

## Analyse d'ADN à haute sensibilité par la technologie $\mu$ LAS

### Exemple d'industrialisation d'une technologie académique

La crise sanitaire internationale est venue montrer dans notre quotidien la performance des technologies d'analyse génomique, qui permettent d'identifier et de séquencer les souches virales de virus à l'échelle mondiale. Cette situation est le fruit d'un investissement de recherche et développement considérable depuis plus de quarante ans, dont le séquençage constitue le meilleur exemple puisque les outils de lecture du génome ont progressé presque continuellement à partir de 1975, l'année de la preuve de principe [1], jusqu'aux technologies de troisième génération à partir de 2010 [2]. Les technologies de la micro/nanofluidique, qui permettent de contrôler et mesurer des solutions dans des canalisations de dimensions inférieures à 100  $\mu\text{m}$  environ, ont contribué à cette intensification des procédés, à la fois pour la manipulation des échantillons et les procédés analytiques [3]. Dans le domaine des analyseurs d'ADN, l'appareil de référence s'intitule Femto Pulse (Agilent) ; il présente une sensibilité de 50 fg/ $\mu\text{L}$  sur des échantillons de 2  $\mu\text{L}$  et avec une analyse rendue en 40 minutes. D'autres innovations sont en développement, dont la technologie  $\mu$ LAS ( $\mu$ -laboratoire d'analyse et de séparation) présentée ici. Inventée et brevetée en 2014 au LAAS-CNRS, elle est aujourd'hui industrialisée par la société Adelis Technologies avec le support de la société d'accélération de transfert technologique de Toulouse (TTT). Pour rappel, les analyseurs d'ADN permettent de mesurer la distribution en masse moléculaire des espèces dans un échantillon, le plus souvent purifié au préalable. Tirant parti du fait que les acides nucléiques sont chargés négativement, l'électrophorèse à travers une matrice formée d'un gel ou d'une solution concentrée de polymère neutre constitue la méthode de séparation de référence. L'électrophorèse est conduite dans des capillaires de verre de 30 cm de longueur et dont le diamètre intérieur mesure de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ . L'objectif de la technologie  $\mu$ LAS est de réaliser l'analyse des ADN en intégrant les opérations analytiques et pré-analytiques dans un seul et même module, en offrant donc une analyse sensible et rapide sans compromis sur la qualité de l'échantillon.

### Mécanisme de séparation en taille par $\mu$ LAS

Le procédé  $\mu$ LAS consiste à contrôler la migration de fragments d'ADN dans une canalisation microfluidique. L'originalité tient à la combinaison d'un écoulement hydrodynamique à une vitesse de l'ordre de 1 mm/s avec une force électrophorétique orientée en sens opposé associée à une migration à 0,1 mm/s environ (figure 1, flèches bleue et rouge). Les molécules baignent de plus dans une solution concentrée en polymère neutre (le plus souvent de la poly-vinylpyrrolidone), qui présente des propriétés viscoélastiques. Ce caractère viscoélastique modifie la migration des molécules : en plus des forces hydrodynamiques et électrophorétiques dans l'axe de l'écoulement des capillaires, les molécules subissent une force transverse orientée vers les parois (figure 1, flèche verte). Cette force de migration transverse, dite « de plaquage », est déterminée par la vitesse de l'écoulement, le champ électrique et la taille de l'ADN en paires de bases [4]. Aussi, plus une molécule est longue, plus elle est plaquée vers la paroi, et plus sa vitesse hydrodynamique est faible car elle est entraînée par les veines de liquides lentes du profil parabolique des vitesses de l'écoulement (figure 1). Comme la vitesse électrophorétique

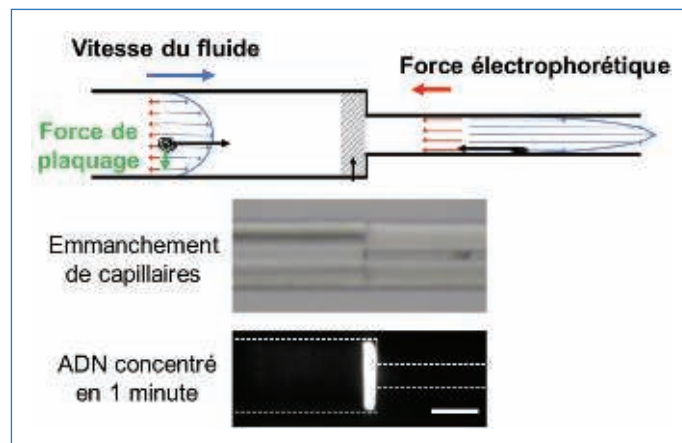


Figure 1 - Principe de la technologie  $\mu$ LAS. En haut : schéma de la migration des molécules d'ADN avec un actionnement électrohydrodynamique et soumises à une force de plaquage d'origine viscoélastique. La migration dans le grand canal de 360  $\mu\text{m}$  de diamètre est dominée par la force hydrodynamique, alors que le plaquage des molécules dans le petit canal de 40  $\mu\text{m}$  de diamètre est associé à un régime de migration électrophorétique. En bas : assemblage de capillaires visualisé en microscopie en lumière blanche et ADN concentré observé en fluorescence après une minute d'actionnement. Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

est indépendante de la position par rapport aux parois,  $\mu$ LAS est un mécanisme de séparation en taille d'ADN. Les performances séparatives de  $\mu$ LAS sont particulièrement intéressantes pour les molécules de grande masse moléculaire : nous avons démontré la séparation de quinze fragments de taille comprise entre  $10^3$  et  $150 \cdot 10^3$  paires de bases en 5 minutes [5].

