



HAL
open science

Développement d'une méthode de préconcentration de phosphopeptides sur phase monolithique en puce

Ichraf Ayed

► **To cite this version:**

Ichraf Ayed. Développement d'une méthode de préconcentration de phosphopeptides sur phase monolithique en puce. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112196 . tel-00839698

HAL Id: tel-00839698

<https://theses.hal.science/tel-00839698>

Submitted on 29 Jun 2013

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.

Développement d'une méthode de préconcentration de phosphopeptides sur phase monolithique en puce

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 27 Septembre 2012

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'université Paris-Sud 11
(Pôle chimie)

par

Ichraf Ayed

Composition du jury

<i>Rapporteurs :</i>	Pr. Catherine Perrin Pr. Philippe Morin
<i>Examineurs :</i>	Dr. Stéphanie Descroix Pr. Elisabeth Dufour-Gergam
<i>Membre :</i>	Dr. Thuy Tran
<i>Directrice de thèse :</i>	Pr. Myriam Taverna

A mes chers parents, Habiba et Noureddine,

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et bien être. Ce travail est le fruit de vos sacrifices consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes frères et sœurs Imen, Ines, Wissal, Mohamed et Helmi,

Ce travail vous doit beaucoup, qu'il soit pour vous le témoignage de mon infinie reconnaissance pour toutes ces années passées.

A l'âme de ma chère sœur Manel,

Toi qui a tant attendu ce moment mais qui nous a malheureusement quitté si tôt. Tu resteras à jamais gravée dans mon esprit.

A l'âme de ma chère grande mère Hourya.

A mes beaux frères Issam, Fawzi, Hedi et Wahid,

Vous qui m'avez beaucoup aidé et soutenu, soyez sûrs que ce travail est le résultat de votre confiance en moi.

A ma belle famille, père, mère, frère et sœurs,

Affectueuses reconnaissances.

Le mot de fin est à mon mari Sami,

Toi qui était à mes côtés dans les moments difficiles, merci pour ta patience et ta compréhension, merci pour tout le soutien que tu m'as accordé.

Remerciements

Avant tout développement sur ce rapport de thèse, il apparaît opportun de commencer par des remerciements. Ces derniers, ne sont pas motivés par le sens du devoir mais par la satisfaction d'avoir senti à mes côtés la présence de certaines personnes, ceux qui m'ont beaucoup appris au cours de ces trois ans, et même à ceux qui ont eu la gentillesse de faire de cette expérience un moment très profitable.

J'aimerais remercier des personnes appréciées qui ont su me soutenir tout au long de ma thèse, que ce soit en pensée ou en action.

Ce travail a été réalisé au sein de l'Institut Galien Paris-Sud (LPNSS-CNRS-UMR 8612) dirigé par le Professeur Elias Fattal. Je lui suis très reconnaissante pour son accueil au sein de son unité.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse, Mme Myriam TAVERNA, pour sa disponibilité et son encadrement sans faille. Je remercie Myriam pour son ouverture d'esprit qui la caractérise et qui m'a permis tout au long de ma thèse de pouvoir m'exprimer de façon spontanée. Je la remercie encore pour la patience et la compréhension dont elle a fait preuve.

Je tiens à remercier très chaleureusement Thuy TRAN, qui m'a encadré au cours de ces trois ans et m'a accompagné avec entrain et bienveillance. Je dois dire que j'ai vraiment beaucoup apprécié son comportement tant sur le plan humain que scientifique.

Aussi, j'adresse mes remerciements à Elisabeth DUFOUR GERGAM pour sa collaboration, sa disponibilité et ses conseils toujours précieux et judicieux.

Monsieur Philippe MORIN et Madame Catherine PERRIN ont accepté d'être rapporteurs de ce travail et Mme Stéphanie DESCROIX de faire partie de ce jury de thèse. Je les remercie tous très sincèrement.

Je remercie vivement les personnes ayant contribué à ce travail de thèse lors de stages au laboratoire : Baptiste DELAROCQUE, Amal BANNOUF, Ludivine BOL, Koceila Aïzel, Radhi KHEDHIRI et Audrey GARDOLL.

Messieurs Benjamin CARBONNIER et Mohamed GUERROUACHE, je vous suis très reconnaissante pour votre collaboration précieuse, vos conseils ainsi que toute l'aide que vous m'avez apportée pour la caractérisation du monolithe au sein de votre laboratoire.

Un grand merci à mes collègues de laboratoire aussi bien les anciens que les nouveaux et particulièrement à Mériam, Sonia, Ludivine, Kiarach, Ly, Ayat, Youssef et Romain.

Je remercie tout le personnel de l'UMR 8612 et du LPNSS, particulièrement Marie Claude, Claire, Antoine et Isabelle.

Merci également à tout le personnel de l'Institut d'Electronique Fondamentale d'Orsay (IEF) et tout particulièrement à David BOUVILLE pour son aide et les différentes discussions qu'on a eu ensemble.

Un grand merci à Hedi AYED pour sa grande disponibilité et l'attention qu'il a apporté pour la mise en page de ce manuscrit de thèse.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, scientifiquement ou moralement, à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

ACN	Acétonitrile
AIBN	Azobis-isobutyronitrile
ATP	Adénosine triphosphate
BAA	Bis acrylamide
COC	Copolymère cyclooléfine
DHB	Dihydrobenzoïque
DMF	Diméthylformamide (N,N-diméthylméthanamide)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNF	Dégénérescence neurofibrillaire
DRIE	Deep Reactive Ion Etching
EC	Electrophorèse capillaire
ECZ	Electrophorèse capillaire de zone
EGMP	Ethylène glycol Méthacrylate Phosphate
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FEO	Flux électroosmotique
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FTIR	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
GFP	Green fluorescent protein
GMA	Méthacrylate de glycidyle
HF	Acide fluorhydrique
HSA	Human Serum Albumin
IEF	Institut d'Electronique Fondamentale d'Orsay
IgG	Immonoglobuline
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
KOH	Hydroxyde de potassium
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LIF	Laser Induced Fluorescence
LOC	Lab-on-a-chip
MA	Maladie d'Alzheimer
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MCE	Electrophorèse sur puce (Microchip Capillary Electrophoresis)
MCT	Mercury Cadmium Telluride
MDPNA	Méthanediphosphonique
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEMS	Micro Electro Mechanical Systems
micro-TAS	Microsystèmes d'analyse totale
MIP	Polymères à empreintes moléculaires
MOAC	Metal oxide affinity chromatography
MPT	Modifications post-traductionnelles
Nano-HPLC	Nano-Chromatographie Liquide Haute Performance
PC	Polycarbonate
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PE	Polyéthylène
PEEK	Polyétheréthercétone
PEG	Poly-Ethylène Glycol
PEI	Polyéther-imide
PET/PETG	Poly-éthylène téréphthalate
PFA	Perfluoroalkoxy
PI	Polyimide
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
PP	Polypropylène

PPM	Monolithes poreux à base de polymère
PS	Polystyrène
PSA	Prostate Specific Antigen
PU	Polyuréthane
SIMAC	Sequential elution from IMAC
SM	Spéctrométrie de masse
SPE	Extraction sur phase solide
SPME	Microextraction en phase solide
Ss	Surface spécifique
TBAF	Tetrabutyl ammonium fluoride
TEOS	Tetraethyl orthosilicate
TFA	Acide Trifluoroacétique
Tg	Température de transition vitreuse
TMAH	Tétramethyl ammonium hydroxyde
TMB	Triméthoxyboroxine

Table des figures

1.1	Dimensions caractéristiques des dispositifs microfluidiques par rapport à quelques éléments biologique	6
1.2	Les trois étapes de la lithographie	12
1.3	Étapes de l'enduction	13
1.4	Exemple de quelques composantes physiques et chimiques en gravure sèche	15
1.5	Processus de collage de surface en verre à température ambiante proposé par Jia et al	17
1.6	Trois principales techniques de réplcation des MEMS plastiques . . .	18
1.7	Formule semi-développée du polymère de base et de l'agent de réticulation	20
1.8	Les étapes de fabrication par "lithographie douce" d'un système microfluidique en PDMS	20
1.9	Exemples de microstructures en PDMS	21
1.10	Photos d'une goutte de liquide sur une surface	23
1.11	Processus du collage du PMMA par un solvant faiblement azéotropique	24
1.12	Étapes de microfabrication de microsystèmes en téflon	25
1.13	Résistance aux solvants et adsorption des biomolécules sur les canaux en téflon	26
3.1	Cliché MEB d'un monolithe de Poly(BMA-co-EDMA) synthétisé dans un microcanal en verre	71
3.2	Schéma du dispositif microfluidique en verre utilisé pour la capture par affinité du lysosyme ou de HSA	74
3.3	Images de fluorescence du monolithe d'immunoaffinité pour le lysosyme synthétisé dans un dispositif microfluidique en verre	74
3.4	Images de fluorescence du monolithe d'immunoaffinité pour la HSA en utilisant des anticorps anti-HSA	75
3.5	Dispositif microfluidique proposé par Sun et al. pour la préconcentration la séparation en ligne de protéines sur puce en PMMA	76
3.6	Clichés MEB du monolithe poly(GMA-EGDMA) synthétisé au sein d'une puce en PMMA	76
3.7	Electrophérogrammes d'élution de HSA et d'IgG de la surface du monolithe anti-FITC intégré dans une puce en PMMA	77
3.8	Photo optique du monolithe META/BMA/EDMA synthétisé dans un microcanal en verre	77
3.9	Électrophérogrammes (à gauche) et spectres de masse (à droite) du cytochrome C (en haut) et de la myoglobine (en bas)	78
3.10	Schéma du dispositif microfluidique en verre développé par Wang et al.	79

3.11	Spectres de masse des produits de digestion du cytochrome C (A) sans préconcentration par SPE et (B) avec préconcentration par SPE	79
3.12	Dispositif microfluidique proposé par Svobodova et al.	80
4.1	Schéma général de la phosphorylation de la tyrosine	88
4.2	Les stratégies d'enrichissement des protéines et peptides phosphorylés	90
4.3	Les deux types de chaînes latérales attachés au dendrimère de Polymac	91
4.4	Séparation par ECZ d'un mélange de protéines phosphorylées et non phosphorylées	93
4.5	Analyse par CIEF-LIF de différentes formes de LC_{20}	94
4.6	Structure et fonctions de la protéine Tau	97
5.1	Réaction de polymérisation du monolithe EGMP-co-BAA	107
5.2	Image MEB d'une coupe transversale du monolithe EGMP-co- BAA (Mn1)	111
5.3	Images MEB d'une coupe transversale du monolithe EGMP-co-BAA (Mn1)	112
5.4	Profil de la distribution des pores et du diamètre moyen des pores	113
6.1	Photos de substrat (A) en silicium et (B) en verre recouvert de résine SU8 3050	122
6.2	Dispositif de remplissage des canaux d'une puce en PDMS collée selon le test 5	124
6.3	Mesures d'angle de contact avant et après traitement au plasma d'oxygène d'une surface ouverte de PDMS	126
6.4	Détails de la synthèse de la solution de borosilicate selon le protocole d'Orhan et al.	127
6.5	Processus de modification du PDMS par le borosilicate	128
6.6	Photo du canal en PDMS après revêtement au borosilicate synthétisé (Largeur du canal : $250\mu\text{m}$)	129
6.7	Spectres FTIR en mode réflexion réalisés sur des canaux de PDMS	130
7.1	Schéma du module de préconcentration (2cm du monolithe EGMP-co-BAA) réalisé dans un capillaire en silice	141
7.2	Schéma du dispositif utilisé pour la photopolymérisation localisée du monolithe EGMP-co-BAA dans un microsystème en verre	142
7.3	Différentes étapes de la préconcentration par IMAC sur le monolithe poly(EGMP-co-BAA)	143
7.4	Mobilité électroosmotique dans différents capillaires	145
7.5	Séparation par ECZ des peptides K et pK	146
7.6	Analyses par ECZ des peptides K et pK sur 3 types de capillaires	147
7.7	Suivi par UV des différentes étapes de préconcentration du phospho-kemptide	149
7.8	Photographie optique de la phase monolithique obtenue dans un canal de microsystème en verre (Diamètre du canal : $50\mu\text{m}$)	150

7.9	Clichés MEB du monolithe EGMP-co-BAA au sein du canal en verre	150
7.10	Répétabilité des longueurs du monolithe obtenues lors de la polymé- risation localisée dans six microsystèmes en verre	151
7.11	Evaluation de la rétention de K (B) et pK (C) marqués au HiLyte 488 sur un monolithe poly(EGMP-co-BAA) non métallisé (A)	152
7.12	Evaluation de la rétention de pK (B) marqué au HiLyte 488 sur un monolithe poly(EGMP-co-BAA) métallisé avec des ions Zr^{4+} (A) . .	152

Liste des tableaux

1.1	Propriétés des différents polymères utilisés pour la microfabrication de microsystemes analytiques	9
1.2	Comparaison des différents matériaux utilisés dans la microfabrication de microsystemes analytiques	11
3.1	Récapitulatif des publications portant sur la préconcentration de protéines et peptides par extraction sur support solide en microsystemes analytiques.	73
5.1	Différentes colonnes monolithiques préparées dans le cadre de l'optimisation de la composition du monolithe et de son énergie de polymérisation	110
5.2	Valeurs de perméabilité des différentes colonnes monolithiques (L=15cm, 25°C)	112
6.1	Tableau comparatif des deux protocoles I et II de préparation de master	122
6.2	Différentes conditions de plasma d'O ₂ testées pour obtenir une fermeture réversible des canaux en PDMS	123
7.1	Caractéristiques des deux peptides modèles utilisés pour évaluer la capacité de rétention du monolithe poly(EGMP-co-BAA)-Zr	146

Table des matières

Introduction générale	1
1 Microsystèmes séparatifs : Description et technologie	5
1.1 Introduction	5
1.2 Matériaux utilisés pour la microfabrication et leurs propriétés	7
1.3 Microfabrication des microsystèmes analytiques	10
1.3.1 Les principales étapes des technologies dites “dures”	10
1.3.1.1 La Lithographie	10
1.3.1.2 Les techniques de gravure	14
1.3.1.3 Les techniques de soudure	15
1.3.2 Techniques de microfabrication “douces”	17
1.3.2.1 Le matriçage ou “embossing”	18
1.3.2.2 La Micro-injection	19
1.3.2.3 Le moulage	19
1.3.2.4 Les techniques de collage	22
1.4 Nouveaux matériaux et leurs techniques de microfabrication de microsystèmes fluidiques	24
1.5 Conclusion	26
Bibliographie	28
2 Séparation électrophorétique de protéines en microsystèmes analytiques	33
2.1 Introduction	33
2.2 Revue : Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods : An update	36
2.3 Conclusion	64
Bibliographie	65
3 Préconcentration de protéines et peptides sur support solide en microsystèmes	67
3.1 Introduction	67
3.2 Phases stationnaires monolithiques	69
3.2.1 Monolithes organiques : synthèse, avantages et inconvénients	70
3.2.2 Applications des monolithes organiques dans la préconcentration de protéines et peptides en microsystèmes	72
3.3 Préconcentration de protéines et peptides sur phases stationnaires particulières	78
3.4 Conclusion	80
Bibliographie	82

4	Phosphorylation et biomarqueurs	87
4.1	Introduction	87
4.2	Phosphorylation de protéines	88
4.3	Analyse de phosphoprotéines	89
4.3.1	Méthodes d'enrichissement des phosphoprotéines	89
4.3.1.1	La chromatographie d'affinité de type IMAC	89
4.3.1.2	La chromatographie d'affinité de type MOAC	90
4.3.1.3	La chromatographie d'affinité de type SIMAC	91
4.3.2	Analyse de phosphoprotéines	91
4.3.2.1	L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel-2DE	92
4.3.2.2	L'électrophorèse capillaire	92
4.3.2.3	La spectrométrie de masse (SM)	93
4.4	Les biomarqueurs	95
4.5	Conclusion	97
	Bibliographie	98
5	Synthèse et caractérisation du monolithe organique EGMP-co-BAA en format capillaire	105
5.1	Introduction	105
5.2	Matériels et méthodes	106
5.2.1	Préparation du monolithe en capillaire	106
5.2.1.1	Traitement des capillaires avec du γ -MAPS	107
5.2.1.2	Synthèse du monolithe	107
5.2.2	Caractérisation du monolithe	107
5.2.2.1	Morphologie du monolithe	108
5.2.2.2	Perméabilité du monolithe	108
5.2.2.3	Autres caractérisations	108
5.3	Résultats et discussions	109
5.3.1	Mise au point de la synthèse du monolithe	109
5.3.1.1	Activation de la paroi du capillaire en silice	109
5.3.1.2	Optimisation du mélange de polymérisation	109
5.3.2	Caractérisation du monolithe retenu	113
5.3.2.1	Porosité du monolithe	113
5.3.2.2	Surface spécifique du monolithe	113
5.4	Conclusion	114
	Bibliographie	115
6	Microfabrication des puces en PDMS et transposition de la synthèse du monolithe EGMP-co-BAA en microsystème	117
6.1	Introduction	117
6.2	Matériels et méthodes	119
6.2.1	Préparation des puces en PDMS	119
6.2.1.1	Fabrication des masters	119
6.2.1.2	Fabrication des puces	120

6.2.2	Caractérisation des surfaces de PDMS	121
6.3	Résultats et discussions	121
6.3.1	Optimisation de la fabrication du master	121
6.3.2	Mise au point de la fermeture des canaux	123
6.3.3	Transposition de la polymérisation du monolithe en microsystèmes en PDMS	124
6.3.3.1	Traitement par plasma d'oxygène	125
6.3.3.2	Revêtement hydrophile au borosilicate synthétisé	126
6.3.3.3	Revêtement par pulvérisation cathodique de silice	129
6.4	Conclusion	131
	Bibliographie	133
7	Conception du module miniaturisé de préconcentration de phosphoprotéines	139
7.1	Introduction	139
7.2	Matériels et méthodes	140
7.2.1	Polymérisation du monolithe EGMP-co-BAA	140
7.2.2	Méthode d'immobilisation du zirconium, de préconcentration et d'élution	141
7.2.3	Etude du module de préconcentration de phosphopeptides en capillaire	142
7.2.4	Caractérisation du monolithe dans la puce en verre	142
7.3	Résultats et discussions	142
7.3.1	Optimisation des étapes de l'IMAC en format capillaire	144
7.3.1.1	Immobilisation des ions zirconium	144
7.3.1.2	Optimisation des conditions de chargement et de rétention du phosphopeptide	148
7.3.1.3	Optimisation des conditions d'élution du phosphopeptide	149
7.3.2	Optimisation du module de préconcentration sur une puce en verre	149
7.4	Conclusion	153
	Bibliographie	154
	Conclusion générale et perspectives	157
	Annexes	161
	A Traitement des capillaires de silice par du γ-MAPS	161
	B Synthèse du monolithe	163
	C Détails des masques utilisés pour la fabrication des puces en PDMS	165

D Revêtement des canaux de PDMS avec une solution synthétisé de
borosilicate

167

Introduction générale

Les nanotechnologies sont fréquemment présentées comme une perspective de progrès décisif dans l'évolution des technologies d'analyse biologique à haut débit (biopuces et séquençage) et notamment dans le domaine du diagnostic de pathologies où l'on recherche toujours des outils de diagnostic plus sensibles, plus spécifiques, plus précoces et plus discriminants. Certains espoirs sont fondés justement sur la miniaturisation qui permet d'augmenter la densité de l'information pour une taille d'échantillon biologique donnée, ainsi qu'une maîtrise fine des propriétés moléculaires à l'échelle nanométrique pouvant parfois compenser les difficultés de détection de biomolécules *in vivo* ou dans des échantillons biologiques (interactions trop rapides, structures trop volatiles, concentrations trop faibles, mélanges trop complexes, présences de substances interférentes). La miniaturisation permet en outre une exploration plus intime et moins traumatisante des patients en analysant des fluides biologiques plus accessibles que les tissus par exemple pour détecter des traces de certains biomarqueurs.

