nucléotide, en anglais *single nucleotide difference*
snoRNA : petit acide ribonucléique nucléolaire
SPR : en anglais *surface plasmon resonance*
TRBP : en anglais *transactivating response RNA-binding protein*
UNA : en anglais *unlocked nucleic acid*

Annexe A : biomarqueurs prédictifs en clinique

Organ	Cancer	Biomarker and mechanism	Assay for measurement	Associated Target and Drug	Approximate proportion of positive tests	Stage of clinical validation	References
Breast	Breast Cancer	HER2: oncogene overexpression	ISH, IHC	HER2: Trastuzumab, Pertuzumab, Ado-trastuzumab emtansine	18-20%	In clinical use	(8-10)
		ER/PR: suggests sensitivity to endocrine therapy	IHC, (LBA)	ER: Endocrine therapy (tamoxifen, aromatase inhibitors)	75%	In clinical use	(87)
Gastro-intestinal	Colorectal Cancer	KRAS: mutations activate RAS-RAF-MEK pathway and resistance to EGFR therapy	PCR	EGFR: Cetuximab, panitumumab	40% mutated	In clinical use	(11, 88)
	GIST	KIT: mutation leads to constitutonal activation	IHC	BCR-ABL: Imatinib	95%	In clinical use	(89)
Hematological	Esophago-gastric adenocarcinoma	HER2: oncogene overexpression	ISH, IHC	HER2: Trastuzumab	7-22%	In clinical use	(70)
	Chronic myeloid leukemia	BCR-ABL: Balanced t(9;22) leading to the formation of a constitutively active tyrosine kinase	Cytogenetics, FISH, RT-PCR	BCR-ABL: Imatinib, dasatinib, nilotinib	>90%	In clinical use	(90)
	Acute promyelocytic leukemia	PML-RARA: balanced t(15;17) leading to aberrant retinoid receptor.	Cytogenetics, FISH, RT-PCR	PML-RARA: All-trans retinoic acid	>90%	In clinical use	(91)
Lung	NSCLC	EGFR (HER1): mutations in tyrosine kinase domain	Sequencing, ISH	EGFR: Erlotinib, gefitinib, afatinib	15% adenocarcinomas in US (higher in Asians, women and nonsmokers)	In clinical use	(92)
		ALK: Inversion in chromosome 2 leads to EML4-ALK fusion oncogene	FISH (IHC)	ALK: Crizotinib, ceritinib (alectinib under development)	4% (mostly adenocarcinoma)	In clinical use	(93)
	Lung adenocarcinoma	Multiple genes:				Continued validation	(49)
		BRAF (V600E and non-V600E)	Multiplex sequencing	BRAF: AZD6244	2%		
		EGFR (HER1): mutations in tyrosine kinase domain		EGFR: Erlotinib, gefitinib, afatinib, Cetuximab	17%		
	HER2: oncogene overexpression		HER2: Decinutubub, Neratinib, Lapatinib, Trastuzumab	3%			
	KRAS: mutations activate RAS-RAF-MEK pathway and resistance to EGFR therapy		KRAS: Erlotinib, Tivantinib, Everolimus, Ridaforalimus, AZD6244	25%			
	ALK: Inversion in chromosome 2 leads to EML4-ALK fusion oncogene		ALK: Crizotinib, ceritinib	8%			
	MET		MET: Cizotinib	<1%			

Skin	Melanoma	BRAF V600: 80-90% V600E mutation, a downstream mediator of RAS, leads to downstream activation of MEK and ERK	Sequencing	BRAF: Vemurafenib, dabrafenib	40-60%	In clinical use (94)
-------------	----------	--	------------	-------------------------------	--------	----------------------

Tiré de Goossens, N., Nakagawa, S., Sun, X. & Hoshida, Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl. Cancer Res.* **4**, 256–269 (2015).

