

# Gouttes et émulsions Criblage à très haut débit en biologie

Jean-Christophe Baret, Valérie Taly, Michael Ryckelynck, Christoph A. Merten, Andrew D. Griffiths

▶ **To cite this version:**

Jean-Christophe Baret, Valérie Taly, Michael Ryckelynck, Christoph A. Merten, Andrew D. Griffiths. Gouttes et émulsions Criblage à très haut débit en biologie. Médecine/Sciences, 2009, 25 (6-7), pp.627-632. 10.1051/medsci/2009256-7627 . hal-02136476

**HAL Id: hal-02136476**
**https://hal.science/hal-02136476**

Submitted on 22 May 2019

**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.

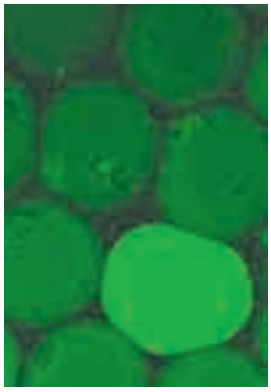
MEDECINE/SCIENCES 2009 ; 25 : 627-32

# Gouttes et émulsions

## Criblage à très haut débit en biologie

**Jean-Christophe Baret, Valérie Taly, Michael Ryckelynck, Christoph A. Merten, Andrew D. Griffiths**

› En combinant la microfluidique en gouttes et la compartimentation *in vitro* qui permettent la « parallélisation » de réactions chimiques ou biologiques dans les gouttes d'une émulsion, il devient possible de réaliser des tests biologiques à un très haut débit (1 000 tests par seconde), 1 000 fois plus rapide que la cadence des tests actuels en microplaques. Cette technologie permet la manipulation contrôlée, l'analyse et le tri de cellules, de gènes et de macromolécules en fonction de leurs activités enzymatiques, et de composés chimiques en fonction de leur activité sur des cibles d'intérêt thérapeutique. À terme, l'intégration de systèmes microfluidiques permettant la réalisation de séquences complexes d'opérations élémentaires sur des gouttes peut offrir une solution pour la miniaturisation et l'automatisation de tests biologiques ainsi qu'une augmentation des cadences d'analyses et de sélections ; ces approches permettent aussi de diminuer les volumes nécessaires à la réalisation des tests bien au-delà des limites des systèmes de criblage conventionnels. ‹



ISIS-UdS-CNRS UMR 7006,
8, allée Gaspard Monge,
BP70028,
F-67083 Strasbourg, France.
jc.baret@unistra.fr

La miniaturisation a été l'une des étapes déterminantes contribuant à l'avancée des technologies. En électronique et en informatique, par exemple, le nombre de transistors par microprocesseur a doublé tous les deux ans depuis 1961 (phénomène connu sous le nom de Loi de Moore) jusqu'à atteindre 1,7 milliards de transistors en 2008 pour l'*Intel Itanium*, qui fonctionne à 2 GHz, procurant une puissance informatique en croissance continue. En biologie et en médecine, la miniaturisation a été plus limitée : les systèmes robotisés, utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour le criblage de composés chimiques en microplaques, ont permis une réduction de la taille des échantillons analysés jusqu'à des volumes de l'ordre du microlitre et des cadences d'environ un test par seconde avec des plaques de microtitration. Mais cette technologie est sur le point d'atteindre ses limites [1]. Les changements d'échelle liés à la diminution des volumes ou à l'augmentation des cadences font apparaître des barrières intrinsèques : d'une part, les systèmes mécaniques tels que les robots ne sont pas facilement miniaturisables, et d'autre part, la manipulation des liquides à des échelles submillimétriques (1 µL correspond à une goutte de 1 mm de diamètre) est limitée par l'évaporation relativement rapide des liquides (eau ou solvants) et les effets de surface. Il est donc clair que seul un changement technologique permettra de franchir le pas de la miniaturisation. Nous présentons dans cette revue les progrès récents qui permettent de réaliser des tests biologiques quantitatifs dans des microréacteurs de quelques picoL à quelques nanoL, à un très haut débit (plusieurs milliers de tests par seconde). Ces systèmes sont susceptibles, à terme, d'offrir une alternative robuste et efficace aux tests tels qu'ils sont pratiqués actuellement dans les laboratoires. Ces progrès, que désigne l'appellation « microfluidique en gouttes », sont basés sur le couplage de deux technologies complémentaires : la microfluidique [2] et la compartimentation *in vitro* [3]. La première permet la manipulation contrôlée de liquides à l'échelle submillimétrique - gouttes d'une émulsion -, la seconde permet de réaliser des tests biologiques dans les gouttes d'une émulsion d'eau-dans-l'huile. La combinaison des deux permet un changement d'échelle majeur dans la miniaturisation des tests, rendant possible la réalisation de tests quantitatifs sur des volumes faibles (quelques pL) et à très haut débit (1 000 par seconde).