Les laboratoires sur puces, sont définis comme des dispositifs miniaturisés uniques permettant des analyses rapides et une faible consommation d'échantillons et de réactifs. Ces dispositifs offrent des performances accrues et sont relativement compacts, portables voire implantables. Ils permettent soit d'intégrer en série les différentes étapes d'un protocole d'analyse soit de réaliser un parallélisme permettant des analyses à haut débit. C'est dans ce contexte qu'il devient particulièrement intéressant de tirer profit des avantages de la miniaturisation pour concevoir des systèmes dédiés au diagnostic de certaines pathologies et qui reposent sur l'analyse de fluide biologiques, complexes dans leur composition, afin de doser un ou plusieurs biomarqueurs d'une pathologie donnée.

Un biomarqueur, étant un paramètre permettant de caractériser un état physiologique, un état pathologique, l'évolution d'une maladie ou la réponse à un traitement, est un élément indispensable pour établir un diagnostic plus précoce notamment dans le cas des maladies neurodégénératives qui sont connues pour leur progression lente dans le temps.

La phosphorylation est impliquée dans plusieurs pathologies humaines telles que les maladies neurodégénératives ou encore le cancer. Plusieurs phosphoprotéines ont été identifiées comme étant biomarqueurs potentiels de ces maladies telle que la protéine Tau phosphorylée, biomarqueur potentiel de la maladie d'Alzheimer. Il est donc nécessaire de pouvoir les analyser avec des seuils de sensibilité bas pour améliorer les diagnostics actuels. Cependant, étant peu abondantes dans les liquides physiologiques, les phosphoprotéines nécessitent une étape de préconcentration afin d'enrichir en protéines phosphorylées cibles et éliminer les interférents et ainsi augmenter la sensibilité de l'analyse.

Une des techniques de préconcentration les plus utilisées en microsystèmes est celle basée sur l'extraction sur phase solide (SPE). Les monolithes sont particulière-

ment intéressants comme support solide de préconcentration notamment pour leur intégration et leur synthèse relativement facile au sein de ces dispositifs. Toutefois, malgré leurs nombreux avantages, les monolithes n'ont pas été largement exploités pour la préconcentration de protéines, en particulier les phosphoprotéines, en microsystème analytique. Le premier article portant sur ce thème est apparu en 2011¹.

C'est dans ce cadre que se situe mon travail de thèse qui a consisté principalement à concevoir un module de préconcentration par IMAC (Immobilized Metal affinity Chromatography) de phosphoprotéines sur une phase monolithique afin de pouvoir ensuite l'intégrer en amont d'un module de séparation par électrophorèse de zone au sein d'un même dispositif microfluidique. Un tel dispositif a pour finalité de préconcentrer des biomarqueurs phosphorylés à partir d'échantillons biologiques complexes afin de contribuer au développement d'outils miniaturisés contribuant notamment au diagnostic précoce de certaines maladies notamment les maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer.

La première partie de ce mémoire consiste en une étude bibliographique dédiée aux différents thèmes clés indispensables à la compréhension de l'objectif final de la thèse.

Le premier chapitre bibliographique porte sur l'état de l'art des microsystèmes analytiques. Nous présentons ainsi les différents matériaux utilisés pour la microfabrication des dispositifs miniaturisés d'analyse ainsi que leurs avantages et inconvénients, principalement le verre et les matériaux polymériques tels que le polydiméthylsiloxane. Nous développons également les différentes techniques de microfabrication des microsystèmes analytiques aussi bien les techniques dites "dures" que les "douces".

A la suite de cette première partie est présentée une revue. Celle-ci a été rédigée en collaboration avec l'équipe et fait l'objet du deuxième chapitre bibliographique. Elle porte sur les avancées consacrées à l'analyse de protéines en microsystèmes entre 2007 et 2010.

Nous y avons notamment détaillé l'impact du flux électroosmotique ainsi que des traitements de surface sur la séparation électrophorétiques de protéines en microsystèmes. Dans cette partie sont également présentés les différents modes de préconcentration et de détection de protéines dans ces dispositifs. Enfin, nous présentons les différentes techniques de séparation de protéines dans les microsystèmes analytiques.

L'état de l'art de la préconcentration, sur phase solide, de protéines au sein des microsystèmes analytiques est ensuite détaillé dans le troisième chapitre. Nous y introduisons alors le principe de ce mode de préconcentration puis nous présentons les monolithes organiques comme support solide de préconcentration en détaillant leur mode de synthèse ainsi que leurs avantages et inconvénients. Nous détaillons également les quelques exemples de la littérature portant sur la préconcentration de

1. HuiWang, Jicheng Duan, Hongjiu Xu, Liang Zhao, Yu Liang, Yichu Shan, Lihua Zhang, Zhen Liang, and Yukui Zhang. Monoliths with immobilized zirconium ions for selective enrichment of phosphopeptides. *Journal of Separation Science*, 34(16-17) :2113-2121, 2011.

protéines sur phases monolithiques puis sur phases particulières en microsystèmes.

Le dernier chapitre de cette partie bibliographique est dédié à la phosphorylation et aux biomarqueurs. Nous présentons quelques généralités sur les phosphorylations des protéines ainsi que les techniques d'enrichissement et d'analyse de biomarqueurs phosphorylés. Dans cette partie, nous définissons les biomarqueurs et citons comme exemple la protéine Tau phosphorylée, biomarqueur potentiel de la maladie d'Alzheimer.

La partie expérimentale de ce travail de thèse comporte trois chapitres présentant les principaux résultats et études effectuées. Le chapitre 5 est consacré à l'optimisation de la polymérisation d'un monolithe poly(EGMP-co-BAA) qui sera utilisé comme matrice de préconcentration de phosphoprotéines par IMAC. Le choix de ce monolithe, en particulier, est principalement dû à la présence de groupements phosphate dans la matrice et qui, grâce à leur affinité aux ions métalliques, permettent une immobilisation efficace de ces derniers et par la suite un chargement satisfaisant de l'échantillon. L'optimisation a été réalisée en format capillaire pour simplifier les étapes de caractérisation qui ont porté principalement sur la morphologie ainsi que les propriétés physiques du monolithe, notamment sa perméabilité et sa surface spécifique.

Le chapitre 6 de ce travail est dédié aux différentes tentatives de transposition de la synthèse du monolithe préalablement optimisée au sein d'un microcanal en PDMS.

La synthèse in-situ du monolithe organique poly(EGMP-co-BAA) au sein du canal en PDMS a constitué un défi important de ce travail. En effet, selon la littérature, la polymérisation d'un monolithe dans le PDMS est fortement inhibée par la perméabilité importante du PDMS à l'oxygène aussi bien que par sa forte hydrophobie. Peu de travaux ont reporté avec succès à ce jour la polymérisation d'un monolithe organique au sein d'un dispositif en PDMS^{2 3 4 5}. Cependant, cette polymérisation manque de reproductibilité ce qui explique le peu d'articles portant ce sujet dans la littérature. Nous avons alors choisi de tester un certain nombre de solutions reposant sur des traitements, dont certains n'ont pas été décrits auparavant et visant généralement à hydrophiliser la surface du PDMS. Au cours de ce travail, nous avons choisi de ne pas tester les traitements de surface basés sur les modifications par greffage chimique qui jusqu'à présent, restent les seules approches proposées dans la littéra-

2. Mohamed F. Bedair and Richard D. Oleschuk. Fabrication of porous polymer monoliths in polymeric microfluidic chips as an electrospray emitter for direct coupling to mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 78(4) :1130-1138, 2006.

3. Jeffrey M Burke and Elisabeth Smela. A novel surface modification technique for forming porous polymer monoliths in poly(dimethylsiloxane). *Biomicrofluidics*, 6(1) :016506-016506-10, March 2012.

4. Karine Faure, Maximilien Blas, Omar Yassine, Nathalie Delaunay, Gérard Crétier, Monique Albert, and Jean-Louis Rocca. Electrochromatography in poly(dimethyl)siloxane microchips using organic monolithic stationary phases. *ELECTROPHORESIS*, 28(11) :1668-1673, 2007.

5. HuiWang, Jicheng Duan, Hongjiu Xu, Liang Zhao, Yu Liang, Yichu Shan, Lihua Zhang, Zhen Liang, and Yukui Zhang. Monoliths with immobilized zirconium ions for selective enrichment of phosphopeptides. *Journal of Separation Science*, 34(16-17) :2113-2121, 2011.

ture et permettant la polymérisation, bien que non reproductible, de monolithe au sein des microsystèmes en PDMS.

Dans une première partie de ce chapitre, nous développons les optimisations réalisées sur le processus de microfabrication des microsystèmes en PDMS et en deuxième partie, nous détaillons les différentes stratégies de traitement de surface réalisées pour la transposition de la polymérisation in-situ du monolithe.

Le chapitre 7, dernier chapitre du mémoire, porte sur l'optimisation des différentes étapes d'enrichissement de phosphoprotéines par IMAC en format capillaire en prenant comme exemple un phosphopeptide modèle dérivé par un agent fluorophore. Les différentes étapes de l'IMAC ont été optimisées après avoir rappelé brièvement son mode et son principe. Ce module d'IMAC a été par la suite transposé sur un microsystème en verre.

Microsystèmes séparatifs : Description et technologie

1.1 Introduction

La biologie vit actuellement une révolution proche de celle de l'informatique à la manière des microprocesseurs, dans les années 1970. Les unités de calcul qui occupaient des pièces entières sont réduites aujourd'hui à quelques millimètres carrés. Il en sera vraisemblablement de même demain pour les laboratoires de biologie. Les analyses biologiques du futur utiliseront alors les biopuces, qui permettront grâce à la miniaturisation, d'accroître le parallélisme, les vitesses de réaction et le débit de plusieurs ordres de grandeur, tout en réduisant les coûts de manière phénoménale. Une des spécificités de ces microsystèmes dédiés à la biologie (systèmes complexes dont les dimensions caractéristiques varient du micromètre à quelques centaines de micromètres) est que quasiment tous utilisent des fluides spécifiques qu'il faut analyser, faire interagir, ou simplement mettre en contact avec des entités vivantes pour que celles-ci restent fonctionnelles. On parle alors de systèmes microfluidiques, systèmes constitués de canaux dont la largeur et la profondeur sont généralement de quelques dizaines de microns.

La figure 1.1 présente quelques ordres de grandeurs concernant les systèmes miniaturisés. La voie ascendante dans le monde du vivant ou encore "bottom up" juxtapose des entités de type nanométrique pour constituer un objet macroscopique. Au contraire, la voie technologique descendante dans le monde artificiel ou "top down" décrit des technologies existantes à leurs limites de résolution.

Les microsystèmes les plus matures sont sans aucun doute les microsystèmes utilisant le silicium. Citons à titre d'exemple, les micro-accéléromètres présents dans toutes les voitures afin de déclencher les airbags, les consoles de jeu ou le téléphone portable. Cependant, le silicium reste cher (15 euros la plaquette non processée), cassant et non transparent dans le visible. Il est donc peu adapté aux applications en biologie.[24, 28, 13, 7, 14, 39, 11]

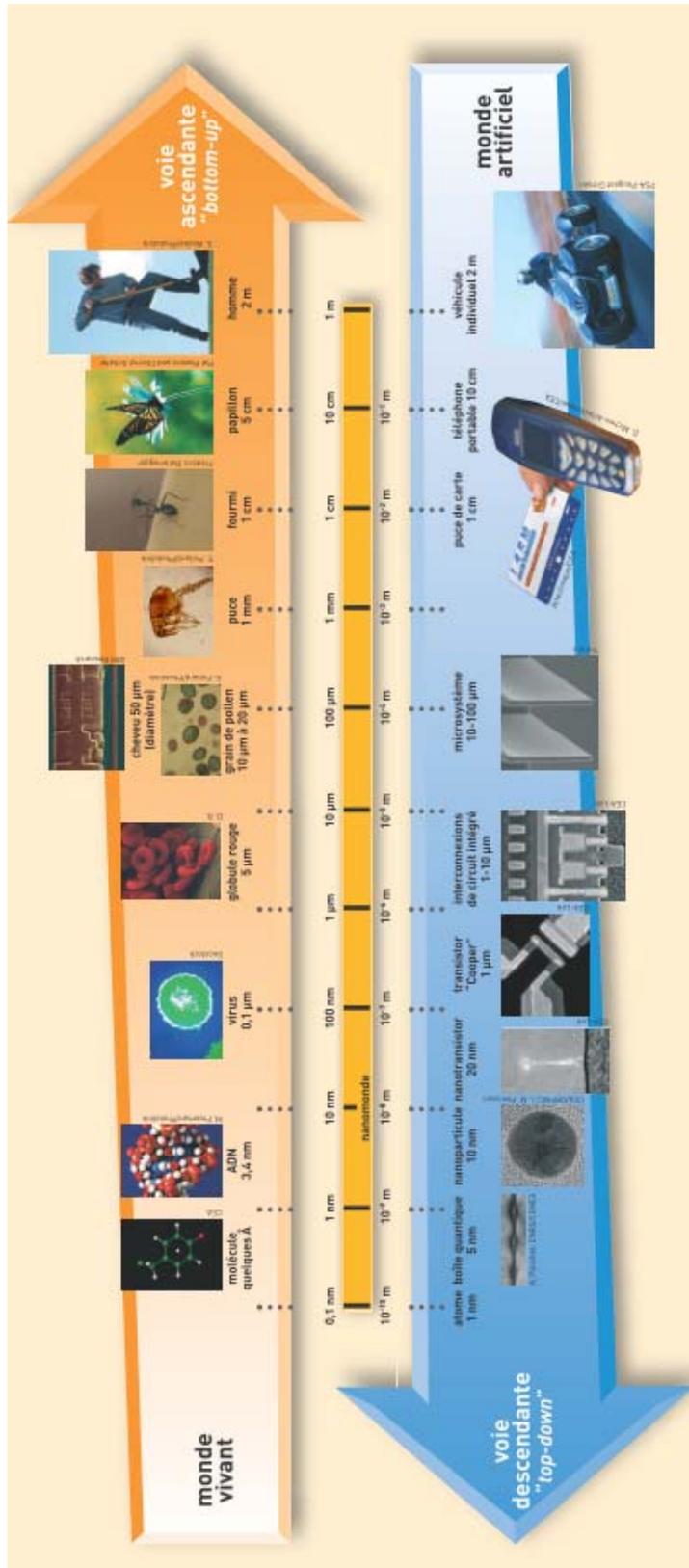


FIGURE 1.1 – Dimensions caractéristiques des dispositifs microfluidiques par rapport à quelques éléments biologique

Aussi, dès le début des années 90, les biologistes ont été amenés à développer des technologies à bas coût sur des surfaces limitées de verre et de plastique pour le développement de microdispositifs spécifiques. C'est ainsi que le groupe de Manz a réussi à développer, pour la première fois, un Micro-TAS (Micro Total Analysis Systems, microsystemes d'analyse totale) pour la décomposition et l'analyse de mélanges sur une surface $< 15 \text{ cm}^2$. Une différence de potentiel peut alors être appliquée entre les électrodes de platine fixées à l'extrémité des capillaires. Un mélange est d'abord dilué, le cas échéant dérivé, et finalement conduit dans les capillaires d'électrophorèse. Les énergies d'électrophorèse et d'électro-osmose, qui agissent dans le système, conduisent rapidement les différentes substances du mélange vers le détecteur, à travers les tubes capillaires, ce qui provoque leur séparation selon un mode électrophorétique.

Dans cette démarche de miniaturisation, les premiers prototypes, réalisés par usinage du verre ou du silicium, ont profité d'une large expérience acquise par la microélectronique. Cependant, ces procédés souffrent d'inconvénients majeurs qui se résument en une certaine incompatibilité des technologies entre elles, en outre, la difficulté d'intégrer dans une même puce le canal microfluidique et le microsysteme conventionnel (capteurs, actionneurs). De plus, les larges surfaces nécessaires au réseau microfluidique induisent un coût de fabrication trop important. C'est indéniablement avec les technologies polymère, introduites au milieu des années 90, que la microfluidique prend tout son essor, en particulier celles qui utilisent le polydiméthylsiloxane (PDMS), le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), ou la résine SU-8. Aussi, l'adaptation des techniques de moulage de polymères (coulage du PDMS, emboutissage à chaud du PMMA,...) et l'utilisation de résines photosensibles épaisses (SU-8, polyimides,...) ont ouvert la voie aux microsystemes hybrides. Dans ce chapitre, nous présentons en première partie les différents matériaux utilisés pour la microfabrication des microsystemes analytiques et en deuxième partie, les techniques dures et douces de microfabrication.

1.2 Matériaux utilisés pour la microfabrication et leurs propriétés

Comme nous venons de le voir, actuellement les microsystemes analytiques sont principalement réalisés en silicium, en verre ou en polymères.[30, 11, 3, 20, 38, 10]

Le silicium présente des caractéristiques bien connues et les processus de microfabrication sont bien établis, permettant ainsi la fabrication de dispositifs extrêmement fiables à des précisions submicrométriques. Il possède également des caractéristiques physicochimiques compatibles avec un grand nombre de procédés ainsi qu'une anisotropie intéressante pour la microfabrication. Cependant, le silicium présente quelques inconvénients majeurs que nous avons déjà mentionnés. Il s'agit d'un matériau absorbant dans le visible ne permettant donc pas une détection UV-Visible ou par fluorescence. Il est également non isolant et ne supporte pas les milieux trop alcalins.

Le verre, quant à lui, est un matériau tout particulièrement intéressant pour les applications chimiques et biologiques. C'est un très faible conducteur ionique, transparent dans le domaine de l'UV au visible, ce qui autorise la détection des molécules en observant à travers le substrat. Il s'agit également d'un matériau dur et assez inerte chimiquement. Cependant, le verre présente un inconvénient majeur ; sa technologie est peu développée et très spécifique, ce qui augmente considérablement son coût de fabrication.