### Intégration des opérations de concentration et séparation pour une détection sensible

La microfluidique, qui permet de contrôler la géométrie des canalisations, offre un potentiel supplémentaire à  $\mu$ LAS. En diminuant la section du canal, on peut augmenter la force transverse de plaquage (figure 1, panneau du milieu). Cet effet est directement expliqué par les lois de conservation qui impliquent que la vitesse du flux hydrodynamique et le champ électrique augmentent dans le petit capillaire, et en conséquence la force de plaquage [6]. Cette modification de la force transverse entraîne un changement de régime de migration. Dans le grand canal, la force de plaquage est faible et la migration dominée par l'hydrodynamique, alors que la migration est dominée par l'électrophorèse dans le petit canal où la force de plaquage est grande. Les molécules d'ADN s'accumulent donc en flux continu dans l'emmanchement des deux canalisations, comme en atteste le cliché de fluorescence du panneau du bas dans la figure 1.

L'originalité du concentrateur  $\mu$ LAS tient à son caractère dynamique dans la mesure où l'arrêt du champ électrique permet de libérer l'ADN piégé dans l'emmanchement. Cette fonctionnalité permet de réaliser les opérations de concentration et séparation de manière intégrée dans la mise en œuvre technologique développée par Adelis Technologies [7]. Un fort champ électrique de 25 kV est d'abord appliqué pendant 10 minutes pour concentrer un échantillon de 1  $\mu\text{L}$  (figure 2A, courbe noire). Le champ

## Intégrer la purification pour l'analyse d'échantillons complexes : le cas de l'ADN circulant dans le sang

Dans le domaine de la médecine de précision pour traiter des pathologies comme le cancer, l'analyse de l'ADN résiduel circulant dans le sang, que l'on isole à partir du plasma, constitue une option de choix [9]. L'ADN circulant contient en effet des molécules issues des tumeurs, ouvrant la voie, à partir ainsi de prélèvements simples à répéter dans le temps, à la détection des signaux associés à la résurgence de la maladie. L'analyse de cet ADN circulant nécessite néanmoins une purification rigoureuse car les sels et protéines concentrés dans le plasma empêchent les caractérisations avec les analyseurs du marché. Or l'opération de purification de l'ADN peut être incluse dans le procédé  $\mu$ LAS. En effet, pendant la phase de concentration, les sels et les protéines sont entraînés par le flux hydrodynamique, ce qui permet de rincer l'échantillon avec le tampon de séparation avant son analyse par le même procédé décrit précédemment. En dépit de la faible quantité totale d'ADN circulant (quelque pg/ $\mu$ L), la sensibilité de  $\mu$ LAS permet de fournir une caractérisation avec 1  $\mu$ L de plasma seulement. La comparaison des spectres entre un échantillon analysé directement ou après purification par colonnes d'extraction commerciale montre des pics comparables (figure 2B, courbes orange et verte), le principal de 150 paires de bases et le secondaire de 300. Compte tenu des différences d'abondance entre ces pics principaux pour des patients atteints de cancer par rapport à des individus sains [8], cette analyse directe et intégrée suscite de l'intérêt pour une validation pré-clinique sur une cohorte médicale.

L'histoire du procédé  $\mu$ LAS montre le temps nécessaire à la maturation d'un procédé d'analyse génétique issu du monde académique à partir de 2015. La démocratisation de cet outil et son exploitation pour des applications cliniques abouties restent encore à réaliser, mais les premières pierres sont déjà solidement installées.

- [1] F. Sanger, A.R. Coulson, A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *J. Mol. Biol.*, **1975**, *94*, p. 441-448.
- [2] E.R. Mardis, Next-generation sequencing platforms, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2013**, *6*, p. 287-303.
- [3] J. Legros, Synthèse organique en réacteurs miniaturisés en flux continu : faire plus et mieux avec moins, *L'Actual. Chim.*, **2021**, *467*, p. 7-13.
- [4] B. Chami, A. Bancaud *et al.*, Modeling of DNA transport in viscoelastic electrohydrodynamic flows for enhanced size separation, *Soft Matter*, **2018**, *14*, p. 5069-79.
- [5] B. Chami, A. Bancaud *et al.*, Single-step electrohydrodynamic separation of 1-150 kbp in less than 5 min using homogeneous glass/adhesive/glass microchips, *Talanta*, **2020**, *217*, 121013.
- [6] H. Ranchon, A. Bancaud *et al.*, DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids, *Lab. Chip*, **2016**, *16*, p. 1243-53.
- [7] [www.adelis-tech.com/product/biabooster](http://www.adelis-tech.com/product/biabooster)
- [8] C.-L. Andriamanampisoa *et al.*, BIABooster: online DNA concentration and size profiling with a limit of detection of 10 fg/ $\mu$ L and application to high-sensitivity characterization of circulating cell-free DNA, *Anal. Chem.*, **2018**, *90*, p. 3766-74.
- [9] G. Rossi, M. Ignatiadis, Promises and pitfalls of using liquid biopsy for precision medicine, *Cancer Res.*, **2019**, *79*, p. 2798-804.