Article disponible sur le site http://www.medecinesciences.org ou http://dx.doi.org/10.1051/medsci/2009256-7627

## La microfluidique et les gouttes

Le terme microfluidique englobe l'ensemble des systèmes techniques permettant la mise en mouvement de fluides à des échelles de taille de l'ordre du micron. À l'origine de ces progrès, on trouve le développement de méthodes de prototypage rapide qui permettent de réaliser rapidement des puces dans des élastomères tels que le PDMS (polydiméthylsiloxane), grâce à l'adaptation d'une technologie industrielle (le *replica molding*) utilisée entre autres pour la production de disques compacts (CD) [4]. Les systèmes microfluidiques ont plusieurs avantages, liés aux dimensions du système : par exemple une accélération des transferts thermiques, des cinétiques de mélange, et la possibilité de travailler avec de faibles volumes compatibles avec les exigences de la biologie ou de la biochimie. Des réseaux de canaux contrôlés par des systèmes de valves pneumatiques ont ainsi permis de trier des bactéries en fonction de leur intensité de fluorescence [5], à la manière d'un cytomètre en flux. Bien que prometteurs, les systèmes microfluidiques se heurtent à des limites telles que la dispersion des molécules au sein du liquide par simple diffusion ou par dispersion de Taylor, source de contaminations entre échantillons [2]. L'utilisation de microcompartiments sous la forme de gouttes permet de s'affranchir de ces limites. Il existe de nombreuses technologies de manipulation de gouttes parmi lesquelles nous pouvons citer l'électromouillage, utilisé avec succès pour des applications en biotechnologie [6]. Toutefois, nous focaliserons cette revue sur les progrès d'une autre technologie, qui utilise la manipulation d'émulsions en microfluidique. Au cours de ces dix dernières années, un ensemble de modules élémentaires a été développé qui permet la manipulation de gouttes au sein de canaux microfluidiques, en augmentant graduellement la complexité des opérations réalisées *(Figure 1)*. Chaque goutte peut ainsi être utilisée comme un microréacteur séparé à la fois des parois de l'appareillage et des autres gouttes par un fluide porteur, une huile organique, minérale ou perfluorée. Ces modules permettent la production de gouttes dont la taille est uniforme [7], et qui sont utilisées pour l'encapsulation de cellules [8], d'ADN ou d'ARN [9, 10], de protéines [11] ou de réactifs [12] ; ils permettent aussi la division de gouttes pour réaliser des aliquotes de gouttes, leur fusion pour provoquer une réaction entre deux gouttes [11, 13, 14] et le tri de gouttes [14]. Pour ce dernier module, les puces microfluidiques sont couplées à des systèmes de détection optique mesurant la fluorescence de chaque goutte et la prise de décision de tri est effectuée en temps réel par un système électronique. Ainsi, les gouttes peuvent être analysées et sélectionnées à des cadences de l'ordre de 1 000 gouttes par seconde, 1 000 fois plus rapides que celles des tests en microplaques. En utilisant des méthodes physiques ou physicochimiques, les gouttes peuvent être stabilisées pendant des mois et les modules peuvent être intégrés à façon pour réaliser, de manière quantitative, des opérations successives et complexes, en biologie et en chimie.

La compartimentation *in vitro* (IVC) est une approche expérimentale où les réactions sont confinées dans les gouttes d'une émulsion d'eau dans l'huile [3]. Cette méthode est utilisée, par exemple, en évolution dirigée. Il s'agit d'un processus très efficace qui reproduit, *in vitro* et de façon accélérée, les principes darwiniens d'évolution naturelle consistant en une répétition de cycles de mutation/recombinaison et de sélection pour faire émerger des acides nucléiques ou des protéines dotés de nouvelles propriétés. Des millions de compartiments sont produits en parallèle pour chaque émulsion. Chacun se comporte comme une cellule artificielle dont le volume varie du femtolitre au picolitre et qui