Les microsystèmes pour la biologie qui utilisent les polymères ont connu un essor considérable depuis les années 2000. Ils sont généralement de bons isolants électriques mais peuvent s'il le faut être chargés par des micro et nano-matériaux appropriés pour les rendre conducteurs ou encore changer leurs propriétés magnétiques ou chimiques (circuits 3D MID, micro-échangeurs thermiques, microsystèmes fluidiques pour la séparation et le dosage, microsystèmes sur supports souples). Ces polymères sont peu coûteux, le prix du PMMA étant 10 à 100 fois moins cher que celui du verre. Plusieurs polymères, comme le PDMS et le PMMA sont biocompatibles d'où l'intérêt de leur utilisation avec les fluides biologiques. Le polyimide (PI), le polystyrène (PS) et le polypropylène (PP) sont également largement utilisés. L'ensemble de ces polymères ainsi que leurs propriétés physico-chimiques sont présentés dans le tableau 1.1. Les valeurs sont données à titre indicatif et peuvent varier d'un fournisseur à l'autre.

Le choix de la technologie de microfabrication dépend de la nature du matériau et de ses propriétés. Les caractéristiques des polymères sont principalement dictées par le type de liaisons existant entre les chaînes[12]. Les polymères thermoplastiques, comme le PMMA ou le polycarbonate (PC), sont composés de chaînes qui ne sont pas ou très faiblement liées entre elles. Ces polymères sont mous quand ils sont chauffés et durcissent quand ils sont refroidis. La température de transition vitreuse T_g , décrite comme l'intervalle de température dans lequel la matière passe d'un état caoutchouteux à un état vitreux et rigide, est un paramètre important pour la microfabrication comme cela sera détaillé ultérieurement dans ce chapitre. Rappelons ici que la plupart des polymères thermoplastiques sont solubles dans des solvants spécifiques.

Les polymères thermodurcissables tel que le polyuréthane, sont des polymères réticulés, c'est-à-dire que des liaisons covalentes sont créées entre les chaînes. Sous l'effet de la température, les molécules sont peu mobiles et le polymère peut difficilement être dissout. Ce processus de polymérisation n'est généralement pas réversible. Ces matériaux doivent donc être mis en forme avant la réticulation sous l'action conjuguée d'un initiateur et de la température ou de la lumière par exemple.

Les élastomères thermoplastiques présentent des liaisons intermoléculaires de nature ionique. Le réseau tridimensionnel peut donc être cassé en chauffant et reconstruit en refroidissant.

Le polyétherétherkétone (PEEK), par exemple, est un matériau très résistant chimiquement. Des thermoplastiques comme le copolymère cyclooléfine (COC), le PMMA, le PC et le PDMS sont considérés comme optiquement transparents sur une large gamme de longueur d'onde, ce qui les rend compatibles avec de nom-

Tableau 1.1 – Propriétés des différents polymères utilisés pour la microfabrication de microsystèmes analytiques

Abbré- via- tion	Nom	Tg (°C)	Résistance (Ωcm^{-1})	Absorp- tion de l'eau (%)	Indice de réfraction	Résistant aux	Non résistant aux	Résistance aux orga- niques
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle	110	1.10^{15}	2	1492	Acides, bases, huile, pétrole	Alcools, acétone, radiation UV	Attaqué par la plupart des solvants (e.g. acétone, benzène, dichlorométhane)
PC	Polycarbonate	148	1.10^{14}	0.30	1.58-1.6	Alcools, acides	Hydrocarbures, cétones, KOH	Attaqué par la plupart des solvants (e.g. acétone, tétraline, décaline)
PP	Polypropylène	0-10	$> 1.10^{14}$	0.01-0.1	1.49	Acides, bases, Alcool, solvants organiques	Pétrole, benzole, hydrocarbures	Attaqué par la plupart des solvants (e.g. acétone, benzène, dichlorométhane)
PS	Polystyrène	100	1.10^{16}	< 0.4	1.59	Bases, alcools	acides, éthers, hydrocarbures	Attaqué par la plupart des solvants (e.g. acétone, benzène, dichlorométhane)
PE	Polyéthylène	110/140	1015-1018	< 0.015	1.51	Acides, bases	alcools, huile	Hydrocarbures Trichlorobenzoylé, hexane
COC	Copolymère Cyclooléfinique	78	$> 1.10^{14}$	0.01	1.53	Acides, bases		
COP		138	$> 1.10^{17}$	0.01	1.525			
PEEK	Polyéther-éther-cétone	143	$> 1.10^{16}$	0.5		Plusieurs substances organiques et inorganiques	acid nitrique, acid sulfurique, UV, THF	
PDMS	Polydiméthylsiloxane	-120	$1, 2.10^{14}$	0.1	1.43	acides faibles, bases	acides forts, hydrocarbures	
SU-8		210	$2, 8.10^{16}$		1.58	Acides, bases, plusieurs solvants		
PI	Polyimide	360-410	$> 1.10^{12}$	2.9-4	1.7	Acides, bases, solvants		

breuses méthodes de détection, notamment la mesure d'absorbance en UV/visible ou de fluorescence. Enfin, le PDMS est biologiquement inerte, perméable à l'air et stérilisable à haute température. Ceci rend possible la culture cellulaire ainsi que la manipulation de produits biologiques dans les dispositifs constitués de ce matériau. Sa facilité de microfabrication permet aussi l'intégration de plusieurs modules de traitement de l'échantillon au sein d'un même dispositif. Toutes ces propriétés font du PDMS un matériau intéressant pour les dispositifs microfluidiques dédiés à l'analyse et la manipulation d'échantillons biologiques. Toutefois, le PDMS possède certains inconvénients tels que son hydrophobie élevée et son gonflement.

Une comparaison des propriétés des matériaux polymères par rapport à celles du silicium et du verre est présentée dans le tableau 1.2.

1.3 Microfabrication des microsystèmes analytiques

Le développement des systèmes microfluidiques est conjoint à celui de la technologie associée. Principalement à base de silicium, les MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) ont vu leur domaine d'application s'étendre aux systèmes fluidiques grâce à la mise au point de méthodes de gravure profonde et de collage, permettant de creuser des canaux dans un substrat puis de les refermer à l'aide d'un couvercle étanche. Parallèlement aux techniques de microélectronique, il est apparu à la fin des années 1990 des techniques dites "douces" permettant de réaliser des canaux dans des élastomères ou des plastiques.

Le choix du matériau, et donc de la technologie est généralement régit par l'application visée. Les critères de choix les plus drastiques sont les contraintes géométriques (sections compatibles avec les autres composants du système, longueur, section du canal et la nature de la surface qui doit être compatible avec le fluide utilisé et réactive lors de l'étape technologique visée), l'accessibilité du canal aux rayons lumineux pour permettre certaines caractérisations (cas des méthodes colorimétriques ou fluorimétriques, par exemple), la rugosité du matériau, sa perméabilité et sa résistance à la pression.

Ces matériaux doivent être "façonnés" afin de pouvoir réaliser le composant.

1.3.1 Les principales étapes des technologies dites "dures"

La dénomination "dure" des technologies concerne les technologies issues de la microélectronique. Ces technologies sont souvent réservées aux matériaux inorganiques comme le verre et surtout le silicium. Ces techniques basées sur la gravure, la lithographie et le dépôt, s'appliquent dans un domaine d'échelle allant de 0,2 à 500 μm .

1.3.1.1 La Lithographie

La lithographie est le procédé central dans toute technologie de microfabrication (dure et douce) dans le cas de structuration à faible échelle. Elle consiste à éclai-

Tableau 1.2 – Comparaison des différents matériaux utilisés dans la microfabrication de microsystèmes analytiques

	Silicium	Verre	Polymères thermoplastiques (e.g. PMMA, PC, PEEK)	Polymères thermodurcissables	Elastomères
Microfabrication	Facile-Moyenne	Facile-Moyenne	Facile	Moyenne	Facile
Géométries possibles	Limitée, 2D	Limitée, 2D	Plusieurs, 2D, 3D	Généralement 2D, 3D possible	Généralement 2D, 3D possible
Assemblage	Facile	Moyenne	Facile	Moyenne	Facile
Stabilité mécanique	Elevée	Elevée	Faible-moyenne	Elevée	Très faible
Résistance à la température	Elevée	Elevée	Faible-moyenne	Moyenne	Faible
Résistance aux acides	Elevée	Elevée	Elevée	Elevée	Elevée
Résistance aux bases	Limitée	Elevée	Elevée	Elevée	Elevée
Résistances aux solvants organiques	Elevée	Moyenne-élevée	Faible-moyenne	Moyenne-élevée	Faible
Transparence optique	Opaque	Elevée	Souvent élevée	Partielle	Elevée
Prix du matériau	Moyen	Moyen-élevé	Faible-moyen	Moyen	Faible

rer par une source de rayonnement, à travers un masque, une résine préalablement déposée sur un substrat à une certaine gamme de longueur d'onde. Le masque est constitué d'un matériau transparent dans cette même gamme de longueur d'onde et recouvert de motifs absorbants. Dans le cas le plus répandu, la source d'éclairage est une lampe à vapeur de mercure ($\lambda = 300$ à 450nm) et les masques sont constitués d'une plaque de verre recouverte de chrome. Dans ces conditions, la limite de résolution du procédé de lithographie est de l'ordre de $2\mu\text{m}$ ce qui est particulièrement bien adapté au domaine de la microfluidique. En effet, un bon contrôle des écoulements et une bonne reproductibilité ne peuvent être assurés que dans des systèmes dont les dimensions sont parfaitement définies. Lorsque les résolutions visées sont plus faibles, on est alors obligé de diminuer la longueur d'onde (la résolution étant directement proportionnelle à celle-ci) et donc d'utiliser des électrons ou rayons X. Dans tous les cas, le rayonnement sensibilise partiellement une résine qui, sous l'impact du faisceau d'éclairage, deviendra soluble ou insoluble dans une solution chimique appelée développeur.

Le procédé de lithographie repose essentiellement sur trois étapes :

- L'enduction de la résine
- L'insolation
- Le développement

La figure 1.2 est un schéma général résumant les trois étapes essentielles du procédé de lithographie.

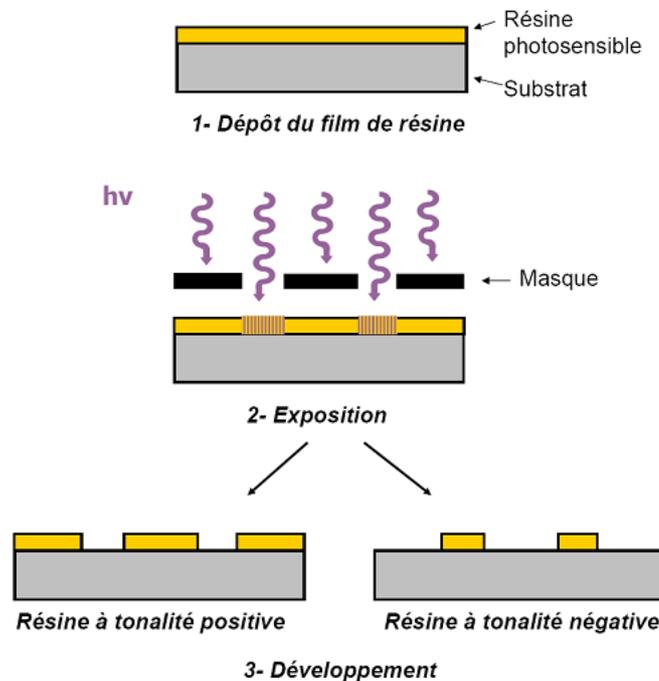


FIGURE 1.2 – Les trois étapes de la lithographie

L'enduction : le dépôt du polymère photosensible est généralement réalisé sur le substrat solide de verre ou de silicium à l'aide d'une tournette appelée également "spinner" en anglais. Il s'agit d'un disque tournant à grande vitesse qui permet l'étalement homogène de la résine initialement déposée au centre. L'épaisseur du film obtenue est ainsi uniforme et est fonction de la vitesse de rotation du substrat et de la viscosité de la résine. Ce procédé est schématisé à la figure 1.3. Des épaisseurs de quelques dizaines de nm à quelques dizaines de μm peuvent ainsi être déposées. Dans le cas des résines les plus épaisses, un bourrelet indésirable apparaît en périphérie. Celui-ci est à éliminer avant l'étape d'insolation.



FIGURE 1.3 – Etapes d'enduction de résine : (a) dépôt d'une goutte de résine au milieu du substrat ; (b) préétalement à 500 rpm pendant 10s ; (c) étalement à 1000-4000 rpm pendant 30s pour obtenir l'épaisseur voulue

Après l'étalement de la résine, celle-ci est encore sous forme liquide à la surface des substrats. On effectue alors un recuit afin d'évaporer le solvant et obtenir un film bien solide (soft bake). Il est à noter que dans le cas de résines très épaisses (plusieurs dizaines de μm), on peut également utiliser des films fournis sous forme de feuillets à appliquer directement sur le substrat.

L'insolation : après enduction, la résine est exposée à un flux lumineux à travers le masque de photolithographie. Ce flux lumineux initie des réactions physico-chimiques dans la résine qui modifient sa solubilité vis-à-vis de certains solvants. Il existe deux types de résine : les résines positives et les résines négatives.

- Les résines positives : par exemple AZ et le DQN (mélange de diazoquinone avec une résine phénoline novolak). Durant l'exposition, une transformation photochimique se produit (réarrangement de Wolf) et un groupement carboxylique apparaît alors sur une terminaison du fragment sensibilisé. Les parties insolées deviennent ainsi acides, le reste de la structure restant globalement inerte.
- Les résines négatives : (SU8 par exemple) : D'une manière générale, ces résines adhèrent mieux aux substrats que les résines positives et sont plus résistantes chimiquement. L'effet de la lumière permet la formation de liaisons covalentes entre les chaînes principales et secondaires. La résine se polymérise ainsi sous l'effet du rayonnement pour devenir insoluble. La résolution obtenue est cependant généralement moins bonne par rapport à l'utilisation de résines positives, la taille du grain élémentaire du matériau étant de l'ordre du micromètre.

L'intérêt principal de cette technologie est qu'en une seule étape, un grand nombre de structures peuvent être sensibilisées. On parle ainsi de procédé collectif de microfabrication qui permet une diminution drastique des coûts. Lorsque l'on

désire des résolutions inférieures au micromètre, cet éclairage collectif devient délicat. On est alors souvent amené à utiliser le balayage de la surface par un faisceau d'électrons ce qui augmente considérablement la durée de l'étape d'insolation et donc le prix de revient. On peut cependant garder le caractère collectif en utilisant un rayonnement synchrotron comme source d'éclairage et utiliser des masques adaptés. Là encore, le prix de revient de l'étape de lithographie reste lui aussi très élevé.

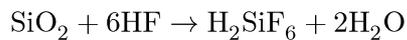
Le développement : il s'agit de l'étape de révélation des motifs latents dans la résine. Dans le cas des résines positives, le développeur est généralement une solution basique qui élimine les motifs de nature acide. Dans le cas des résines négatives, le développeur s'infiltré au niveau des grains de polymère non insolé et élimine ainsi ces parties.

1.3.1.2 Les techniques de gravure

La gravure est le procédé qui permet d'éliminer de la matière au niveau du substrat. Le principe consiste à rendre volatil ou soluble le matériau à éliminer en effectuant une gravure chimique, physique ou physico-chimique. Ce processus est généralement localisée en utilisant un masque de gravure en résine photosensible réalisé par lithographie.

La gravure humide : la gravure humide est encore de nos jours très couramment utilisée car sa mise en place est relativement simple et son prix de revient est donc faible. Elle permet ainsi un traitement de plusieurs échantillons en même temps, d'où un gain de temps considérable (industriellement, on peut traiter jusqu'à 200 plaquettes simultanément).

A titre d'exemple, pour les substrats en verre, l'agent d'usinage classiquement utilisé est l'acide fluorhydrique (HF) qui dissout la silice selon la réaction suivante :



La gravure humide est douce et il en résulte très peu de défauts structuraux. Cependant, elle est de nature chimique donc quasi-isotrope (c'est-à-dire que la vitesse d'attaque est quasiment la même dans toutes les directions de l'espace). Elle est sensible à l'état de surface et le contrôle de la vitesse est délicat à cause de la forte influence de l'agitation nécessaire pour renouveler les réactifs en surface. De plus, l'isotropie limite fortement la résolution des motifs ainsi que l'accessibilité aux profondeurs souhaitées.

Dans le cas d'un cristal comme le silicium, la gravure peut être anisotrope en utilisant de l'hydroxyde de potassium (KOH) ou le tétraméthyl ammonium hydroxyde (TMAH) ce qui permet de créer des motifs définis par l'orientation des plans cristallographiques.

La gravure sèche : le principe consiste à générer des espèces volatiles quittant ensuite la surface pour intégrer la phase gazeuse. Généralement, l'échantillon est placé devant un faisceau d'ions ou est immergé dans un plasma. En présence de gaz neutres, des ions bombardent la surface en pulvérisant les atomes du substrat, on parle alors de gravure physique. La gravure est très fortement anisotrope et permet d'obtenir des flancs très verticaux. Mais les vitesses de gravures sont faibles et la gravure est peu sélective.

Pour palier ces inconvénients, on peut effectuer une gravure physico-chimique (figure 1.4). Le substrat est alors inséré dans un plasma de gaz réactifs tels que SF_6 et CF_4 pour le silicium. Les ions dans la décharge pulvérisent la surface et les radicaux permettent également la constitution d'espèces volatiles. Cette technique est appelée RIE (Reactive Ion Etching) en anglais et est de plus en plus utilisée.

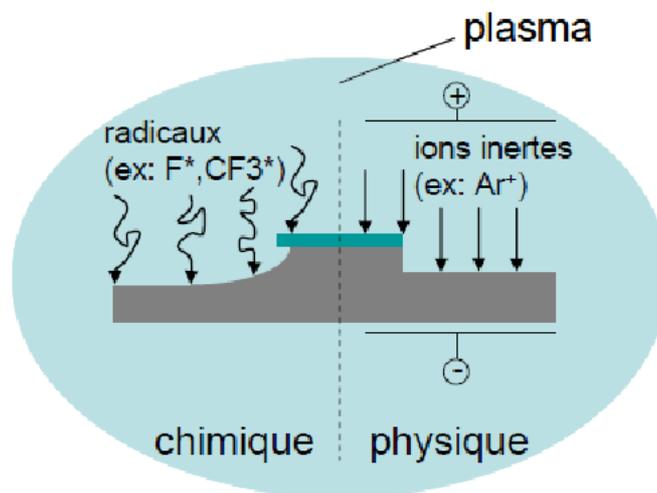


FIGURE 1.4 – Exemple de quelques composantes physiques et chimiques en gravure sèche

Notons que plus récemment, a également été développée la gravure profonde DRIE (Deep Reactive Ion Etching) qui permet de traverser une plaquette de silicium avec une très forte anisotropie et donc d'obtenir des rapports d'aspect très importants. Elle consiste en une alternance d'une étape de gravure par bombardement d'un plasma d'hexafluorure de soufre (SF_6) et d'une étape de protection par dépôt d'une fine couche de fluoro-carbone (C_4F_8). Cette technique, contrairement à la gravure humide anisotrope, est indépendante de l'orientation cristalline du matériau à graver.