Annexe B : synthétisation du hard-PDMS

1. Quelques caractéristiques du hard-PDMS

Module d'Young : 3 fois plus grand que le PDMS, environ 10 MPA

Viscosité plus faible que le PDMS

Temps de conservation : 2 mois à -20°C

2. Composants du hard-PDMS

Nom du produit	Masse/Volume
VDT 731(7-8%) (AB116647)	6.8 g
VQM 135 (AB109405)	1 g
Modulateur (396218)	50 µL
SIP6831.1 (AB146697)	10 µL
HMS 301 (AB109380)	2 g
Masse total	10 g

3. Protocole

- i. Mélanger VDT 731 (base de l'élastomère), VQM 135, le modulateur et le catalyseur (SIP6831.1).
- ii. Le mélange doit être fait de façon homogène et à petite vitesse afin d'éviter un échauffement (possibilité de l'effectuer le tube dans de la glace).
- iii. Ajouter le HSM 301 (agent réticulant).
- iv. Après préparation, le hard-PDMS peut être conservé au congélateur.

4. Dépôt du hard-PDMS

Sur lamelle de verre 24x32 mm (pour collage Si) : V = 1 mL, vitesse de rotation = 3000 tr/s, accélération = 3000 tr²/s, temps = 30s, recuit 45 min à 75°C (240 min à 60°C pour éviter la rugosité)

Annexe C : code MatLab

```
clear all
close all

%hauteur du canal [m]
h=450e-9;
%largeur du canal [m]
w=50e-6;
%longueur du canal [m]
l=500e-6;
%constante de Boltzmann
kb=1.38e-23;
%concentration en cible [mol/m3]
C0=[10e-6];
%nombre d'Avogadro [1/mol]
Na=6.022e23;
%pression appliquée [Pa]
delta_P = [100000];
%constante de dissociation [1/s]
koff=[0];
%constante d'association [m^3/(mol.s)]
kon=[50];
%temperature [K]
T = [298.15];
%pas temporel de cinétique [s]
tk=[100];
%temps total de l'expérience [s]
tf=[1800];
%densité de sondes [molecule/m^2]
p0=[1e17];
%viscosité [s/Pa]
eta=2.414e-5*10^(247.8/(T-140));
%vitesse moyenne des molécules [m/s]
vm=(h^2)*(delta_P(f)/2)*(1/(12*eta*l));
%probabilité d'association [1/s]
P_association=(kon*p0/Na)/h;

%matrice du taux d'hybridation spatial pour un point cinétique
M=zeros(floor(w/dy)+1,1);
%matrice du taux d'hybridation spatial pour tous les points cinétiques
Mf=zeros(floor(w/dy)+1,1);
%nombre total de molécules [1]
Nmol=h*w*vm*C0(k)*Na*tf;
%nombre de molécules réduit [1]
Nmolred=10000;
%densité de sondes réduite [molecules/m^2]
p0red=p0*Nmolred/Nmol;
%nombre de sondes par pas spatial [1]
p02dred=p0red*dymax*w;
%matrice de la position des molécules et leur état (en interaction ou libre)
Mmol=zeros(Nmolred,2);

%increment pour amener une nouvelle molécule
i=0;
%increment pour mettre en mémoire les différents points de cinétique
k=0;
%temps [s]
tc=0;
```

```

%vitesse d'avancée du front d'hybridation [m/s]
vi=vm/(1+(1/((C0(k)*h/(p0/Na))*(1+(koff/(kon*C0(k)))))));
%pas de temps maximal [m]
dymax=w/(floor(w/(vi*tk))+1);
%pas spatial minimal [m]
dymin=1e-6;

%Correction du pas spatial ci il est inférieur à la résolution du capteur
if dymax < dymin
    dymax = dymin;
end

%pas de temps [s]
dt=dymax/(vm*100);

%Initialisation de la position et de l'état des molécules
for j=1:Nmolred
    Mmol(j,1)=0+vm*dt*((2*rand)-1);
    Mmol(j,2)=0;
end

%Algorithme
while tc <= tf
    k=k+1;
    while tc < z*tk
        i=i+1;
        while tc<(i*tf/Nmolred)
            for j=1:i
                if Mmol(j,2)==0
                    %la molécule j se déplace
                    Mmol(j,1)=Mmol(j,1)+vm*dt;
                end
                %si la molécule est au-dessus du capteur
                if (Mmol(j,1)<w)
                    if (Mmol(j,1)>=0)
                        index=(floor((Mmol(j,1)/dymax))+1);
                        %si la molécule est libre
                        if (Mmol(j,2)==0)
                            %probabilite d'association
                            if(rand<dt*P_association*(1-Mf(index)))
                                Mmol(j,2)=1;
                                Mf(index)=Mf(index)+1/p02dred;
                            end
                        %si la molécule est en interaction
                        else
                            %probabilite de dissociation
                            if (rand<koff*dt)
                                Mmol(j,2)=0;
                                Mf(index)=Mf(index)-1/p02dred;
                            end
                        end
                    end
                end
            end
            tc=tc+dt;
        end
    end
    M=[M Mf];
End