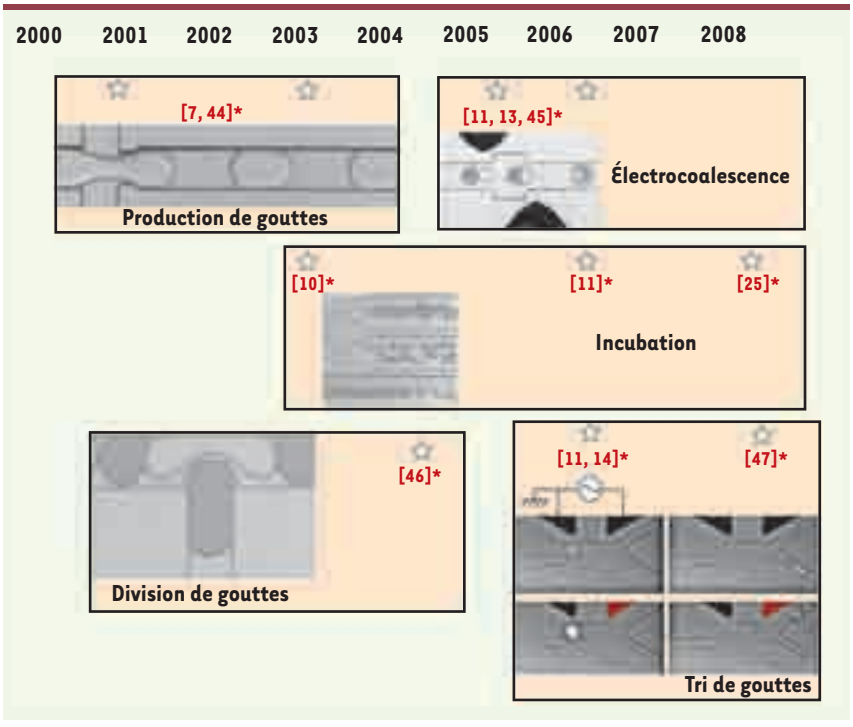



***Figure 1.*** ***Modules microfluidiques développés pour la manipulation de gouttes à des cadences de l'ordre de 1 000 gouttes par seconde.*** Les opérations passives (production, incubation, division) sont contrôlées par les dimensions des canaux et les débits des différentes phases. L'utilisation de champs électriques et l'interfaçage des puces avec des systèmes de détection optique permettent des manipulations plus complexes sur les gouttes (fusion, détection, tri), toujours à des cadences de l'ordre de 1 000 gouttes par seconde. * Voir Références page 632.

comporte uniquement le gène codant pour la protéine d'intérêt, la machinerie permettant son expression et le substrat permettant de révéler la catalyse. Un seul gène étant exprimé par goutte, ce système permet de réaliser le criblage d'une banque de variants génétiques et de moduler à façon les conditions de sélection (température, pH, concentrations salines, etc.). L'IVC a permis, entre autres, l'optimisation des propriétés de catalyse, de reconnaissance ou de régulation de nombreuses protéines et ARN [15, 16]. De même, l'amplification d'ADN en microgouttelettes (*emulsion PCR*) a été utilisée pour la transcription inverse de molécules uniques, la détection et l'énumération de mutants génétiques rares [17], l'haplotypage [18], le criblage à haut débit de cibles de facteurs de transcription [19] ; elle est utilisée aujourd'hui pour préparer des ADN matrices pour deux séquenceurs commerciaux de nouvelle génération [20]. Différents formats d'IVC ont été décrits, dont celui permettant la sélection directe des microgouttelettes en utilisant un trieur de cellules à fluorescence de type cytomètre en flux *(Figure 2)*. Cependant, aucun des formats décrits ne permettait de réaliser efficacement des opérations successives complexes ou de suivre directement chaque cinétique au sein de chacune des gouttelettes. De plus, les procédures utilisées pour la création des microgouttelettes ne permettaient pas la production de compartiments de taille identique. Ces limites peuvent néanmoins être dépassées par le contrôle microfluidique des émulsions.

## Microfluidique en gouttes et compartimentation *in vitro*

Les premiers travaux décrivant l'amplification en systèmes de microfluidique digitale à partir de molécules uniques d'acides nucléiques (ADN ou ARN) [21-23], ou l'expression *in vitro* de protéines au sein de gouttes utilisant comme modèle une protéine rapportrice (*green fluorescent protein* ou GFP) [9], ont récemment été rapportés. Avec ce type d'approche, les amplifications et analyses d'ADN peuvent être réalisées à des cadences de l'ordre de 500 gouttes par seconde.

Des mesures de cinétique enzymatique peuvent également être réalisées au sein de gouttes de quelques nL [24, 25]. La mesure de la cinétique de conversion d'un substrat fluorogénique directement au sein de gouttes a été réalisée à des échelles de temps allant de la milliseconde à plusieurs heures [26]. L'activité enzymatique de la ribonucléase A [24], de la phosphatase alcaline [27] et de la luciférase [28] ont ainsi pu être mesurées. En associant un module de création de gouttes à un module de