1.3.1.3 Les techniques de soudure

La soudure, ou "Bonding" en anglais, constitue généralement la dernière étape de la microfabrication pour un système microfluidique. Elle assure l'étanchéité des

canaux dans lesquels circulent les fluides. Pour effectuer un collage verre-silicium, verre-verre ou silicium-silicium, deux types de techniques sont principalement utilisées : la fusion et la soudure anodique.

Le collage par fusion : le “bonding” par fusion thermique est la technique la plus courante. Elle consiste à chauffer deux substrats de verre mis en contact juste au dessus de leur température de transition vitreuse. Une fois revenus à température ambiante, l’étanchéité du système est assurée par la fusion des couches superficielles des deux substrats. L’avantage de cette technique est double, elle permet de réaliser des systèmes entièrement en verre, et donc transparents, en utilisant simplement un four programmable. L’inconvénient majeur de cette technique est la nécessité d’utiliser des températures élevées. Plusieurs travaux ont également montré que la planarité, le séchage et la qualité du nettoyage sont des étapes cruciales lors du processus de collage[16, 17, 8]. Par exemple, Harisson et son équipe sont parvenus, grâce à un nettoyage parfait, à sceller deux lames de verre à température ambiante[8]. Le collage par fusion est un processus particulièrement robuste.

La soudure anodique : il s’agit d’une technique de scellement assistée par un champ électrique. Elle est typiquement adaptée au collage d’un matériau conducteur ou semi-conducteur (silicium) avec du verre riche en sodium. Le substrat de verre est placé au dessus du substrat de silicium et l’ensemble est chauffé à une température d’environ $450^{\circ}C$. Les ions Na^{+} présents dans le verre à cette température sont alors mobiles. Suite à l’application d’une différence de potentiel à l’ensemble, les ions positifs Na^{+} du verre migrent et créent une zone de déplétion à l’interface verre-silicium. Un champ intense est ainsi créé et l’oxygène du verre peut alors réagir avec le silicium pour générer une fine couche de silice et souder ainsi les deux substrats.

Afin de bien réussir cette étape de collage, il est indispensable de minimiser les déformations mécaniques entre le verre et le silicium. Il est ainsi recommandé de choisir des verres dont le coefficient d’expansion thermique est proche de celui du silicium. Le principal avantage de cette méthode est l’utilisation de faibles températures. Ainsi, on privilégie les plus faibles températures possibles. Il faut notamment veiller à la propreté extrême de l’interface et à sa grande planéité.

Par exemple, le collage à température ambiante d’une puce entièrement en verre a été réalisé avec succès par Jia et al[18]. Le processus proposé, représenté à la figure 1.5, a consisté en un ensemble de lavages des substrats de verre pour éliminer les particules solides présentes à sa surface ainsi que les contaminants organiques puis d’immerger les plaques de verre dans une solution concentrée d’acide sulfurique entre 8 et 12h. Le collage des deux substrats est par la suite réalisé à température ambiante pendant plus de 3 heures. Les performances électrophorétiques du microsystème obtenu ont révélé des résultats comparables à ceux d’un microsystème collé à haute température.

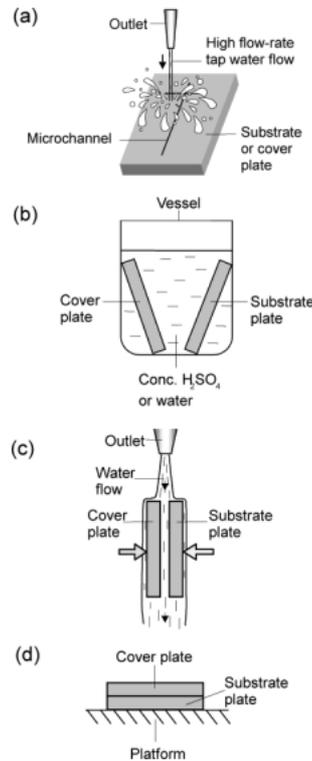


FIGURE 1.5 – Processus de collage à température ambiante proposé par Jia et al. (a) Rinçage des substrats avec de l'eau sous haut débit (10 - 20 m/s) ; (b) Immersion des substrats dans une solution concentrée de H_2SO_4 (8-12h) ou dans l'eau ; (c) mise en contact des substrats sous écoulement continu d'eau déminéralisée ; (d) Mise en contact des plaques à température ambiante pendant plus de 3 h14.[18]

1.3.2 Techniques de microfabrication "douces"

Les plastiques comme le PC, le PMMA ou encore le COC ainsi que les élastomères, et tout particulièrement le polydiméthylsiloxane (PDMS), constituent la nouvelle génération des matériaux utilisés pour concevoir des systèmes microfluidiques. Leur technologie est ainsi elle-aussi amenée à évoluer de manière croissante.

Ces technologies, dites "douces" sont basées sur le transfert de motifs en utilisant un moule qui déforme ou structure le matériau du substrat. Il existe déjà de nombreux procédés permettant une fabrication de masse. La principale force de ces technologies réside dans la possibilité de réutiliser un très grand nombre de fois un moule primaire coûteux et fabriqué par des méthodes classiques issues des technologies dures (lithographie et gravure). Cela permet, par exemple, de compenser la lenteur de l'étape de lithographie électronique. De plus, la possibilité de structurer des surfaces non planaires et en trois dimensions rendent incontournables ces nouvelles technologies pour la fabrication d'objet en masse à faible coût. Toutefois, le principal inconvénient est la fiabilité des matériaux utilisés et donc des problèmes

peuvent apparaître lorsque les structures vieillissent. Ces techniques de microfabrication ont été reportées dans de nombreux articles[4, 30, 2]

Nous détaillons ici ces technologies “douces” qui sont essentiellement basées sur le matriçage ou “embossing”, la micro-injection en plus de la technologie PDMS. Ces trois techniques sont schématisées à la figure 1.6.

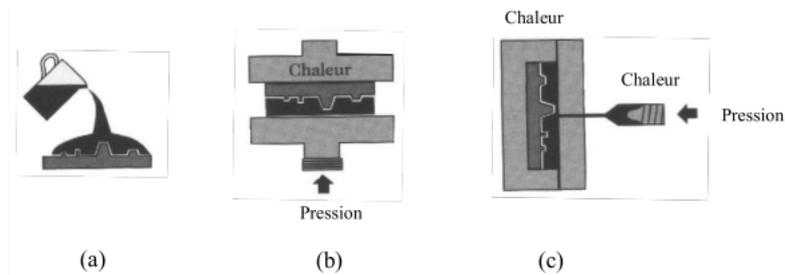


FIGURE 1.6 – Trois principales techniques de microfabrication “douce” - (a) Moulage - (b) Matriçage - (c) Micro injection

1.3.2.1 Le matriçage ou “embossing”

Le matriçage ou “embossing” est une technique principalement utilisée pour la microfabrication des microsystèmes en PMMA qui, à l’état solide, ressemble à un plastique transparent, comme le plexiglas. Le principe est très simple et consiste à déformer physiquement une couche du polymère thermoplastique par contact et pression sur un moule rigide. Ce moule est fabriqué dans un matériau dur comme le silicium ou un métal (souvent le Ni). Les motifs obtenus, préalablement définis par l’une des techniques de lithographie conventionnelles ou la lithographie électronique décrite dans le paragraphe 1.3.1.1, peuvent avoir une résolution remarquable (de l’ordre de quelques nm). L’épaisseur des structures a une grande étendue (de quelques nm au μm), et les facteurs de forme peuvent être élevés (plusieurs dizaines de nanomètres).

Cette opération est effectuée sous haute pression et à une température supérieure à la température de transition vitreuse T_g du polymère. Le succès de l’impression dépend des propriétés viscoélastiques du polymère et de l’adhérence du film au moule et au substrat. Après l’impression, le système est refroidi afin de permettre le démoulage.

La cohésion des polymères est due à 2 types de liaisons : les liaisons covalentes qui forment le squelette des longues chaînes carbonées, et les liaisons secondaires (de type Van der Waals) qui relient ces chaînes moléculaires entre elles. Pour des températures T inférieures à T_g , les liaisons secondaires relient les molécules pour former un solide amorphe, mais lorsque T est supérieur à T_g , les molécules peuvent se déplacer les unes par rapport aux autres. Cette “liquéfaction” du polymère permet au moule rigide de déformer le film polymère qui va porter en négatif les motifs du moule. Un simple retour à une température inférieure à T_g permet la conservation

des motifs imprimés. Ceux-ci doivent donner lieu à un contraste d'épaisseur raisonnable pour la suite du procédé de fabrication. Le transfert des motifs imprimés dans l'épaisseur totale de la couche de polymère peut ensuite être assuré par une étape de gravure ionique réactive. Cette technique est bien appropriée au prototypage et à la production de moyennes séries.

Certaines équipes peuvent adapter ce procédé générique. Myra et al. ont ainsi proposé une technique de production en masse de puces en PMMA et en PC[21]. Il s'agit principalement de la conception d'un master conçu en résine SU8 sur un substrat de poly(éther imide) PEI en utilisant les techniques classiques de lithographie. Le polymère (PC ou PMMA) est ensuite matricé sur le master et le collage est réalisé dans différents types de solvants selon la nature du matériau utilisé (puce PMMA-PMMA ou PMMA-PC).

Zhibing et al. ont proposé une nouvelle technique de matriçage à chaud du PMMA sans recourir à l'utilisation d'un master[15]. Le processus proposé consiste à serrer des fils électriques entre des plaques de PMMA. Sous une pression de 100 kPa et par application de tensions, les fils électriques génèreront la chaleur nécessaire pour la création des canaux à la surface du PMMA avec une faible déformation dans le volume du polymère. Le collage a été réalisé thermiquement. Une séparation de potassium, sodium et lithium (1mM) a été menée avec succès sur ce microsystème à pH 8 avec un flux électroosmotique de $2,27 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, ce qui correspond aux valeurs décrites dans la littérature.

1.3.2.2 La Micro-injection

La micro-injection est une technique héritée de la plasturgie. Elle consiste en une injection du matériau plastique liquide, à une température supérieure à sa température de transition vitreuse et sous pression, dans un moule sous vide (Figure 1.6 (c)). La pièce devenue solide est, par la suite, démoulée après refroidissement du système en dessous de la température de transition vitreuse. La technique est généralement lente, les moules sont délicats à réaliser et l'optimisation est complexe. Néanmoins, cette technique est intéressante d'un point de vue industriel, pour les productions en masse. Elle permet également l'obtention de dispositifs tridimensionnels.

1.3.2.3 Le moulage

Le moulage est, de loin, la technologie la plus utilisée pour la fabrication des dispositifs microfluidiques de PDMS. De nombreux articles et revues détaillent ces technologies, particulièrement intéressantes pour le prototypage rapide des structures en PDMS[4, 1, 33, 2, 31]. Le PDMS polymérisé, présenté en figure 1.7, est un plastique très facile à manipuler. Les principales propriétés du PDMS ont été rappelées dans le tableau 1.1.

Ce plastique retrouve sa forme après la plupart des déformations mécaniques et permet un démoulage facile sans risque d'abîmer le moule. Les répliques de structures à l'échelle de la centaine de nanomètres ou de la centaine de micromètres ont été réalisées avec une grande fidélité[22].

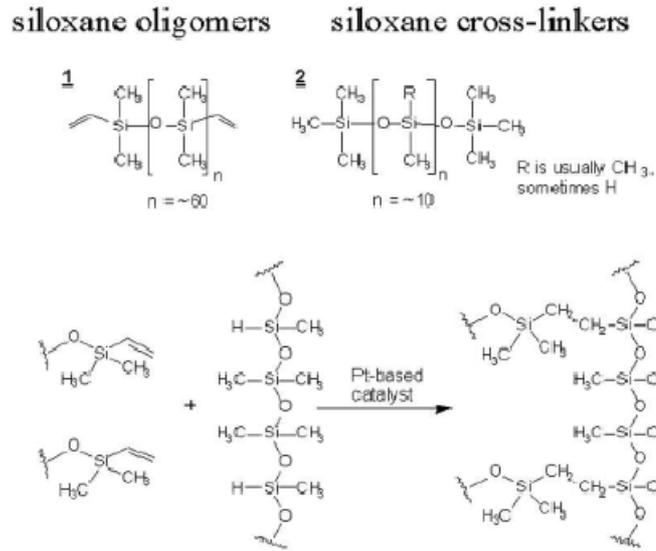


FIGURE 1.7 – Réaction de réticulation du PDMS

Le micromoulage est également appelé “lithographie molle” ou “soft lithography” en anglais[40]. Il s’agit de mouler le monomère polymérisable sur une surface microstructurée pour former une empreinte de ces structures sur l’élastomère polymérisé. Il s’en suit l’assemblage du bloc d’élastomère sur un substrat choisi. Après démoulage, l’empreinte négative du moule constitue les canaux microfluidiques qu’il faut ensuite fermer.

La figure 1.8 présente les étapes de fabrication d’un système microfluidique en PDMS.

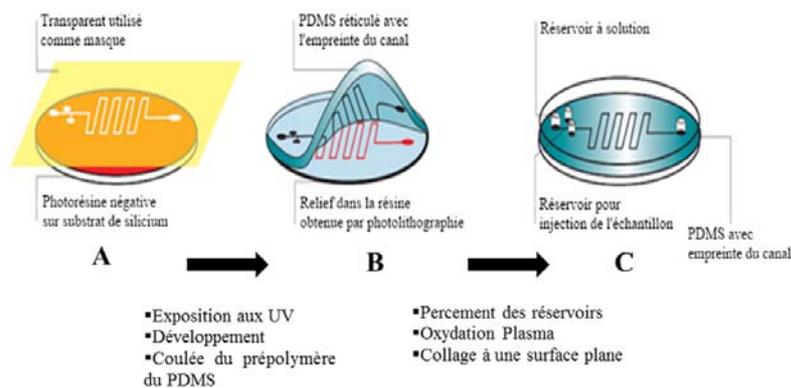


FIGURE 1.8 – Les étapes de fabrication par “lithographie douce” d’un système microfluidique en PDMS

L’exposition aux UV d’une résine à travers un masque permet après développement l’obtention d’un motif en relief (A), sur lequel on vient couler le PDMS que

l'on fait réticuler et qui épouse le relief des motifs de résine (B). L'élastomère transparent qui en résulte possède les motifs imprimés à sa surface. On peut alors y percer des trous servant de réservoirs avant de le coller sur une autre surface plane (C), réalisant ainsi un réseau bidimensionnel de canaux à l'image du masque initial.

Le matériel nécessaire est minimal : monomère, moules, montages pour la polymérisation de l'élastomère et pour l'assemblage des dispositifs. La polymérisation et le traitement pour l'assemblage peuvent être aussi simples qu'un passage dans un four et une oxydation des surfaces par plasma O_2 .

La fabrication en série de ces dispositifs ne nécessite aucune expertise ni dispositif expérimental sophistiqué. Cette caractéristique démarque la lithographie molle des autres techniques de fabrication de microsystèmes. Notons que le moule peut être réutilisé un très grand nombre de fois.

Un prototypage rapide de microstructures de PDMS sans utilisation de master a été récemment proposé par Tim et al[32]. Il s'agit simplement d'exposer du PDMS durci de type Sylgard-184 à travers un masque à une longueur d'onde de 185nm avec une dose d'énergie donnée puis de le développer dans une solution de 1M d'hydroxyde de sodium et d'éthanol (1 :1) pendant un certain temps. L'absorption de la lumière à cette longueur d'onde provoque des scissions au sein des chaînes du PDMS. Ainsi, une réaction rapide du solvant de développement permet l'obtention de surfaces rugueuses et de structures bien arrondies et une diminution de leur profondeur à une dose d'irradiation donnée. Cette technique a permis la réalisation de différents exemples, illustrés à la figure 1.9, de microstructures avec des profondeurs de l'ordre de $5\mu\text{m}$.

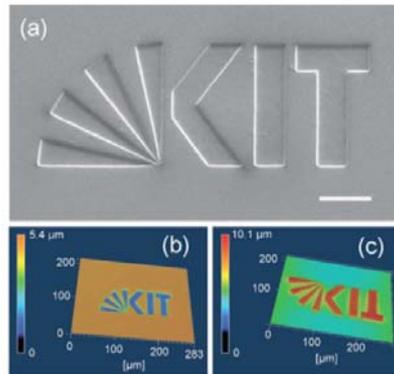


FIGURE 1.9 – Exemples de microstructures en PDMS. (a) Image MEB de microstructures obtenues par irradiation du PDMS à 3.6 J cm^2 (à 185 nm) suivi de développement avec un mélange 1 M NaOH : ethanol (1 : 1 (v/v)) pendant 5 min dans un bain ultrasons. La profondeur de la structure est de $4.5 \mu\text{m}$ (Echelle de 50 μm). (b) Profil 3D de la même structure de PDMS obtenue par un laser “3D scanning microscope”. (c) Profile 3D de l'image produite par copie de la structure présentée en (a) et (b) dans le PDMS.1.9

Le polyuréthane (PU) a été également utilisé pour la fabrication de microsyst-

tèmes en utilisant la technique de moulage. Rappelons que la chimie du polyuréthane (1930) a connu un développement important avec les polymères organiques pour les applications technologiques. Il a été utilisé dans plusieurs domaines notamment dans la fabrication de colles (utilisées pour assembler le bois ou pour le collage des semelles de chaussures), de meubles (coussins, assises de sièges), dans l'industrie automobile (les sièges, les appuie-têtes, les accoudoirs, les volants, les toits ou les tableaux de bord), dans la fabrication des enduits, laques, peintures et vernis que cela soit dans le bâtiment, l'ameublement ou la protection du bois ou également dans le domaine médical (de nombreux modèles de préservatifs sont fabriqués à partir du polyuréthane). Il présente l'intérêt d'être moins allergène que le latex tout en répondant à de parfaits critères de qualité. Son utilisation pour la microfabrication de microsystèmes fluidiques a été décrite pour la première fois par l'équipe de Whitesides et al.[41] qui a, plus tard, proposé un processus pour la microfabrication de microsystèmes en PU à partir de masters conçus par lithographie classique. La puce obtenue a permis de réaliser des séparations électrophorétiques avec une bonne efficacité. Des mesures d'angles de contact ont permis de démontrer une augmentation de l'hydrophilie de la surface des canaux en polyuréthane.