```

Annexe D : marquage Qubit

Le protocole utilisé pour l'analyse en fluorescence après marquage au Qubit est le même que décrit par le fournisseur adapté à un volume final de 50 µL pour permettre la détection avec une plaque 96 puits. Nous le reprenons ici :

1. Prepare the Qubit® working solution by diluting the Qubit® microRNA reagent 1:200 in Qubit® microRNA buffer. Use a clean plastic tube each time you make Qubit® working solution. Do not mix the working solution in a glass container.

Note: The final volume in each tube must be 200 µL. Each standard tube requires 190 µL of Qubit® working solution, and each sample tube requires anywhere from 180 µL to 199 µL. Prepare sufficient Qubit® working solution to accommodate all standards and samples.

2. Load 45 µL of Qubit® working solution into each of the tubes used for standards.
3. Add 5 µL of your sample to the appropriate tube and mix by pipetting up and down 2–3 times, being careful not to create bubbles.

Note: Careful pipetting is critical to ensure that exactly 5 µL of each sample is added to 45 µL of Qubit® working solution.

Annexe E : isolement des exosomes

Isolate Exosomes (without proteinase treatment)

1. Transfer the required volume of clarified plasma to a new tube and add 0.5 volumes of 1X PBS.
2. Mix the sample thoroughly by vortexing.
3. Add 0.2 volume (i.e. Total volume = plasma + PBS) of the Exosome Precipitation Reagent (from plasma) to the sample.

Plasma + PBS	Reagent
100 μ L + 50 μ L	30 μ L
1 mL + 0.5 mL	300 μ L

4. Mix the plasma/reagent mixture well either by vortexing or inversion until the solution is homogenous.
Note: The solution should have a cloudy appearance.
5. Incubate the sample at room temperature for 10 minutes.
6. After incubation, centrifuge the sample at $10,000 \times g$ for 5 minutes at room temperature.
7. Aspirate the supernatant by pipetting and discard.
Note: Exosomes are contained in a pellet at the bottom of the tube.
8. (*Optional*) Centrifuge the tube for 30 seconds at $10,000 \times g$ to collect any residual reagent.
9. Discard any residual supernatant by careful aspiration with a pipet and proceed to "Resuspend Exosomes."

Resuspend Exosomes

1. Add 1X PBS or similar buffer to the pellet and vortex or pipet up and down to resuspend the exosomes.

Starting Plasma Volume	Resuspension Volume
100 μ L	25–50 μ L
1 mL	100–500 μ L

2. Once the pellet is resuspended, the exosomes are ready for downstream analysis or further purification through affinity methods.

Keep isolated exosomes at 2°C to 8°C for up to 1 week, or at -20°C or colder for long-term storage.