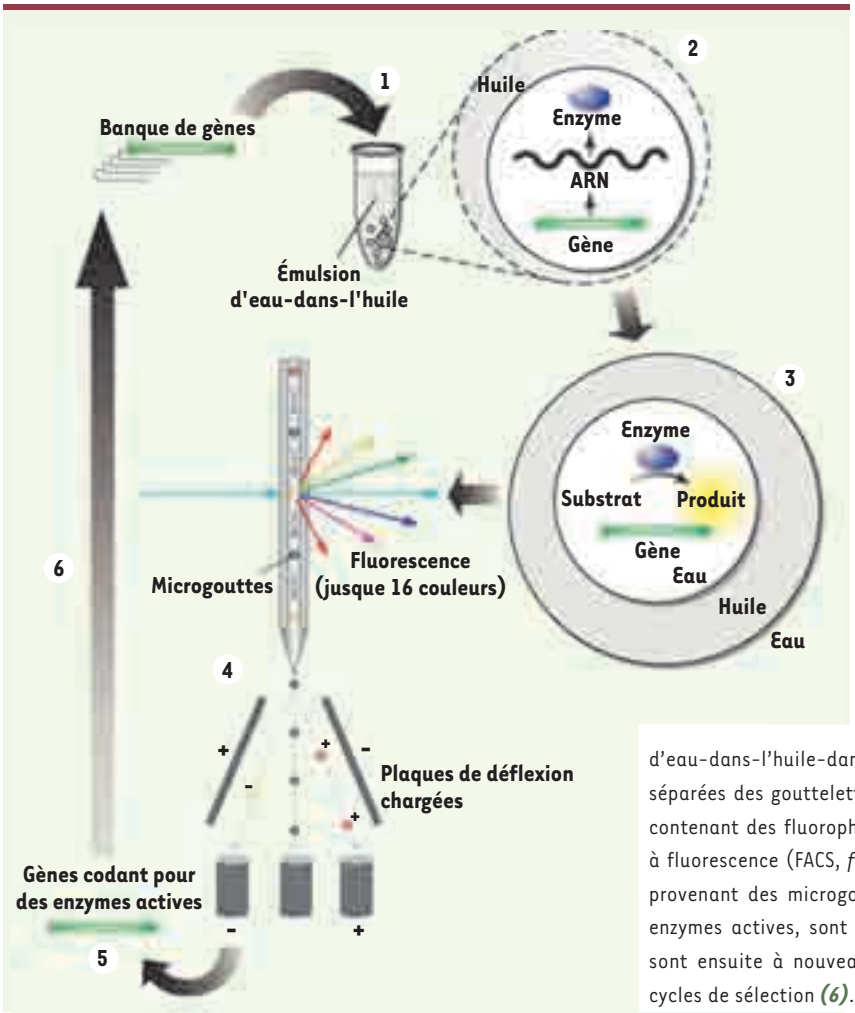



***Figure 2.*** ***Compartimentation in vitro : format permettant la sélection directe de microgouttelettes en fonction d'un signal de fluorescence.*** Un milieu de transcription/traduction *in vitro* contenant une banque de gènes codant pour des enzymes mutées est émulsionnée pour former une émulsion d'eau-dans-l'huile avec au maximum un gène par compartiment ***(1)***. Les gènes sont transcrits et traduits à l'intérieur des microgouttelettes ***(2)***. Les protéines possédant l'activité enzymatique recherchée convertissent un substrat non fluorescent en un produit fluorescent. L'émulsion d'eau dans l'huile est ensuite convertie en une émulsion d'eau-dans-l'huile-dans-l'eau ***(3)***. Les gouttelettes fluorescentes sont séparées des gouttelettes non fluorescentes (ou de microgouttelettes contenant des fluorophores différents) à l'aide d'un trieur de cellules à fluorescence (FACS, *fluoresence activated cell sorter*) ***(4)***. Les gènes provenant des microgouttelettes fluorescentes, qui codent pour des enzymes actives, sont purifiés et réamplifiés par PCR ***(5)***. Ces gènes sont ensuite à nouveau soumis à compartimentation pour d'autres cycles de sélection ***(6)***. Reproduit avec la permission de [43].

fusion suivi d'un canal microfluidique d'incubation de quelques secondes, les constantes cinétiques ($k_{cat}$ et $K_M$) de l'enzyme β-galactosidase d'*E. coli* ont pu être déterminées avec des résultats comparables à ceux que produisent des systèmes classiques [11]. Une étape supplémentaire consiste à réaliser les dilutions sur puces, ce qui facilite la manipulation des échantillons et permet de diminuer les quantités d'échantillons utilisées. Des réactions enzymatiques complexes comprenant plusieurs étapes réactionnelles peuvent être réalisées par fusions successives de gouttes [11, 14].