1.3.2.4 Les techniques de collage

Collage du PDMS Le collage du PDMS sur une surface nécessite une modification des propriétés de surface du PDMS par des traitements physiques et chimiques. Le traitement le plus utilisé est sans doute le traitement par plasma par d'oxygène. Dans ce cas, les groupements $-O-Si(CH_3)_2$ présents à la surface du PDMS génèrent des groupements silanols $O-Si-OH$ lors de l'exposition au plasma[5]. Le problème de ce traitement est sa stabilité dans le temps : le PDMS retrouve ses propriétés initiales et redevient hydrophobe. En effet, la modification de la surface n'est généralement stable que pendant 30min[27]. Pour garantir une meilleure stabilité de la surface, des traitements supplémentaires peuvent être effectués après l'étape de plasma O_2 . Citons comme exemples, le traitement plasma avec du C_2F_6 [6], le dépôt de films organiques[35, 6, 36] ou encore le recuit du film de PDMS après collage [37].

Les modifications de surface suite au traitement par plasma O_2 sont la plupart du temps vérifiées par la mesure de l'angle de contact θ . Rappelons ici que l'angle de contact d'un liquide sur une surface est l'angle formé entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide (figure 1.10). Lorsque l'angle de contact est supérieur à 90° , les surfaces présentent un caractère hydrophobe (figure 1.10.b) ; dans le cas d'un angle inférieur à 90° , les surfaces sont hydrophiles (figure 1.10.a).

Dans le cas du collage, la modification de la mouillabilité des surfaces renseigne sur la force de collage. Ainsi plus l'angle de contact est faible, plus la mouillabilité de l'échantillon est grande et plus le collage est généralement efficace[5]. Afin de pouvoir maîtriser la force de collage il est bien évidemment important de maîtriser les paramètres pertinents lors du traitement plasma : la pression du gaz, le temps d'exposition et la densité de puissance du plasma.

Pour le collage de PDMS sur un substrat de verre, il a été démontré que l'aug-

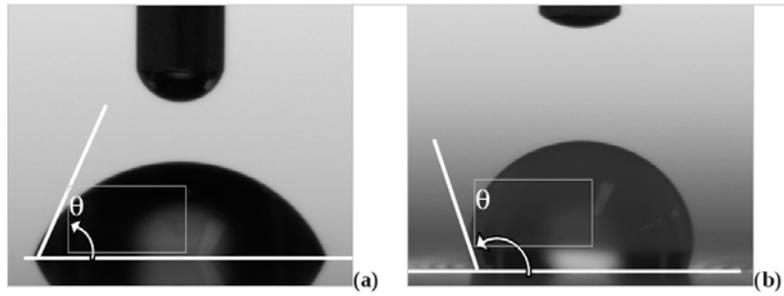


FIGURE 1.10 – Photos d'une goutte de liquide sur une surface (a) hydrophile et (b) hydrophobe

mentation de la pression du plasma améliore le collage.[5]. Dans le cas précis de l'étude présentée par S. Bhattacharya, une pression supérieure à 100mTorr permet d'éliminer les groupements méthyle de la surface de PDMS sans altérer les groupements siloxane. Pour une pression basse ($<100\text{mTorr}$), la qualité de collage est détériorée. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'énergie incidente est plus élevée (augmentation du libre parcours moyen) au niveau de la surface et que la quantité d'espèces actives est moins élevée.

En ce qui concerne l'influence de la puissance, la force du collage augmente généralement jusqu'à ce que la puissance du plasma soit supérieure à l'énergie de dissociation des liaisons Si-C résultant de la détérioration de la réticulation du PDMS. Lorsque la puissance appliquée est basse, il existe une diminution du nombre d'espèces réactives à la surface du substrat et donc une diminution des sites actifs à la surface du substrat, ceci se traduisant par une diminution des groupements Si-OH à la surface du PDMS. Dans le cas d'une puissance importante, le bombardement ionique à la surface du substrat est important, l'énergie de dissociation des liaisons $Si - O - Si$ étant plus importante que celle de la liaison Si-C, le siloxane est alors détérioré. Il s'agit donc, comme cela est souvent le cas, de trouver un compromis en termes d'énergie disponible.

Concernant l'influence du temps d'exposition, l'utilisation d'une durée de traitements trop importante doit être évitée car il y a élimination des groupements méthyles présents à la surface du PDMS. Au delà de 30s de plasma O_2 , la structure du PDMS en surface est endommagée. Cette détérioration peut être due à une concentration trop importante de groupements silanols à la surface du PDMS ce qui entraînerait des réactions de scission de chaînes à la surface. Il existe donc un compromis à adopter entre la pression, la puissance et le temps d'exposition au plasma O_2 .

Autres techniques de collage D'autres techniques de collage polymères-matériaux inorganiques ou polymères-polymères sont également rapportées de manière moins courante toutefois dans la littérature. Ryan et al[19] ont réalisé un collage d'une puce en PMMA sous une pression de 2 psi avec $3\mu\text{L}$ d'acétonitrile/ cm^2 . Le microsystème obtenu est particulièrement robuste et résiste à des pressions internes supérieures à

2250 psi. L'efficacité du système a été mise en évidence par des séparations électrophorétiques de peptides et d'acides aminés fluorescents.

Un autre type de collage de puce en PMMA a été proposé par l'équipe de Lin[23]. Comme présenté sur la figure 1.11, il s'agit d'utiliser un mélange de dichlorométhane et d'éthanol en contact avec deux substrats de PMMA puis réaliser le collage par pression à $10\text{N}/\text{cm}^2$ pendant 5mn à température ambiante.

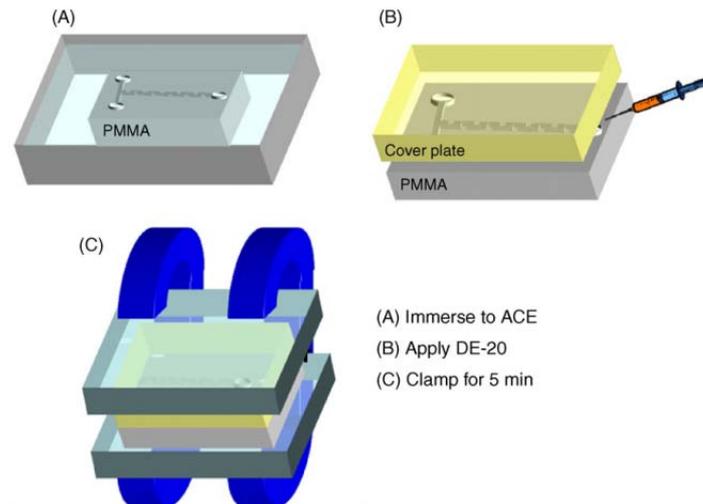


FIGURE 1.11 – Processus du collage du PMMA par un solvant faiblement azéotropique[23]

1.4 Nouveaux matériaux et leurs techniques de microfabrication de microsystemes fluidiques

La microfabrication des microsystemes analytiques ne s'est pas restreinte au silicium, verre ou encore aux polymères et plastiques. Bien d'autres nouveaux matériaux ont été exploités pour cette application notamment le téflon, les céramiques et le papier. Nous tenions à rappeler ici qu'il ne s'agissait pour le moment que de matériaux originaux mais qui, selon plusieurs critères (coût, facilité d'utilisation ...), nous paraissent intéressants.

Sikanen et al.[34] ont proposé pour la première fois un microsysteme en Ormocomp. Ce matériau fait partie de la famille des céramiques organiquement modifiées et dont les propriétés peuvent être ajustées selon l'application visée. Il peut être utilisé dans la fabrication des fibres optiques ou encore pour des revêtements anti-adhésifs. L'idée était alors de combiner les propriétés des polymères organiques en termes de fonctionnalisation et de facilité de synthèse à basse température à celles du verre telles que la dureté, la transparence et la stabilité chimique et thermique. Le microsysteme proposé est conçu de deux façons : par lithographie optique relativement classique et par matriçage sous UV. Les résultats obtenus indiquent un

nombre de plateaux théoriques de 10^4 par mètre pour la séparation de protéines intactes et $10^6 m^{-1}$ pour celle des acides aminés et de peptides. Ils révèlent que le microsystème obtenu présente de hautes performances pour la séparation et qu'il est de plus compatible avec la détection par fluorescence même à des longueurs d'onde proches de l'UV (355 nm) avec une limite de détection de l'ordre du nanomolaire lorsque ce sont des produits naturellement fluorescents, qui sont analysés.

Ren et al.[29] ont récemment développé un microsystème en téflon et, plus particulièrement, en perfluoroalkoxy (PFA). Le procédé de fabrication est présenté à la figure 1.12. Il s'agit de préparer en une première étape un master en PDMS ayant une stabilité importante à haute température. Cette stabilité thermique est obtenue par ajustement du rapport PDMS Sylgard 184 et de l'agent réticulant à (5 :1). Le master conçu sert en une deuxième étape au moulage du téflon à $275^\circ C$ et sous une pression de 10KPa pour la réplique des microstructures. La fermeture des canaux est assurée par simple scellement thermique à $260^\circ C$.

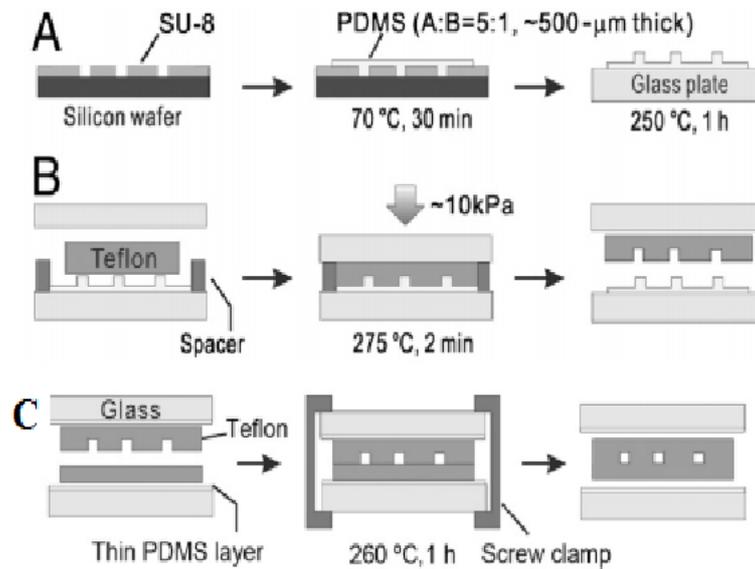


FIGURE 1.12 – Etapes de microfabrication de microsystème en téflon : (A) préparation du master en PDMS, (B) moulage du téflon et (C) collage et fermeture des canaux [29]

Les dispositifs ainsi obtenus présentent une très faible adsorption de biomolécules à la surface des canaux. A l'inverse du PDMS, le téflon présente ainsi une perméabilité relativement modérée aux gaz permettant ainsi une plus longue culture cellulaire au sein de ses canaux. La stabilité des microsystèmes en téflon aux différents solvants organiques à été également vérifiée. Un exemple est illustré à la figure 1.13.

Si l'on parle de matériaux à bas coût et biocompatibles, le papier n'est peut-être pas celui qui pourrait nous venir en premier à l'esprit en ce qui concerne les circuits microfluidiques. Pourtant, il a également été exploité pour la microfabrication de microsystèmes analytiques. Il a été pour la première fois introduit par Whitesides

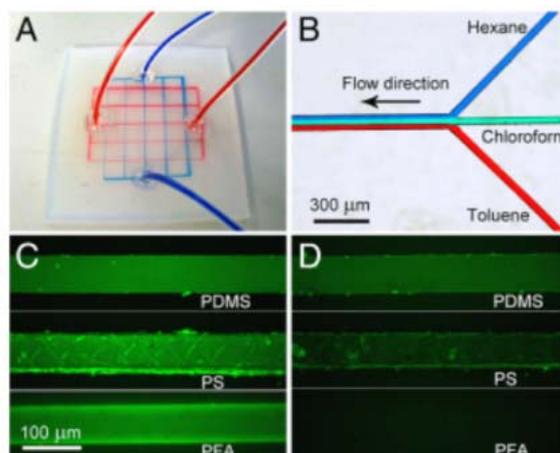


FIGURE 1.13 – Résistance du dispositif microfluidique en téflon aux solvants : (A) microsystème de deux couches en PFA séparées par une membrane en FEP et rempli par de l'acétone (Rouge) et du DMSO (Bleu) et (B) flux laminaire de solvants organiques colorés dans un microsystème en téflon. Adsorption des biomolécules sur les canaux en téflon : (C) images fluorescentes de différents types de microcanaux remplis par $100\mu\text{g}$ de GFP. (D) images par fluorescence des canaux présentés en C après lavage pendant 1min.[29]

et ses collaborateurs en 2007[26] qui ont utilisé le papier comme substrat pour des microstructures modèles. Ils ont été, par la suite, relativement bien décrits dans la revue de Wendell et ses collaborateurs.[9]

Ces dispositifs sont considérés comme une nouvelle catégorie de microsystèmes de diagnostic qui sont peu coûteux, faciles à utiliser, légers à transporter et compatibles avec les fluides biologiques. Les nombreux avantages du papier apportent un grand potentiel d'application dans les régions à ressources limitées.

Whitesides et son équipe ont récemment développé un microsystème tridimensionnel en papier[25]. Ce dispositif permet la distribution des fluides à la fois verticalement et latéralement et assure également le croisement des fluides sans qu'ils ne se mélangent.

1.5 Conclusion

Le microsystème, objet très intégré (donc faiblement observable) présente une forte valeur ajoutée. Ceci induit la nécessité d'une modélisation pluridisciplinaire de nombreux phénomènes (mécanique, électronique, matériaux, ...) qui représentent divers domaines connexes à la conception des microsystèmes dans le but de garantir avant la fabrication, la fonctionnalité de l'objet. Plusieurs techniques de microfabrication ont été développées aussi bien pour les matériaux durs tels que le silicium ou le verre que pour les polymères et plastiques. De nos jours, il devient indispensable de réduire les coûts de fabrication. Ainsi, l'utilisation des technologies issues de la

microélectronique permet une fabrication collective (en parallèle à partir d'un même wafer), l'intégration de plusieurs fonctions sur une même puce et la reproduction d'un dispositif à des millions d'exemplaires à un coût moindre. Les microsystèmes fabriqués en papier présentent une nouvelle génération des dispositifs microfluidiques et semblent être aussi performants que ceux conçus en verre ou en polymères.

Bibliographie

- [1] Ning Bao, Qing Zhang, Jing-Juan Xu, and Hong-Yuan Chen. Fabrication of poly(dimethylsiloxane) microfluidic system based on masters directly printed with an office laser printer. *Journal of Chromatography A*, 1089(1-2) :270–275, September 2005. (Cité en page 19.)
- [2] H Becker and C Gärtner. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis*, 21(1) :12–26, January 2000. PMID : 10634467. (Cité en pages 18 et 19.)
- [3] Holger Becker and Claudia Gärtner. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(1) :89–111, January 2008. PMID : 17989961. (Cité en page 7.)
- [4] Holger Becker and Laurie E. Locascio. Polymer microfluidic devices. *Talanta*, 56(2) :267–287, February 2002. (Cité en pages 18 et 19.)
- [5] S. Bhattacharya, A. Datta, J.M. Berg, and S. Gangopadhyay. Studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (pdms) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength. *Microelectromechanical Systems, Journal of*, 14(3) :590 – 597, june 2005. (Cité en pages 22 et 23.)
- [6] Dhananjay Bodas and Chantal Khan-Malek. Formation of more stable hydrophilic surfaces of pdms by plasma and chemical treatments. *Microelectronic Engineering*, 83(4-9) :1277 – 1279, 2006. (Cité en page 22.)
- [7] Stephen A. Campbell. *The science and engineering of microelectronic fabrication*. Oxford University Press, 2001. (Cité en page 5.)
- [8] Nghia Chiem, Loranelle Lockyear-Shultz, Per , Cameron Skinner, and D. Jed Harrison. Room temperature bonding of micromachined glass devices for capillary electrophoresis. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 63(3) :147–152, May 2000. (Cité en page 16.)
- [9] Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Dosil Pereira de Jesus, José Alberto Fracassi da Silva, Claudimir Lucio do Lago, and Emanuel Carrilho. Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. *ELECTROPHORESIS*, 31(15) :2487–2498, 2010. (Cité en page 26.)
- [10] dupont. Dupont kapton - polyimide film, 2012. (Cité en page 7.)
- [11] David Erickson and Dongqing Li. Integrated microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta*, 507(1) :11–26, April 2004. (Cité en pages 5 et 7.)
- [12] Michel Fontanille and Yves Gnanou. *Chimie et physico-chimie des polymères*. Dunod, 2e édition edition, January 2010. (Cité en page 8.)
- [13] Sami Franssila. *Introduction to microfabrication*. June 2004. (Cité en page 5.)
- [14] Mohamed Gad-el-Hak. *MEMS : design and fabrication*. CRC/Taylor & Francis, 2006. (Cité en page 5.)
- [15] Zhibing Gan, Zhengyin Yu, Zhi Chen, and Gang Chen. Hot embossing of electrophoresis microchannels in PMMA substrates using electric heating wires.

- Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 :2715–2720, February 2010. (Cité en page 19.)
- [16] Oliver Geschke, Henning Klank, and Pieter Telleman. *Microsystem Engineering of Lab-on-a-chip Devices*. John Wiley & Sons, 1st edition, February 2004. (Cité en page 16.)
- [17] Zhi-Jian Jia, Qun Fang, and Zhao-Lun Fang. Bonding of glass microfluidic chips at room temperatures. *Anal. Chem.*, 76(18) :5597–5602, 2004. (Cité en page 16.)
- [18] Zhi-Jian Jia, Qun Fang, and Zhao-Lun Fang. Bonding of glass microfluidic chips at room temperatures. *Analytical Chemistry*, 76(18) :5597–5602, 2004. (Cité en pages 16 et 17.)
- [19] Ryan T. Kelly, Tao Pan, and Adam T. Woolley. Phase-changing sacrificial materials for solvent bonding of high-performance polymeric capillary electrophoresis microchips. *Analytical Chemistry*, 77(11) :3536–3541, 2005. (Cité en page 23.)
- [20] Technische Kunststoffteile Kern GmbH. Eigenschaften polymethylmethacrylat (pmma) - ein datenblatt der kern gmbh, 2012. (Cité en page 7.)
- [21] Myra T. Koesdjojo, Corey R. Koch, and Vincent T. Remcho. Technique for microfabrication of polymeric-based microchips from an su-8 master with temperature-assisted vaporized organic solvent bonding. *Analytical Chemistry*, 81(4) :1652–1659, 2009. (Cité en page 19.)
- [22] Mingtao Li, Jian Wang, Lei Zhuang, and Stephen Y. Chou. Fabrication of circular optical structures with a 20 nm minimum feature size using nanoimprint lithography. *Applied Physics Letters*, 76(6) :673, 2000. (Cité en page 19.)
- [23] Che-Hsin Lin, Chien-Hsiang Chao, and Che-Wei Lan. Low azeotropic solvent for bonding of pmma microfluidic devices. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 121(2) :698 – 705, 2007. (Cité en page 24.)
- [24] Marc J. Madou. *Fundamentals of microfabrication : the science of miniaturization*. CRC Press, March 2002. (Cité en page 5.)
- [25] Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, and George M. Whitesides. Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50) :19606–19611, 2008. (Cité en page 26.)
- [26] Butte MJ Whitesides GM Martinez AW, Phillips ST. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 46(8) :1318–20, 2007. (Cité en page 26.)
- [27] Tatsunosuke Murakami, Shin ichi Kuroda, and Zenjiro Osawa. Dynamics of polymeric solid surfaces treated with oxygen plasma : Effect of aging media after plasma treatment. *Journal of Colloid and Interface Science*, 202(1) :37 – 44, 1998. (Cité en page 22.)