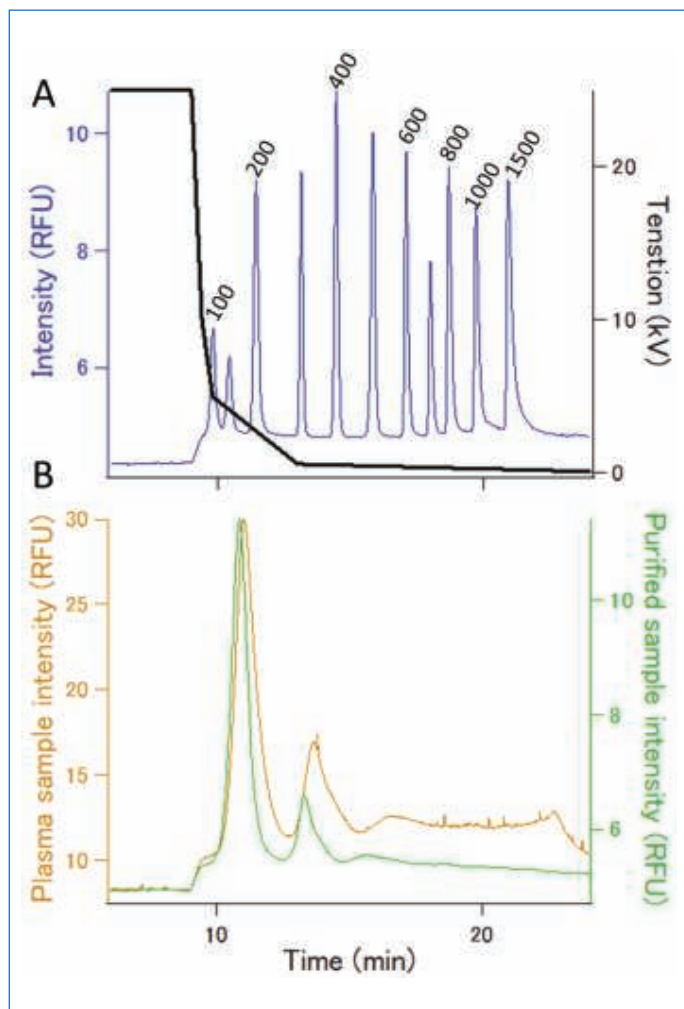


Figure 2 - Spectre de taille de l'ADN circulant mesuré par  $\mu$ LAS. (A) Le graphe en bleu représente l'intensité de fluorescence collectée au cours du temps pour un standard d'ADN dont les tailles sont inscrites au-dessus des pics. La courbe superposée noire montre le profil du champ électrique au cours du temps, avec une phase à haute tension pendant 9 minutes, puis la décroissance progressive de la tension jusqu'à zéro à 25 minutes. (B) Les deux courbes représentent l'intensité de fluorescence au cours du temps pour le même échantillon d'ADN plasmatisé, soit avec une analyse directe par le procédé  $\mu$ LAS (en orange), soit avec une étape préliminaire de purification sur colonne d'affinité commerciale (en vert).

électrique est ensuite abaissé pendant une dizaine de minutes jusqu'à zéro de façon à libérer les ADN progressivement, les courtes chaînes s'échappant en premier du concentrateur et celles de plus haute masse moléculaire en dernier. Grâce à un détecteur optique placé en aval dans le petit canal, on réalise une analyse de spectre en taille avec des seuils de détection très bas d'environ 10 fg/ $\mu$ L (figure 2A, courbe bleue) [8]. L'opération automatisée complète est terminée en 25 minutes. Ces performances placent donc la technologie au meilleur niveau des analyseurs génétiques.

Cette fiche a été préparée par **Aurélien BANCAUD**, directeur de recherche au CNRS, LAAS-CNRS (Laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes), Toulouse ([abancaud@laas.fr](mailto:abancaud@laas.fr)).

Les fiches « Un point sur » sont coordonnées par Jean-Pierre FOULON ([jp foulon@wanadoo.fr](mailto:jp foulon@wanadoo.fr)). Elles sont regroupées et en téléchargement libre sur [www.lactualitechimique.org](http://www.lactualitechimique.org).