La stabilité des gouttes et la flexibilité de l'intégration des modules microfluidiques ouvrent la voie à de nombreuses applications dont le criblage d'inhibiteurs de protéines d'intérêt ou l'évolution dirigée des protéines. La possibilité de manipuler des protéines en gouttes, associée à la diminution des volumes nécessaires à ces analyses, à l'augmentation des débits et à la multiplicité des opérations réalisables sur les gouttes, rend ces systèmes extrêmement intéressants pour toute une variété d'autres applications comme la mesure de constantes d'association [29] ou la cristallisation de protéines [30]. Des systèmes analogues ont été appliqués à la mesure du temps de coagulation à partir de très faibles volumes de sang ou de plasma [31] ; les résultats du dosage d'un anticoagulant (argatroban) dans des échantillons de donneurs, obtenus avec cette technique, sont comparables à ceux que donnent les méthodes utilisées dans les laboratoires hospitaliers.

La réalisation de réactions sur de faibles volumes et dans des microcompartiments permet également de « digitaliser » ces réactions, c'est-à-dire de les réaliser sur des individus uniques. En effet, les réactions biologiques sont habituellement réalisées sur une population d'individus et le résultat obtenu représente le comportement moyen de la population. Dans ces conditions, la présence d'un individu d'intérêt - qui ne représente qu'une infime fraction de la population totale - peut échapper à l'analyse, ce qui est le cas lors des études diagnostiques. En compartimentant les individus, il devient possible de les analyser indépendamment les uns des autres.

Ce concept est le fondement de la PCR digitale où chaque molécule d'ADN est tout d'abord isolée dans un puits d'une plaque de microtitration, puis la présence des individus d'intérêt est révélée par PCR [32]. On a rapidement trouvé une application dans le domaine des diagnostics prénataux non invasifs, pour la recherche d'aneuploïdies [33]. Cette approche a été rapidement miniaturisée en systèmes microfluidiques par confinement des réactions en microréacteurs de quelques nanolitres grâce à l'utilisation de valves pneumatiques [34-36], réduisant significativement les quantités de réactifs utilisées. Des systèmes basés sur l'IVC ont également été appliqués à la mise en évidence d'ADN oncogènes circulants dans les selles et le plasma [37]. Toutefois, ce n'est que récemment que la PCR digitale a été réalisée en microfluidique en gouttes de quelques picolitres [21, 22, 23], offrant ainsi une nouvelle dimension au développement de systèmes diagnostiques.

La microfluidique en gouttes permet également l'encapsulation contrôlée et l'analyse à haut débit de micro-organismes. Il y a plus de cinq ans, les premiers systèmes microfluidiques permettant l'encapsulation de cellules dans des compartiments aqueux ont été développés. Dans ces systèmes, des puces microfluidiques généraient des segments de fluides séparés entre eux par une phase liquide non miscible. Cette approche a permis la préparation d'échantillons de cellules uniques à une cadence d'environ 30 par seconde [38, 39]. Plus récemment, il a été montré que des organismes multicellulaires pouvaient se développer dans ces segments aqueux, et y accomplir un cycle de vie complet de l'espèce [8]. Parallèlement à cette approche, des cellules ont été encapsulées dans des gouttes d'eau au sein d'une émulsion d'eau-dans-l'huile produite dans des systèmes microfluidiques *(Figure 3 A, B)*. Cette méthode permet de générer des échantillons à des cadences de l'ordre de 1 000 gouttes par seconde. Initialement, ces modules ont été utilisés dans des applications ne nécessitant pas la survie des cellules ou leur prolifération, par exemple pour analyser des protéines exprimées par des cellules uniques et produire des microcapsules polymères qui protègent les composants cellulaires fragiles [40]. Récemment, l'optimisation des émulsions et la mise au point de nouvelles stratégies d'incubation ont permis de réaliser des tests cellulaires sur des temps longs (plusieurs jours) en émulsion. Ainsi, des taux de survie de 80 % ont été obtenus après l'encapsulation de cellules uniques (Jurkat ou HEK293T) dans des gouttes de 660 pL après des incubations de 3 jours ; ces taux de survie sont liés à la quantité de nutriments accessibles à chaque cellule [8]. Un test fluorogénique a été réalisé dans chaque microcompartiment individuel (basé sur l'expression cellulaire d'une enzyme rapportrice, la β-galactosidase) à une cadence de 500 gouttes par seconde après une incubation en gouttes sur une période de 16 heures *(Figure 3 C)*.