- [28] Nam-Trung Nguyen and Steven T. Wereley. *Fundamentals and applications of microfluidics*. Artech House, November 2002. (Cité en page 5.)
- [29] Kangning Ren, Wen Dai, Jianhua Zhou, Jing Su, and Hongkai Wu. Whole-teflon microfluidic chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20) :8162–8166, 2011. (Cité en pages 25 et 26.)
- [30] O. Rötting, W. Röpke, H. Becker, and C. Gärtner. Polymer microfabrication technologies. *Microsystem Technologies*, 8(1) :32–36, March 2002. (Cité en pages 7 et 18.)
- [31] Tim Scharnweber, Roman Truckenmüller, Andrea M. Schneider, Alexander Welle, Martina Reinhardt, and Stefan Giselbrecht. Rapid prototyping of microstructures in polydimethylsiloxane (PDMS) by direct UV-lithography. *Lab Chip*, 11(7) :1368–1371, February 2011. (Cité en page 19.)
- [32] Tim Scharnweber, Roman Truckenmüller, Andrea M. Schneider, Alexander Welle, Martina Reinhardt, and Stefan Giselbrecht. Rapid prototyping of microstructures in polydimethylsiloxane (PDMS) by direct UV-lithography. *Lab on a Chip*, 11(7) :1368, 2011. (Cité en page 21.)
- [33] Samuel K Sia and George M Whitesides. Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *ELECTROPHORESIS*, 24(21) :3563–3576, November 2003. (Cité en page 19.)
- [34] Tiina Sikanen, Susanna Aura, Liisa Heikkilä, Tapio Kotiaho, Sami Franssila, and Risto Kostiainen. Hybrid ceramic polymers : New, nonbiofouling, and optically transparent materials for microfluidics. *Anal. Chem.*, 82(9) :3874–3882, 2010. (Cité en page 24.)
- [35] S. Talaei, O. Frey, P.D. van der Wal, N.F. de Rooij, and M. Koudelka-Hep. Hybrid microfluidic cartridge formed by irreversible bonding of su-8 and pdms for multi-layer flow applications. *Procedia Chemistry*, 1(1) :381 – 384, 2009. (Cité en page 22.)
- [36] K C Tang, E Liao, W L Ong, J D S Wong, A Agarwal, R Nagarajan, and L Yobas. Evaluation of bonding between oxygen plasma treated polydimethyl siloxane and passivated silicon. *Journal of Physics : Conference Series*, 34(1) :155, 2006. (Cité en page 22.)
- [37] K C Tang, E Liao, W L Ong, J D S Wong, A Agarwal, R Nagarajan, and L Yobas. Evaluation of bonding between oxygen plasma treated polydimethyl siloxane and passivated silicon. *Journal of Physics : Conference Series*, 34 :155–161, April 2006. (Cité en page 22.)
- [38] topas. Topas 8007x10, 2012. (Cité en page 7.)
- [39] Joel Voldman, Martha L. Gray, and Martin A. Schmidt. Microfabrication in biology and medicine. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 1 :401–425, August 1999. (Cité en page 5.)
- [40] Younan Xia and George M. Whitesides. SOFT LITHOGRAPHY. *Annual Review of Materials Science*, 28 :153–184, August 1998. (Cité en page 20.)

-
- [41] Qiaobing Xu, Brian T Mayers, Michal Lahav, Dmitri V Vezenov, and George M Whitesides. Approaching zero : using fractured crystals in metrology for replica molding. *Journal of the American Chemical Society*, 127(3) :854–855, January 2005. PMID : 15656621. (Cité en page 22.)

Séparation électrophorétique de protéines en microsystemes analytiques

2.1 Introduction

Les méthodes analytiques au format capillaire telles que la nano-Chromatographie Liquide Haute Performance (nano-HPLC) et l'électrophorèse capillaire (EC) ont connu un grand succès ces dernières années. Ceci a conduit à davantage miniaturiser ces techniques. Les principaux avantages de la miniaturisation sont la faible consommation d'échantillon et de réactifs, le temps réduit des analyses ainsi que la possibilité d'une intégration fonctionnelle au sein d'un même dispositif soit de différents modules de prétraitement de l'échantillon permettant la création de nouvelles fonctions, soit de parallélisme permettant des analyses à haut débit.

Les systèmes appelés "MicroTAS" (Micro Total Analysis Systems) regroupent maintenant l'ensemble des systèmes miniaturisés, ayant une dimension micrométrique et qui intègrent la séquence complète d'analyse d'un échantillon brut jusqu'à la lecture du résultat. Ces analyses ne sont pas restreintes à l'analyse chimique et les technologies "MicroTAS" ont bien d'autres applications dans le domaine de la biologie, de l'environnement, de l'agroalimentaire, de la toxicologie ou de la santé.

C'est ainsi que le concept de "laboratoire sur puce" (lab-on-a-chip, LOC), plus général, a émergé plus tard pour définir un dispositif rassemblant, sur un substrat miniaturisé, une ou plusieurs fonctions d'un laboratoire ou l'ensemble des modules de la chaîne analytique.

La chimie analytique et la biologie moléculaire ont fortement participé au développement de la microfluidique et des laboratoires sur puce. La majorité des applications relèvent principalement de ces deux domaines. Une revue assez complète a été publiée par Roman et al. en 2007 concernant les différentes possibilités d'intégration au sein d'un même microsysteme [9].

Actuellement, plusieurs laboratoires sur puce ont été développés pour l'analyse de la plupart des molécules et macromolécules biologiques tels que l'ADN, les protéines et peptides, les anticorps, les sucres, ou de petites molécules, mais aussi pour l'analyse de cellules. Les principales applications visées en recherche et développement sont le diagnostic clinique et la recherche pharmaceutique. Les microsystemes miniaturisés permettent par exemple de réaliser des criblages parallélisés, à haut débit, pour la découverte de médicaments. Ils ont également été largement appliqués

aux domaines de l'agro-alimentaire et l'environnement afin de contrôler la qualité de la nourriture ou la pollution des cours d'eau et de l'air [10].

De nombreux travaux menés en microfluidique et sur les laboratoires sur puce sont liés à l'analyse de protéines et de leurs fonctions. Il est ainsi devenu indispensable de détecter et quantifier des protéines d'intérêt, même au sein d'un échantillon complexe. Les modifications post-traductionnelles (MPT) des protéines jouent un rôle important dans certains processus cellulaires ou pathologiques. L'analyse en microsystème ciblée sur les MPT telles que les phosphorylations et glycosylations commence à apparaître surtout dans le domaine du diagnostic.

La miniaturisation des dispositifs d'analyse entraîne une forte augmentation du rapport surface-sur-volume. Elle favorise par exemple l'adsorption des analytes sur les parois et l'évaporation des liquides, en particulier des gouttes. Les laboratoires sur puce mettent en jeu différents matériaux dont on peut citer principalement le PDMS, le PMMA, le PS, le PC, le poly(éthylène téréphtalate) (PET/PETG), le PI et le COC. A la différence de l'EC qui emploie principalement des capillaires en silice fondue, l'utilisation des systèmes d'analyse miniaturisés apporte une diversification des matériaux et donc un élargissement des possibilités analytiques mais exige en retour un contrôle des états de surface et des interactions des analytes avec la surface afin de minimiser leur adsorption. Des traitements de surfaces doivent ainsi être mis en place pour éviter ces problèmes. Plusieurs solutions sont envisageables et ont été décrites dans de nombreuses revues[7, 2, 12, 8, 1, 5].

La miniaturisation dédiée à l'analyse a pour objectif final l'intégration de fonctions de préparation d'échantillons mais aussi des modules de mélange, de détection et de séparation dans un dispositif complet d'analyse. La préconcentration est un module qui, généralement, se situe en amont de la séparation et qui a pour but d'augmenter la sensibilité des analyses ou d'éliminer des molécules interférentes. La réalisation de séparations bidimensionnelles est une autre illustration de cette intégration qui est destinée à augmenter le pouvoir de résolution d'une méthode.

Plusieurs techniques de préconcentration peuvent être utilisées en microsystèmes. Elles peuvent être basées sur des phénomènes électrocinétiques telle que l'amplification de champ électrique, ou la préconcentration par extraction sur phase solide (SPE) ou encore l'emploi de nanocanaux[11, 3, 4] ou de membranes perméables[6].

D'autre part, la sensibilité de l'analyse en microsystème analytique peut être considérablement liée à la méthode de détection utilisée. La spectrométrie de masse est par exemple l'un des modes de détection les plus performants en couplage avec les analyses miniaturisées mais reste difficile à mettre en œuvre. La détection des protéines est donc généralement réalisée par fluorescence.

L'analyse des protéines dans des LOC peut être réalisée selon plusieurs modes de séparation qui peuvent être de type électrophorétique ou chromatographique. Les techniques électrophorétiques d'analyse sont considérées aujourd'hui comme méthodes de séparation analytique très performantes, rapides, quantitatives et reproductibles. Leur application potentielle et leur automatisation en font une alternative performante par rapport à d'autres méthodes souvent consommatrices de temps. Leur versatilité permet leur utilisation pour la séparation et la quantification de

nombreuses molécules biologiques aussi variées que les protéines, les anticorps et les sucres.

L'intérêt pour cette nouvelle technologie a donc augmenté de manière considérable au cours de ces dix dernières années. Ceci s'est accompagné d'une forte augmentation du nombre de publications dans ce domaine scientifique mais également d'un accroissement du nombre d'instruments commerciaux qui lui sont dédiés.

Dans ce chapitre, nous présentons une revue sur les dernières avancées technologiques (jusqu'à 2010) en termes d'analyses de protéines en microsystèmes analytiques en se focalisant sur celles qui reposent sur des séparations électrophorétiques.

Nous détaillons ici de façon exhaustive les phénomènes impliqués, les différents traitements de surface utilisés ainsi que les différentes techniques de préconcentration et de détection pouvant être intégrées pour augmenter la sensibilité des analyses. Nous présentons également les différents modes de séparation utilisés en microsystèmes analytiques pour la séparation électrocinétique de protéines.

2.2 Revue : Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods : An update

Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods : an update.

Nguyet Thuy Tran
Ichraf Ayed
Antoine Pallandre
Myriam Taverna

Univ Paris-Sud, Laboratoire de
Protéines et Nanotechnologie en
Sciences Séparatives, Châtenay-
Malabry, France

Received July 31, 2009
Revised October 7, 2009
Accepted October 7, 2009

Review

Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods: An update

Lab-on-a-chip electrophoresis is becoming increasingly useful for protein analysis, thanks to recent developments in this field. This review is an update of the review we published at the start of 2008 [Peng, Y., Pallandre, A., Tran, N. T., Taverna, M., *Electrophoresis* 2008, 29, 156–177]. The superiority of polymers for the manufacture of analytical microchips has been confirmed. This trend implies several modifications to the processes previously used with glass/silicon chips and requires a better understanding of the interfacial phenomena of these materials. Significant progress in chip-based techniques for protein analysis has been made in the last 2 years. In addition to advances in traditional electrokinetic modes, counter-flow gradient focusing techniques have emerged as useful methods not only for separation, but also for the online preconcentration of samples. This review, with more than 175 references, presents recent advances and novel strategies for EOF measurement, surface treatment, sample pretreatment, detection and innovations relating to the different modes of separation.

Keywords:

Chip / Detection / Electrophoretic separation / Miniaturization / Proteins

DOI 10.1002/elps.200900465

1 Introduction

The miniaturization of CE was one of the earliest examples of μ TAS systems to emerge in the early 1990s [1]. This new technique resulted from a combination of conventional CE

for the analysis of ultra-small volumes (nL) with micro-fabrication techniques.

The microchip concept has since attracted considerable attention among researchers worldwide, as witnessed by the growing number of applications for microchips in many areas of analytical science (e.g. sample preparation, detection and separation modes) and by the many reviews dealing with microchips in analytical chemistry that have appeared in the last 2 years [2–19]. Microchips for the analysis and separation of biomolecules, including proteins in particular, have advanced tremendously in recent years.

In this review, we discuss and summarize novel and improved techniques and applications of protein analysis on microchips based on electrically driven methods. This review follows on from a previous review dealing with studies published before 2007 [20].

We will begin by describing the role of EOF and the various means for controlling and adjusting it in micro-channels to achieve high separation efficiencies for proteins. We include an exhaustive summary of the reported methods for accurately measuring on EOF on all types of chips, from the simplest to the most sophisticated. Unfortunately, analyte adsorption on the surface of microchip channels remains a major drawback of on-chip protein analysis. Adsorption can interfere with microfluidic transport and can affect separation performance and reproducibility. In addition, the uncontrolled adsorption of fluorescently labeled proteins, for example, may dramatically decrease detection sensitivity. It is therefore necessary to modify the

Correspondence: Dr. Nguyet Thuy Tran, Univ Paris-Sud, JE 2495, Laboratoire de Protéines et Nanotechnologie en Sciences Séparatives (LPNSS), IFR 141, Châtenay-Malabry F-92296, France
E-mail: thuy.tran-maignan@u-psud.fr
Fax: +33-1-46-83-54-58

Abbreviations: ALS, acid-labile surfactant; ATRP, atom-transfer radical polymerization; BAS, 1-butyl-3-methylimidazolium dodecane sulfate; CA, carrier ampholyte; COC, cyclic olefin copolymer; DDM, *n*-dodecyl- β -D-maltoside; DFGF, dynamic field gradient focusing; EFG, electric field gradient; EFGF, electric field gradient focusing; FASI, field-amplified sample injection; FASS, field-amplified sample stacking; GE, gel electrophoresis; GFP, green fluorescent protein; HEC, hydroxyethyl cellulose; IL, ionic liquids; LE, leading electrolyte; LOC, lab-on-a-chip; MC, methylcellulose; MFI, microfluidic interface; OLED, organic light-emitting diode; PAA, polyacrylamide; PSP, pseudostationary phase; PY, pyronin Y; SWNT, single-walled carbon nanotube; TE, terminating electrolyte; TGF, temperature gradient focusing; TPE, thermoset polyester; TPEX, two-photon excited; WCID, whole column imaging detection; μ CEI, microchip electrophoretic immunoassay; μ CGE, microchip CGE; μ EFGF, microchip EFGF; μ IEF, microchip IEF

channel surface, whatever the type of microchip used, to minimize undesired adsorption. Most CE chips are made from various glass substrates, from inexpensive soda lime glass to high-quality quartz. Various polymers have recently been used to make microchips for CE separation. These polymers include cyclic olefin copolymer (COC), PMMA, and PDMS. Whatever the microchip material used, it is important to adjust the EOF magnitude to improve resolution. Excellent reviews devoted to the surface treatment of microchips for electrophoretic separation have been published [21–25]. Dynamic adsorption and permanent surface modification are the two strategies most frequently used for the surface treatment of microchips. Dynamic adsorption is a simple, rapid surface modification technique, in which surface modifiers are added to the separation buffer and physically adsorbed onto the channel surface. Permanent surface modifications involve specific chemical reactions to change the surface composition and properties and are generally performed before the separation.

The sensitivity of MCE at low concentrations is known to be problematic in many cases, due to the short optical path length or extremely small amount of sample injected. Various on-line sample preconcentration techniques, (*e.g.* electric field gradient focusing (EFGF), temperature gradient focusing (TGF) and ITP) [19, 26] and applications of highly sensitive detection schemes have been developed to overcome poor sensitivity. These techniques have been applied to MCE and are described in Section 3. Recent years have witnessed the evolution of common “chemical” strategies of preconcentration, consisting principally of stacking approaches, into more sophisticated systems facilitated by the high integration capacity of microchips. The creation of chips with multiple functions is important for the generation of more complex systems incorporating multiple analytical operations into a single device [26–31]. The field of detection has also been enlarged beyond fluorescence, to MS and conductivity in particular, with several new examples of successful protein detection in microsystems.

Finally we also review, in Section 4, recent innovations focusing on the different separation modes for the MCE of proteins, such as electric field gradient techniques (EFG), with an update on classical separation modes, such as CZE, MEKC, CGE and IEF [32–35].

Even over the short time frame considered here, this young and dynamic field has produced important contributions, with the description of new and unique techniques, and several new applications. This emerging, rapidly developing field of research has led to the publication of almost 175 publications and reviews.

2 Impact of EOF and surface treatments on protein separation

The optimization of a large number of parameters is required to achieve high-resolution protein separation in lab-on-a-chip (LOC) devices. The surface charge of the

separation channel and its associated EOF are the most widely studied of these parameters.

However, analyte adsorption is often observed when analytical chips made from commercial polymers or glass. This phenomenon leads to local variation in EOF, a loss of analytical performance and poor reproducibility.

This has led to the emergence of methods for the accurate measurement of EOF on chips [36]. As this topic was not dealt with in our first review, we will focus on the different strategies that have been developed to measure EOF on chips. Recently developed surface treatments and EOF modulation methods will then be presented to illustrate ways in which the surface charge of LOC devices can be fine-tuned and used to increase protein separation efficiency. Only papers published since 2006 describing simple ways to treat the surface of microchip for protein separation will be discussed here.

2.1 EOF measurement

For counter-electro-osmotic separation, the following Eq. (1) shows the direct correlation between the resolution R_S and the magnitude of mobilities

$$\frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_{ep}}{(\mu_{eo} + \mu_{ep})} \sqrt{N} \quad (1)$$

$\Delta\mu_{ep}$ the difference in electrophoretic mobility between the two species, μ_{ep} the mean electrophoretic mobility, μ_{eo} the electroosmotic mobility and N the theoretical plates.

Based on this relationship, the resolution may be increased by ensuring that the absolute values of EO and electrophoretic mobilities are approximately equal. Efficient protein separation therefore often requires a fine adjustment of EOF intensity.

The origins of EOF were described in detail in a recent paper by Beattie [37]. However, the interfacial phenomenon and the electrical double layer at the polymer surface remain poorly understood, as pointed out and discussed in a paper in 2003 [38]. Some very recent papers present a detailed discussion of EOF on polymer chips [39, 40]. The main difficulty in understanding EOF in polymeric microchips is identifying the origin of the charges. According to Beattie, the surface charge of such complex interfaces is probably due to the hydroxyl ion [37]. These authors also discussed the source of interfacial charge when water is present at the hydrophobic interfaces of polymeric microchannels. They assumed that hydroslip played a key role in the electrokinetic migration occurring on such devices, due to a high shear rate. The concentration of dissolved gas also strongly affects the slip because these two factors seem to be directly correlated.