## Conclusions

Ces résultats démontrent qu'il est possible de réaliser des tests enzymatiques sur des cellules ou des enzymes purifiées à très haut débit. Bien que la microfluidique digitale en soit encore à ses balbutiements, cette technologie devrait constituer une avancée majeure pour le domaine des sciences fondamentales (évolution dirigée) comme pour celui des sciences appliquées et industrielles (diagnostics et criblage à très haut débit de molécules d'intérêt pharmaceutique). Les premiers développements industriels sont en cours. Une entreprise basée aux États-Unis (*Raindance Technologies*) développe et commercialise des outils de microfluidique en gouttes pour du séquençage. Cette *start-up* possède, depuis fin 2008, une filiale en France (*Raindance Technologies* France). L'intérêt majeur de la technologie est sa polyvalence : la combinaison de la miniaturisation de réactions plus ou moins complexes, de leur parallélisation et de leur

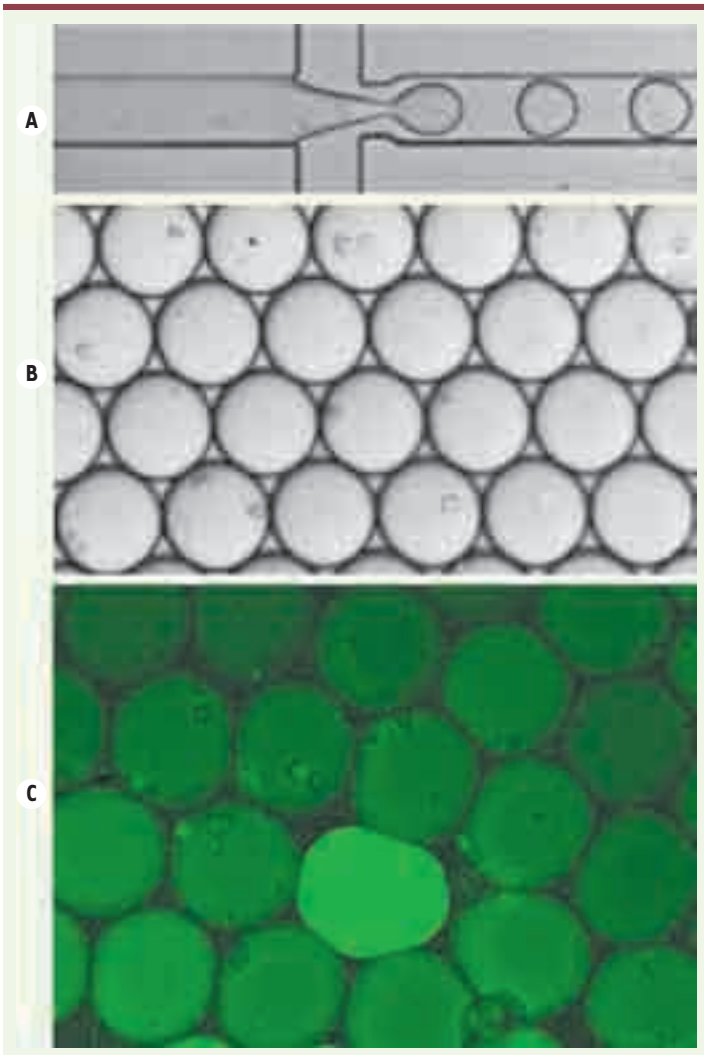



***Figure 3.*** ***Utilisation de la microfluidique digitale pour des tests cellulaires à haut débit.*** Les dispositifs permettent la production et l'encapsulation de cellules ***(A)***, la collecte des gouttes et leur réinjection dans d'autres dispositifs ***(B)*** pour une analyse optique sur puce ou pour une simple analyse de fluorescence grâce à un microscope à épifluorescence. ***C.*** Chaque goutte est indépendante des autres et la mesure de fluorescence permet de discriminer les cellules ayant une activité enzymatique (ici β-galactosidase) et les cellules n'ayant pas cette activité [8].

compartimentation permet d'analyser, pour chaque individu isolé, sa présence, son activité, sa survie..., et ce à de très hauts débits (kHz). À terme, l'utilisation de microcompartiments en microfluidique peut vraisemblablement rivaliser, voire dépasser, les capacités des cribles classiques robotisés. Cela permettra également de cribler à très haut débit des échantillons plus pertinents physiologiquement [41, 42] à partir de volumes d'échantillons plus faibles, par exemple, des lignées de cellules souches qui ne peuvent pas être produites dans des volumes compatibles avec les systèmes de criblage à haut débit actuels. ◊


## SUMMARY

### Droplets and emulsions: very high-throughput screening in biology

The combination of microfluidic manipulation of emulsion droplets and *in vitro* compartmentalization offers a means to parallelize biological and chemical assays in droplets. These droplets behave as independent microreactors that are produced, actuated and analyzed at rates of the order of 1 000 droplets per seconds providing tools to parallelize assays on small volumes (pL to nL range) for high-throughput screening: the throughput of the assays performed in droplets is 1 000 times larger than the throughput of existing technologies, based on micromanipulation of liquid in microtitre plates by robotic devices. The droplet-based microfluidic technology enables controlled manipulation, analysis and sorting of cells, genes and macromolecules based on their enzymatic activities, as well as chemical compounds based on their activity on biological targets. The integration of microfluidic systems for a series of complex individual operations on droplets could offer a solution to the miniaturization and automation of biological assays, combined with a decrease of the assay volumes and an increase of throughput, going beyond the capacities of conventional screening systems. ◊



## REMERCIEMENTS

*Les auteurs remercient le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, l'Université de Strasbourg, le Centre national de la recherche scientifique (CNRS), l'Agence nationale de la recherche (ANR) (ANR-05-BLAN-0397), et la Fondation d'entreprise EADS pour leur soutien financier. J.-C.B. est également financé par un* long-term fellowship *de l'*European Molecular Biology Organization *(EMBO) et C.A.M. par une bourse Liebig du* Fonds der Chemischen Industrie*, financée en partie par le ministère allemand* Bundesministerium fuer Bildung unf Forschung *(BMBF).*


## RÉFÉRENCES


1. Mayr LM, Fuerst P. The future of high-throughput screening. *J Biomol Screen* 2008 ; 13 : 443-8.
2. Squires TM, Quake SR. Microfluidics: fluid physics at the nanoliter scale. *Rev Modern Physics* 2005 ; 77 : 977-1026.
3. Tawfik DS, Griffiths AD. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat Biotechnol* 1998 ; 16 : 652-6.
4. Xia YN, Whitesides GM. Soft lithography. *Annu Rev Mater Sci* 1998 ; 28 : 153-84.
5. Fu AY, Spence C, Scherer A, *et al.* A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nat Biotechnol* 1999 ; 17 : 1109-11.
6. Fouillet Y, Achard JL. Microfluidique discrète et biotechnologie. *Comptes rendus physique* 2004 ; 5 : 577-88.
7. Anna SL, Bontoux N, Stone HA. Formation of dispersions using « flow focusing » in microchannels. *Appl Phys Lett* 2003 ; 82 : 364-6.
8. Clausell-Tormos J, Lieber D, Baret JC, *et al.* Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of mammalian cells and multicellular organisms. *Chem Biol* 2008 ; 15 : 427-37.