Most EOF measurement techniques were developed in the last 25 years [36, 41]. One recent review focused on EOF measurement on chips and provides specific details about these methods [36]. Most of these measurement techniques are adapted from those reported for conventional CE. We

will therefore focus here on methods successfully adapted for COC measurements. Finally, most of these methods can be classified into the following major categories: (i) sampling zone method, which is based on Kolchrausch regulating function; (ii) current monitoring; (iii) neutral marker detection; (iv) frontal electrophoresis; and (v) *in situ* methods.

The sampling zone method was introduced as early as 1998, by Fu *et al.* [42]. Several alternative methods have since been proposed, making use of different detection systems: amperometric detection [36], conductivity detection [43] and indirect LIF detection [44]. The underlying principle is based on the system peaks phenomena extensively described in previous publications [45, 46]. Wang *et al.* added diluted electroactive ionic species to the BGE and injected a sample similar to the BGE but at a different concentration. This created a sampling zone driven by the EOF, which was detected at the end of the channel. The EOF was deduced from the migration time of the negative peak.

The current monitoring method is slightly easier to use with microfluidic chips because amperometric detection is replaced by current measurement [47]. This method is the most widely employed to measure EO mobility on chips. Two BGE at different, but similar, concentrations are placed in each reservoir of a channel chip. The channel is filled with the same electrolyte as the end reservoir. The current required to maintain a constant electrical potential by a generator is recorded against time as the solution in the first reservoir flows into the channel and replaces the second electrolyte. This technique is based on the hypothesis that the resistance of the channel corresponds to the sum of the resistances of highly conductive zones and weakly conductive zones. The main limitations of this technique are that EOF is measured for a variable electrolyte composition, low EOF cannot be measured accurately and the non-linear changes in current making it difficult to estimate the EOF from the theoretical intersection of two straight lines.

Another type of method, adapted from techniques developed for conventional CE, involves measuring the migration time of neutral markers [48–55]. Several methods have been derived from this technique, including the use of non-neutral markers, the electrophoretic mobility of which is evaluated by a complementary technique, such as CE, for deduction of EO mobility from apparent values measured on a chip [56]. These methods are easier to handle but are limited by the adsorption of the markers to the channel wall.

Shakalisava *et al.* recently introduced a new method for EOF measurement based on frontal electrophoresis on microchips, with fluorescent markers and optical detection [57]. This method requires a simple monochannel microchip and does not require voltage optimization for sample injection and separation.

The last type of techniques is often referred to as “*in-situ*” techniques. Particle imaging velocimetry or particle tracking velocimetry is the most famous technique of this type. In most situations, fluorescent beads are placed in the microchannel and the motions of each particle can be

measured by image analysis [58]. A video camera is used to record images at regular time intervals and image processing by cross-correlation makes it possible to measure the mobility of the particles. This technique, unlike many others, can provide a precise image of EOF heterogeneity in the microchannel. However, it is limited by the difficulty that only transparent chips can be used for this kind of measurement. The electrophoretic mobility of the particle is subtracted by a calibration step because most of the commercially available fluorescent nanoparticles have widely dispersed electrophoretic mobilities. This step clearly complicates particle imaging velocimetry measurement.

Another type of measurement is possible but has yet to be adapted to microchips: techniques based on measurements of the amount of liquid effluent leaving the channel over time. Measurements of liquid weight as function of the time are directly linked to the flow of liquid generated by EOF. However, the main limitation of this technique, which has precluded its transposition to chips, is evaporation. A low-conductivity electrolyte could be used to reduce Joule heating and, thus, evaporation. This would make it possible to use this technique for LOC measurements, provided that temperature could be efficiently controlled.

2.2 Surface treatment of microchip for electrophoresis

The large surface-to-volume ratio of analytical microchips places surface chemistry at the forefront of separation techniques. Polymer-based microfluidic chips have recently been developed and have become valuable tools for separating biological molecules more cheaply and reliably. However, most of the polymers used in the production of analytical microchips, including PDMS, still have certain defects, such as the strong adsorption of hydrophobic molecules. Proteins are particularly prone to surface adsorption in polymer-based chips, as well as on glass or silicon chips. This phenomenon decreases separation efficiency and results in poor resolution. The most common strategy for dealing with this problem involves treating the surface to obtain hydrophilic microchannels [10]. A number of reviews dealing with surface treatment for electrophoretic separation have been published [21, 22, 25].

As this emerging field was not discussed in our previous review, we will focus here on recent publications (since 2006) describing simple methods for coating channel walls.

Covalent/adsorbed coatings and static/dynamic coatings have been developed to minimize the non-specific adsorption of proteins. Acrylamide, cellulose, PEG and their derivatives are commonly used for the modification of microchannels. New surface treatment for polymer chips have also been developed, as the patterning of polymer substrates is cheaper and easier than the methods used for glass or silicon microfabrication. Several studies have recently suggested the use of sandwich technology, or even the mixing of several materials, to achieve coating

procedures compatible with several materials. However, these techniques are likely to make surface treatment much more complicated [59–61].

2.2.1 Polymers and derivatives

Polymers are widely used for chip surface treatment and PEG, celluloses and their derivatives are by far the most frequently used polymers.

Wang *et al.* used a biocopolymer based on chitosan with primary amino groups to form a film on the surface of PDMS chips [62]. PEG chains were attached to the chitosan biopolymer *in situ*, after its deposition on the microchip. The main advantage of this non-covalent strategy is that oligomeric PEG chains can be grafted onto the chip in mild conditions without organic solvent, thereby preventing swelling of the PDMS. Wang assumed that hydrophobic interactions and hydrogen bonds were the primary points of anchorage. EOF was decreased by a factor of two and non-specific adsorption of biomolecules was also found to be decreased by this treatment. The EOF of the modified surface channel appeared to be more stable than that of the native PDMS channel. Biofouling was characterized by fluorescence microscopy, using FITC-tagged BSA as a model protein well known to adsorb onto the PDMS surface. No fluorescence was observed after 24 h of incubation with BSA and rinsing.

PEG has been silylated after its adsorption onto a glass microchip and Timperman's group showed that longer PEG chains are associated with lower EOF [63]. PEG has also been used to coat acrylic plastic chips for EFG separation, to improve protein separation and prevent biofouling [64].

Cellulose can be used as an alternative to PEG and acrylamide. Baba's group has thermally immobilized hydroxypropyl methyl cellulose (MC) on PMMA microchips [65]. This resulted in a much lower EOF of only $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{Vs}$, as measured by the current monitoring method. This strategy makes it possible to prevent hydrophobic interactions between SDS, SDS-protein and the PMMA channel wall. In a previous study, the same group developed an efficient method for dynamically coating the PMMA microchip with MC to reduce protein adsorption with a non-ionic detergent [66]. They more recently used an evaporation step, after rinsing the PMMA chip with MC, to limit protein adsorption [67]. However, this technique had a weaker effect on EOF than that based on hydroxypropyl MC, as they obtained an EOF value of about $1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$.

Soper and Shadpour dynamically coated their 2-D PMMA chip with methyl hydroxyethyl cellulose (HEC), to separate 633 Alexa Fluor-proteins by SDS-CGE and MEKC methods [68]. Zhang *et al.* also reported dynamic coating with HEC in COC microfluidic devices [69]. This treatment decreased EOF by 70% and BSA was separated with 10^4 theoretical plates in a 3.3-cm-long microchannel.

Liu *et al.* have developed a PEG functionalized acrylic copolymer for the production of an adsorption-resistant

microfluidic chip [70]. This strategy is of particular interest because it avoids the need for surface treatment through the synthesis of a new material for the direct microfabrication of electrophoretic microchips. The microfabrication process is similar to that used for PDMS microchips. The UV-visible transmittance was measured and found to be slightly lower than some of the grades of PMMA used for microfabrication. FITC-labeled HSA was analyzed electrophoretically on the copolymer chip and the symmetric peak shape obtained demonstrated lower levels of interaction between the surface and HSA. This copolymer chip separated peptides and proteins with a high efficiency. The hydrophobic adsorption of a brush-like copolymer of butyl methacrylate and PEG onto the PMMA microchip has also been used for the separation of BSA and lysozyme [71].

The covalent grafting of polyethyleneimine onto PMMA microchips has been used to achieve the separation of basic proteins. This strategy leads to a reversal of the EOF [72]. Another interesting approach for tuning the EOF involves the water-plasma hydroxylation of PMMA before bromosilylation to stabilize and increase EOF mobility [73]. Other strategies for modifying the surface with biocompatible materials have been described. Butyl moieties of a phospholipid copolymer have been added to a PMMA chip [74]. The coating provided a stable EOF and low levels of serum protein adsorption.

Root *et al.* recently performed size-based protein separation with an acid-labile surfactant (ALS) on a glass microchip dynamically coated with poly-(*N*-hydroxyethylacrylamide) polymer [75]. Proteins from 18 to 116 kDa in size were separated with high resolution with ALS and SDS for comparison. This study, like many others, clearly indicates that polyacrylamide (PAA) remains one of the best molecules for coating the inner channel of microchips for protein separation.

2.2.2 Surfactants

Over the last 10 years, surfactants have made a major contribution to the impressive separation of proteins on microfluidic chips.

The dynamic modification of PDMS chips by non-ionic/ionic surfactants is probably one of the easiest methods for controlling EOF and improving the non-fouling properties of PDMS.

Huang *et al.* proposed a dynamic modification of channels with a mixture of two surfactants, *n*-dodecyl- β -D-maltoside (DDM) and SDS, in various proportions [76]. Surface charge density and EOF can be finely tuned by varying the SDS/DDM ratio. High-resolution electropherograms have been recorded for ladders of streptavidin with different numbers of attached Alexa fluor molecules.

Wang *et al.* very recently used DDM to alter the channel surface of a PDMS/glass microchip and to make it more hydrophilic and non-ionic [77]. In conjunction with this treatment, hydroxypropyl cellulose was added to the electrolyte to suppress adsorption and to serve as a sieving

matrix. With this system, the baseline resolution of lipoproteins was achieved.

SU-8 is a photoresist commonly used in the fabrication of master PDMS microchips, but it can also be directly used in the manufacture of microfluidic chips. Sikanen *et al.* have compared SU-8 microchips with commercial glass microchips [78]. FITC-BSA was electrokinetically analyzed on both kinds of chip. The adsorption phenomenon, which is stronger on SU-8 chips than on glass chips, is easily decreased by adding anionic surfactants and SU-8 developer. This treatment also improved the repeatability of migration time and the SU-8 chip was shown to be of particular interest for protein analyses requiring a high EOF and low levels of protein adsorption. Chip manufacture with this photoresist is straightforward, and the dimensions can be precisely controlled to ensure reproducible analyses [79].

A covalently grafted PEG-PDMS chip was recently developed by Zhou *et al.* [80]. PEG additives terminating in a vinyl group were added to the PDMS prepolymer. When the PDMS was thermally cured, the vinyl group reacted with the silane groups on the PDMS, covalently linking the PEG group to the PDMS network. The ability of the resulting surface to suppress non-specific adsorption was tested with FITC-labeled BSA. The presence of SDS in the buffer increased the separation time, but also increased the resolution of FITC-lysozyme and FITC-cytochrome separation on a 0.5% PEG-PDMS microchip. This surfactant was shown to adsorb to the surface and to increase EOF.

In the most recent publications describing the use of surfactant to reduce protein adsorption, SDS was the most frequently used surfactant for the separation of protein mixtures on chips.

2.2.3 Other strategies for improving protein analysis

It is currently difficult to imagine one universal coating or surface treatment that could optimize the separation of all proteins on all kinds of chip material. For this reason, this field of research remains highly active, with new strategies frequently being developed.

Novel semi-stable coatings and supported lipid bilayer membranes initially developed for CE have been recently adapted to microchips [81]. Phillips *et al.* demonstrated that bilayers of phosphatidylcholine are suitable for use to coat hybrid glass-PDMS chips. With this system, green fluorescent protein (GFP) was separated very efficiently from a eGFP-Crkl fusion protein in cell lysates. The stability of this zwitterionic and negatively charged

membrane was demonstrated by EOF measurements. Recently, thermoresponsive poly-*N*-isopropylacrylamide was covalently attached to PDMS chips by Sugiura *et al.*, to control protein adsorption (Fig. 1) [82]. These authors detected less than 1% IgG on the modified surface of the PDMS chip after washing the surface at 10°C with PBS (Fig. 1) [82]. They suggested that the thermoresponsive properties of this polymer should facilitate efficient protein separation at relatively low temperature.

Ionic liquids (IL) also provide an interesting alternative for overcoming protein adsorption. Xu *et al.* used IL in ternary systems with water and non-ionic surfactant to modify the surface of PDMS chips. An excellent synergistic effect was demonstrated between IL and surfactant [83]. The addition of IL to a phosphate buffer resulted in an increase in EOF. In hybrid systems of this type, the adsorption of fluorescent dyes and protein is minimized. Due to the high ionic conductivity of IL, field-amplified sample stacking (FASS) was observed. The same authors subsequently used 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate as the supporting electrolyte, with SDS, for MCE with LIF detection [84].

The 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate molecule is highly conductive, with a low viscosity and low joule heating and is miscible with water. It decreased protein adsorption and, in label-free protein analysis, a sub ng/mL detection limit was achieved for several proteins. These authors have recently used 1-butyl-3-methylimidazolium dodecane sulfate (BAS), a type of IL surfactant, due to its capability to prevent protein adsorption to PDMS chips [85]. They demonstrated that this molecule is superior to MEKC in many ways (see Section 4.1).

Finally, one set of new strategies is based on multiple or complex synthesis steps, generating densely packed and homogeneous coatings. Atom-transfer radical polymerization (ATRP) has recently appeared as a useful strategy for minimizing protein adsorption. Sun *et al.* explored the use of surface-initiated ATRP to grow a PEG-functionalized layer on a polyglycidyl methacrylate-*co*-methyl methacrylate (PGMAMMA) surface [86]. These authors compared two new methods (hydrolysis and aminolysis) with oxygen plasma treatment for activating the PGMAMMA surface before immobilizing the ATRP initiator. Hydrolysis gave a better separation of proteins, and it was suggested that this was because the ethylenediamine used during aminolysis treatment damaged the microchannel surface. Pan *et al.* developed a similar technique, “in-channel ATRP,” for modifying thermoset polyester (TPE) microchips [87]. The

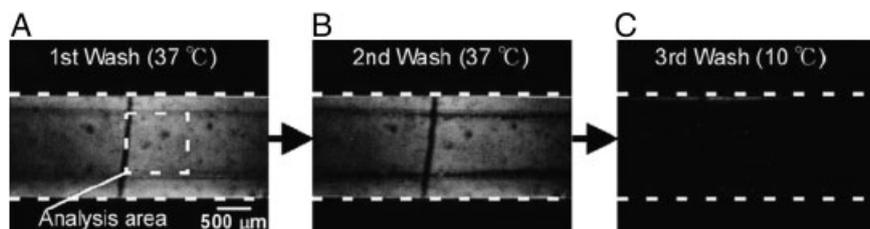


Figure 1. Confocal laser scanning microscopy of poly-*N*-isopropylacrylamide grafted onto a PDMS microchannel showing the presence or absence of FITC-biotin after several washes with 1 mL of PBS (reprinted with permission) [82].

resulting PEG-functionalized TPE surface displayed low pH-stable EOF and low levels of protein adsorption.

In these publications reporting ATRP-based strategies for producing microchips, some of the results obtained concerning the separation of protein mixtures are clearly impressive and will be discussed in the section devoted to CZE separation. However, it should be stressed that these approaches, although quite promising, require very specific synthesis skills for production of the microchip.

Prospects for the development of future surface treatments to improve the electrophoretic separation of proteins depend on the introduction of polymer multilayers [88] and active electrical control of the surface charge by inorganic layers in a system referred to as the gate-controlled surface [89].

Polymer multilayers are of potential interest for the maintenance of more constant EOF values, but the performance of these multilayers in the prevention of protein adsorption depends strongly on the chemical nature of the protein. Alkaline, acidic, hydrophobic and hydrophilic proteins therefore cannot be efficiently separated simultaneously on the same multilayer coating.

Gate-controlled electro-osmotic devices bearing electrically active interfaces on the separation channel are considered promising. In such devices, the surface charge can be adjusted by an electrically polarizable interface controlled by electrodes. However, it will probably be necessary to combine this versatile strategy with the use of thin organic coatings to limit protein adsorption, and scientists working in the field of microfluidics will need to develop this area of research further. Progress is slowed by several problems relating to the control of electrochemical phenomena, the integration of gate electrodes and finding electrical material suitable for the fine-tuning of the EOF. In conclusion, electroactive surfaces for controlling the surface charge of the channels are likely to be a key development addressing the issues of surface treatment in microchips. However, several technological advances and also expensive facilities are required for the micromanufacture of such complex devices. Most analytical scientists will probably continue to use PEG and cellulose derivatives to coat microchips for protein electrophoretic analysis, as these molecules currently have a superior performance for the reduction of EOF and adsorption.

3 Pretreatment and detection of protein samples on microchips

3.1 Preconcentration of proteins

Target proteins in biological samples are often present in trace amounts. Specific purification procedures are therefore required to concentrate them and to remove unwanted salts and buffer components, together with more abundant proteins, for subsequent analysis. These preconcentration steps are necessary to improve separation efficiency because

only small amounts of sample can be handled within the microchannels of microdevices. Sensitivity is also a major concern when considering preconcentration steps on chips. Various strategies may be used to enhance the sensitivity of microdevices. The most frequently used techniques for increasing microchip sensitivity are of two types: static and dynamic online sample preconcentration [19, 26].

3.1.1 Dynamic online sample preconcentration methods

3.1.1.1 ITP and transient-ITP

ITP is a simple and effective separation and preconcentration method easily integrated into chips to precede other operations, including zone electrophoresis in particular. In ITP, a long sample plug is injected between discontinuous buffers containing leading electrolyte (LE), and terminating electrolyte (TE) solutions. The LE solution contains ions of a higher effective mobility than those of the sample, whereas the TE solution contains ions of lower effective mobility.

Cui and coworkers [90] suggested using ITP stacking to concentrate a mixture of three fluorescent proteins in a microfluidic PDMS chip with two T-junctions (Fig. 2) [90]. The LE used in this work was 10 mM HCl in Tris (pH 9.5), and the TE was 60 mM ϵ -amino-*n*-caproic acid in Tris (pH 10). The sample solution contained R-phycoerythrin, GFP and allophycocyanin mixed and diluted in the LE solution to concentrations of 0.03, 0.06 and 0.06 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectively. All the solutions were prepared with 2% w/v MC, to decrease EOF. The protein samples initially introduced into the microfluidic chip were successfully stacked into adjacent zones with an estimated concentration 40 times higher than their initial concentration.