9. Courtois F, Olguin LF, Whyte G, *et al.* An integrated device for monitoring time-dependent in vitro expression from single genes in picolitre droplets. *Chembiochem* 2008 ; 9 : 439-46.
10. Song H, Tice JD Ismagilov RF. A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angew Chem Int Ed* 2003 ; 42 : 768-72.
11. Ahn K, Agresti J, Chong H, *et al.* Electrocoalescence of drops synchronized by size-dependent flow in microfluidic channels. *Appl Phys Lett* 2006 ; 88 : 29 juin *online*.
12. Zheng B, Tice JD, Ismagilov RF. Formation of droplets of in microfluidic channels alternating composition and applications to indexing of concentrations in droplet-based assays. *Anal Chem* 2004 ; 76 : 4977-82.
13. Priest C, Herminghaus S, Seemann R. Controlled electrocoalescence in microfluidics: Targeting a single lamella. *Appl Phys Lett* 2006 ; 89 : 134101.
14. Link DR, Grasland-Mongrain E, Duri A, *et al.* Electric control of droplets in microfluidic devices. *Angew Chem Int Ed* 2006 ; 45 : 2556-60.
15. Taly V, Kelly BT, Griffiths AD. Droplets as microreactors for high-throughput biology. *Chembiochem* 2007 ; 8 : 263-72.
16. Kelly BT, Baret JC, Taly V, Griffiths AD. Miniaturizing chemistry and biology in microdroplets. *Chem Commun*, 2007 ; 18 : 1773-88.
17. Dressman D, Yan H, Traverso G, *et al.* Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 8817-22.
18. Wetmur JG, Kumar M, Zhang L, *et al.* Molecular haplotyping by linking emulsion PCR: analysis of paraoxonase 1 haplotypes and phenotypes. *Nucleic Acids Res* 2005 ; 33 : 2615-9.
19. Kojima T, Takei Y, Ohtsuka M, *et al.* PCR amplification from single DNA molecules on magnetic beads in emulsion: application for high-throughput screening of transcription factor targets. *Nucleic Acids Res* 2005 ; 33 : e150.
20. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008 ; 9 : 387-402.
21. Beer NR, Wheeler EK, Lee-Houghton L, *et al.* On-chip single-copy real-time reverse-transcription PCR in isolated picoliter droplets. *Anal Chem* 2008 ; 80 : 1854-8.
22. Kumaresan P, Yang CJ, Cronier SA, *et al.* High-throughput single copy DNA amplification and cell analysis in engineered nanoliter droplets. *Anal Chem* 2008 ; 80 : 3522-9.
23. Kiss M, Ortoleva-Donnelly L, Beer N, *et al.* High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets. *Anal Chem* 2009 (sous presse).
24. Song H, Ismagilov RF. Millisecond kinetics on a microfluidic chip using nanoliters of reagents. *J Am Chem Soc* 2003 ; 125 : 14613-9.
25. Frenz L, Blank K, Brouze E, Griffiths AD. Reliable microfluidic on-chip incubation of droplets in delay-lines. *Lab Chip* 2009 *online* (sous presse).
26. Song H, Chen DL, Ismagilov RF. Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angew Chem Int Ed*, 2006 ; 45 : 7336-56.
27. Roach LS, Song H, Ismagilov RF. Controlling nonspecific protein adsorption in a plug-based microfluidic system by controlling interfacial chemistry using fluorous-phase surfactants. *Anal Chem* 2005 ; 77 : 785-96.
28. Liau A, Karnik R, Majumdar A, Doudna Cate JH. Mixing crowded biological solutions in milliseconds. *Anal Chem* 2005 ; 77 : 7618-25.
29. Srisa-Art M, Dyson EC, deMello AJ, Edel JB. Monitoring of real-time streptavidin-biotin binding kinetics using droplet microfluidics. *Anal Chem* 2008 ; 80 : 7063-7.
30. Zheng B, Ismagilov RF. A microfluidic approach for screening submicroliter volumes against multiple reagents by using preformed arrays of nanoliter plugs in a three-phase liquid/liquid/gas flow. *Angew Chem Int Ed* 2005 ; 44 : 2520-3.
31. Song H, Li HW, Munson MS, Thuong T, *et al.* On-chip titration of an anticoagulant argatroban and determination of the clotting time within whole blood or plasma using a plug-based microfluidic system. *Anal Chem* 2006 ; 78 : 4839-49.
32. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 9236-41.
33. Dennis Lo YM, Chiu RWK. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. *Clin Chem* 2008 ; 54 : 461-6.
34. Ottesen EA, Hong JW, Quake SR, Leadbetter JR. Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria. *Science* 2006 ; 314 : 1464-7.
35. Fan HC, Quake SR. Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Anal Chem* 2007 ; 79 : 7576-9.
36. Lun FMF, Chiu RWK, Allen Chan KC, *et al.* Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2008 ; 54 : 1664-72.
37. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, *et al.* Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008 ; 14 : 985-90.
38. Martin K, Henkel T, Baier V, *et al.* Generation of larger numbers of separated microbial populations by cultivation in segmented-flow microdevices. *Lab Chip* 2003 ; 3 : 202-7.
39. Grodrian A, Metze J, Henkel T, *et al.* Segmented flow generation by chip reactors for highly parallelized cell cultivation. *Biosens Bioelectron* 2004 ; 19 : 1421-8.
40. Oh HJ, Kim SH, Baek JY, *et al.* Hydrodynamic micro-encapsulation of aqueous fluids and cells via on the fly photopolymerization. *J Micromechanic Microengineer* 2006 ; 16 : 285-91.
41. Chapman T. Drug discovery: the leading edge. Nature 2004 ; 430 : 109-15.
42. Johnston PA, Johnston PA. Cellular platforms for hts: three case studies. *Drug Discov Today* 2002 ; 7 : 353-63.
43. Mastrobattista E, Taly V, Chanudet E, *et al.* High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions. *Chem Biol* 2005 ; 12 : 1291-300.
44. Thorsen T, Roberts W, Arnold FH, *et al.* Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Phys Rev Lett* 2001 ; 86 : 4163-6.
45. Chabert M, Dorfman KD, Viovy JL. Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels. *Electrophoresis* 2005 ; 26 : 3706-15.
46. Link DR, Anna SL, Weitz DA, *et al.* Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices. *Phys Rev Lett* 2004 ; 92 : 6 février *online*.
47. Fidalgo LM, Whyte G, Bratton D, *et al.* From microdroplets to microfluidics: selective emulsion separation in microfluidic devices. *Angewandte Chemie-International Edition* 2008 ; 47 : 2042-5.



**TIRÉS À PART**
J.C. Baret






ISBN : 2-84254-105-7 248 pages

## Bon de commande

**À retourner à EDK, 2, rue Troyon - 92316 Sèvres Cedex**
**Tél. : 01 55 64 13 93 - Fax : 01 55 64 13 94 - E-mail : edk@edk.fr**

NOM : ..... Prénom : .....
Adresse : .....
Code postal : ..... Ville : .....
Pays : .....
Fonction : .....
Je souhaite recevoir l'ouvrage **Trisomie 21 :** 15 € + 3 € de port = **18 € TTC**
en ..... exemplaire, soit un total de ..... €
❒ Par chèque, à l'ordre de **E D K**
❒ Par carte bancaire : ❒ Visa ❒ Eurocard/Mastercard
Carte n° |_|_|_|_| |_|_|_|_| |_|_|_|_| |_|_|_|_| Signature :
Date d'expiration : |_|_| |_|_|
N° de contrôle au dos de la carte : |_|_|