Mohamadi *et al.* have recently reported a fully automated preconcentration and stacking method based on t-t

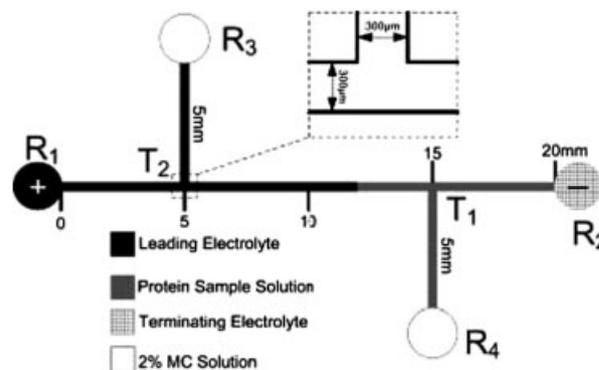


Figure 2. Schematic configuration of a PDMS microchip allowing ITP preconcentration of proteins. The protein sample solution is superimposed on the LE. R_{1-4} are reservoirs and T_{1-2} are T-junctions. Constant voltages are applied between R_1 and R_2 , whereas R_3 and R_4 are left electrically floating. The lengths of the straight channel and branch channels are 20 and 5 mm, respectively. The microchannel is 10 mm deep and 300 mm wide. Reprinted with permission from [90].

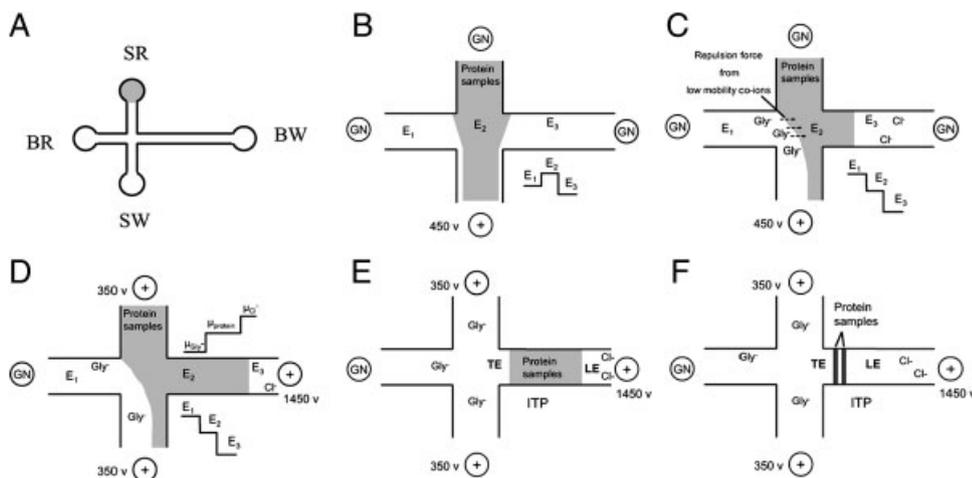


Figure 3. Schema of online ITP pre-concentration. (A) Chip layout. The BW, SW and all the channels were filled with the desired concentration of MC in the LE. The BR reservoir was filled with the same concentration of MC as used in the microchannels but prepared in the TE. The sample was loaded into the SR reservoir. (B–F) The channel intersection during sample injection and pre-concentration. Part (B) shows the sample flow before arrival of the TE zone at the intersection. Part (C) shows the intersection of the TE zone facing the sample flow. Part (D) shows the intersection after switching the voltage to the separation step. Part (E) shows formation of the sample plug at the beginning of the separation channel. Part (F) shows the stacked protein sample zones resulting from the transient ITP. Parts (D–F) show autonomous phenomena, occurring sequentially with no stop in less than 1.5 s. E1, E2 and E3 show the electric field strength in TE, sample and LE zone, respectively. Reprinted with permission from [91].

ITP on a standard cross-channel microchip made of PMMA (Fig. 3) [91]. The ITP stacking was followed by on-a-chip non-denaturing gel electrophoresis (GE) in MC solution, which successfully separated the free HSA from its immunocomplex. The LE buffer was 20 mM Tris-HCl (pH 8.3) supplemented with 0.01% Tween-20, to decrease protein adsorption onto the microchannel walls, and the TE buffer was 192 mM glycine in 25 mM Tris (pH 8.3). ITP-based sample stacking increased the peak intensities of the labeled HSA and the anti-HSA antibody by factors of 40 and 270, respectively. The addition of 5 or 10 mM NaCl to the LE enhanced the signal by a factor of 800.

Recently, Lin *et al.* combined ITP with GE on a plastic device for the on-chip sample pre-concentration of FITC-labeled protein markers [92]. In this work, the ITP-GE microchip design made it possible to introduce the sample and TE solutions simultaneously, *via* a single syringe pump, to form the sandwiched zones. Figure 4 [92] shows the stacking and separation of six FITC-labeled protein markers. If the strongest peak, that for BSA, is used for normalization, the normalized peak height of the other five proteins after stacking is 2–3.5 times that for BSA. Moreover, the weakest peak, that for trypsin, displays the greatest enhancement of peak height of any of the proteins present. These observations strongly indicate that ITP stacking preferentially increases the concentration of analytes with lower concentrations. Such discrimination could lead to a decrease in the dynamic detection range and has not been reported for other enrichment methods in CE. This phenomena, however, is characteristic for ITP methods alone and has been reported previously for protein separation [93].

A microchip-based immunoassay combining ITP with GE for the pre-concentration of antigen and antibody before

binding was recently developed by Park *et al.* [94]. This ITP system increases the sensitivity of an immunoassay for α -fetoprotein by a factor of 200. The quartz-based LabChip developed in this work generates high-quality data, through intelligent control of the automated system. Similarly, an on-chip immunoassay involving ITP concentration, in-channel reaction, CGE separation and LIF detection has been shown to be a potentially rapid and sensitive method for both clinical and research applications. This device was described for the measurement of α -fetoprotein, which was detected within 136 s, with a detection sensitivity of 5 pM [95].

Despite the small number of examples of successful protein enrichment by ITP, this technique remains a flexible and powerful method for the online concentration of biomolecules and can provide very high enrichment factors for low-concentration samples.

3.1.1.2 Field amplified stacking-based methods

Many online sample pre-concentration methods for proteins have been proposed. One of the earliest examples used on microchips is provided by field-amplified stacking-based methods. These methods include FASS [19, 96–98], field-amplified sample injection (FASI) [26, 96, 97], large-volume sample stacking [26], pH-mediated stacking and normal sample stacking [26]. In this work, we focus on FASS and FASI because these are the simplest methods and also the most widely used in recent years.

Generally speaking, FASS involves injecting a plug of samples in a low-concentration buffer into a BGE of the same composition, but at higher concentration. An electrical field discontinuity is generated across the concentration boundary. Charged analytes are then automatically stacked

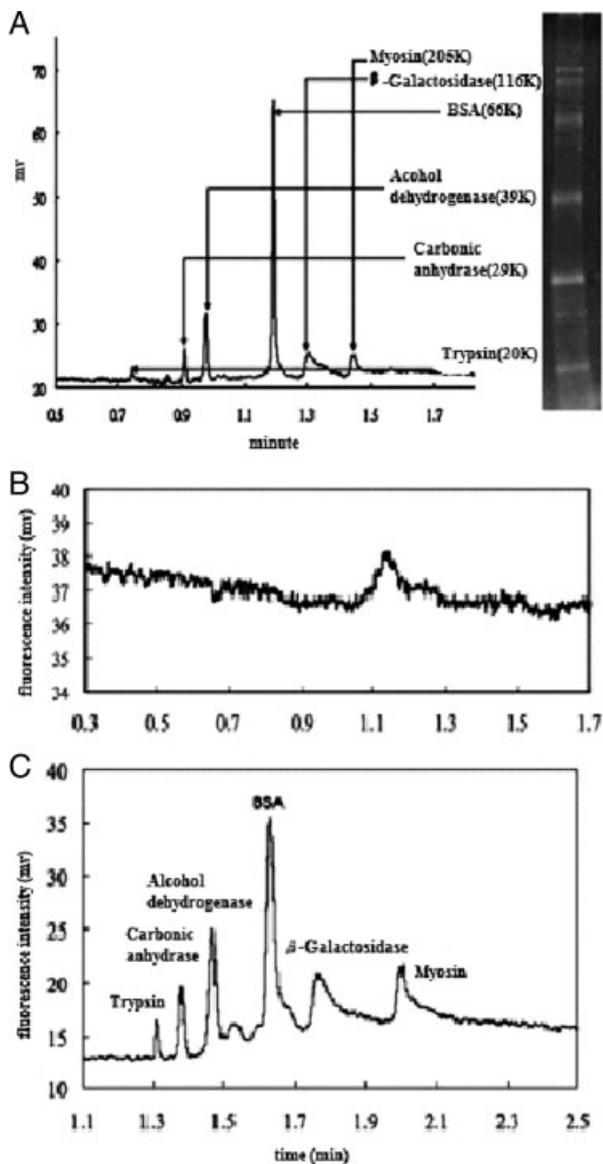


Figure 4. Separation of 1000 ppm and 100 ppm of FITC-labeled proteins markers without stacking (A and B, respectively) and with stacking (C). Reprinted with permission [92].

due to a change in velocity on crossing the concentration boundary. This “stacking” effect results in a substantial concentration of the analyte at the concentration boundary. Other mechanisms based on changes in the pH or viscosity of the BGE have been proposed to establish a difference in velocity between the two regions.

FASS is very simple and easy to apply to a wide range of analytes, including biomolecules such as proteins. FASS is thus the most common method used for CE applications. However, FASS has one major disadvantage: samples must be prepared in low-conductivity matrices, limiting the use of this method to low-conductivity samples.

Until now, FASS has been largely underexploited for analyses of proteins on microchips. The most recent attempt

to use this technique is that reported by Yang *et al.* [99]. On a glass microchip coated with a polyallyl-glycidyl ether-co-N,N-dimethylacrylamide to decrease EOF and to control the exact location of the stacked sample, a fluorescein-labeled protein was separated from fluorescein sodium salt by stacking, which increased the signal by a factor of about 100.

FASI is a modified version of FASS based on the difference in conductivity between the sample solution and BGE. It is the most frequently used stacking method, due to its simplicity and practicality.

Pan and Zhao [100] recently reported a highly effective on-a-chip concentration method for the detection of GFP on a simple cross-channel microchip by combining field-amplified concentration and reversed-voltage concentration. The field-amplified preconcentration was achieved by applying the appropriate voltages to the various reservoirs of the microchip. GFP was then stacked in the BGE zone, close to the sample/BGE boundary. The application of a new set of voltages led to another round of field-amplified stacking because of the presence of a boundary between the low-conductivity matrix and the high-conductivity GFP-concentrated zone. GFP was stacked in the running buffer close to the boundary. The results obtained demonstrate the importance of both the field-amplified preconcentration and reversed-voltage concentration steps for maximizing the GFP concentration factor. With field-amplified preconcentration only, the GFP signal was increased by a factor of only 6. With reversed-voltage concentration only, GFP was concentrated by a factor of 10. However, with a combination of field-amplified preconcentration and reversed-voltage concentration, the total concentration factor was 14.

FASS and FASI are simple and almost universal methods for the online preconcentration of proteins.

3.1.1.3 Sweeping

Sweeping is a powerful online sample preconcentration technique that improves the detection sensitivity of MCE. This approach is designed to focus the analyte into narrow bands within the channel, thereby increasing the sample volume that can be injected, with no loss of MCE efficiency. It makes use of the interactions between an additive, such as a pseudostationary phase (PSP) or complexing agent, in the separation buffer and the sample in a matrix devoid of the additive used. Pan and Zhao [100] recently developed a microchip for strong GFP enrichment through a combination of field-amplified preconcentration and sweeping. Their work clearly demonstrated the potential of BSA as an excellent PSP for GFP sweeping. With 2% BSA in the running buffer, the GFP signal was enhanced by a factor of 95. It should therefore be possible to concentrate proteins by sweeping methods, and BSA seems to be suitable for use as a PSP for online protein concentration.

3.1.1.4 Preconcentration by focusing

The potential of techniques based on focusing to concentrate analytes is well known. In these methods, analytes are focused at the points at which migration velocities fall to zero.

Recently developed preconcentration techniques based on focusing for use with proteins on microdevices include EFGF and TGF. An excellent review was recently published by Shackman and Ross [101], in which the theoretical basis of these focusing techniques was explained and these techniques were compared with conventional electrophoretic approaches for enrichment. These counterflow gradient focusing methods are suitable for use not only as an analytical method (see Section 4.4), but also for preconcentration.

As these methods were not considered in our previous review, we will briefly summarize the development of these techniques since 2002.

3.1.1.4.1 EFGF

EFGF is an emerging technique for the concentration of biomacromolecules, such as proteins, based on the opposing forces of an EFG and hydrodynamic flow. EFGF can easily be manipulated to retain target proteins by focusing in the separation channel. This method is particularly attractive for isolating and concentrating trace target proteins of interest.

Tolley's group has provided an exhaustive theoretical description of EFGF [102, 103]. A microdevice based on an ion-conducting polymer shaped to produce a suitable EFGF was developed by Lee's group in 2004 [104]. Impressive results have been published for GFP at a concentration of 180 nM, with an enrichment factor of 10^4 in 40 min. This result demonstrates the tremendous potential of analytical equilibrium gradient methods for sample enrichment.

Another approach to producing a conductive membrane integrated into a polymeric EFGF microdevice was then developed by Liu *et al.* [105]. This device increased protein concentration considerably, by a factor of 4000 in 60 min for GFP, although this effect was significantly weaker than the strongest known such effect [104]. Unfortunately, the procedure for producing this chip and its chemistry were complex, and the membrane strongly influenced the behavior of the micro-EFGF (μ EFGF) device. When the current in this microdevice exceeded 30 μ A, the protein bands were skewed and the membrane was destroyed by Joule heating.

Lin *et al.* also developed a tandem μ EFGF system coupling a hollow dialysis fiber with a shaped conductive polymeric hydrogel [106]. This system was used to remove high-abundance proteins, such as HSA, while concentrating relatively low-abundance proteins, such as α_1 -acid glycoprotein. This tandem μ EFGF system has also been used for the selective concentration of target proteins and the removal of unwanted components from a mixture by carefully controlling the voltage applied and hydrodynamic flow. Kelly *et al.* described a fabrication approach involving the use of sacrificial layers and solvent bonding to imprint channels into PMMA, for the development of a μ EFGF device including membrane-based protein preconcentration [107]. The ability of this device to concentrate proteins was demonstrated by the enrichment factor for R-PE of about 10 000 obtained over a period of 40 min. This result illus-

trates the power of interfacing ion-permeable membranes with microfluidic technology for sample preconcentration.

Other members of Lee's group [64] have subsequently improved the EFGF device [104] and produced a PEG-functionalized acrylic plastic with excellent resistance to protein adsorption and limiting the problems of electroosmotic flow. A mixture of R-PE and GFP proteins was successfully concentrated and separated. However, this device did not provide the predicted linear EFG and a stable current. The authors have recently overcome this problem by replacing the Tris-containing hydrogel with a hydrogel containing phosphate buffer and a salt with high-mobility ions [108]. The improvement resulted in a linear electric field distribution consistent with the shaped gradient region in the new device. These authors also investigated the effect of separation channel diameter on the focused sample bandwidth and concentrating capacity. The EFGF device concentrated a 2 ng/mL R-PE sample by a factor of 14 000.

3.1.1.4.2 TGF

Another type of counterflow gradient focusing suitable for use in a simple straight channel without the need for embedded electrodes, membranes or salt bridges has been developed. This technique, in which the velocity gradient is generated by applying a temperature gradient along the length of the separation channel, is called TGF [109]. This approach simplifies chip production and results in the strong focusing and concentration of wider groups of analytes, including proteins. Ross *et al.* used a silica capillary tube embedded in a thin polycarbonate chip for GFP focusing. A buffer consisting of an equimolar mixture of Tris and high-concentration boric acid (900 mM) improved the focusing of a recombinant GFP. Due to its low conductivity, this buffer reduces Joule heating during the application of a moderately high voltage to the microchannels.

A tapered microchannel on a PDMS chip was recently used for TGF, to generate a gradient of Joule heating [110]. The concentration of FITC-labeled BSA was increased by a factor of at least 200, within a period of 10 min, in a single-channel device, without the application of pressure.

3.1.2 Static online sample preconcentration methods

These preconcentration techniques are based on interactions between analytes and a single stationary phase. Different types of interaction (hydrophobic, ionic) and of support (beads, monoliths, membranes) can be used. Although very promising, these techniques have been little exploited in recent years for protein enrichment. A microchip electrophoretic immunoassay (μ CEI) for the coenrichment and subsequent immunoassay of matrix metalloproteinase-8 from a saliva sample (Fig. 5A) [111] was recently described. The various steps of preconcentration against the size-exclusion membrane are described in Fig. 5B [111]. The sensitivity and dynamic range of the μ CEI

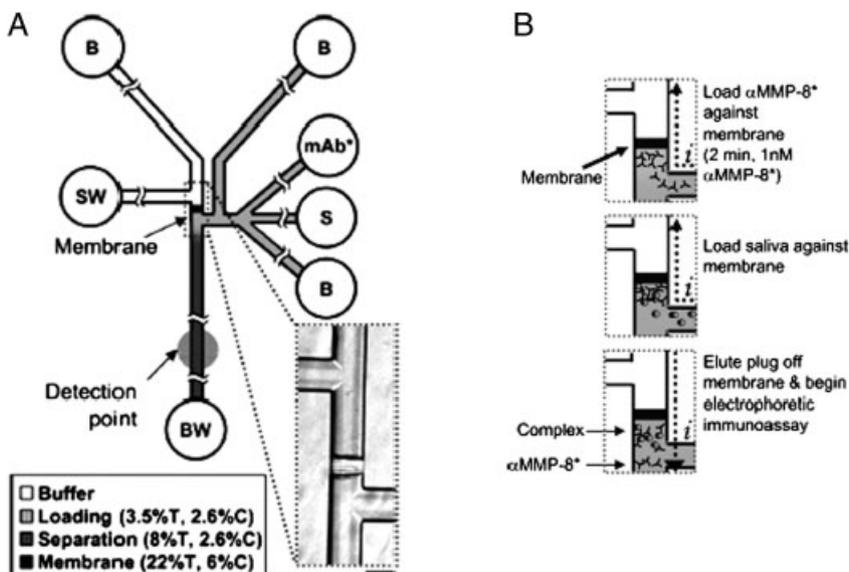


Figure 5. μ CEI of proteins. (A) Chip layout. Fluid wells are labeled according to their contents, as follows: S, sample; B, buffer; SW, sample waste; BW, buffer waste; mAb*, fluorescently labeled monoclonal antibody against matrix metalloproteinase-8. Polyacrylamide gel composition is indicated by gray-scale shading (%T and %C are the percentage of total acrylamide and bis-acrylamide cross-linker, respectively). Inset shows a $40\times$ bright-field image of the size-exclusion membrane. (B) On-chip sample enrichment. Adapted from [111].

assay can be adjusted by varying either the duration of sample enrichment at the membrane or the magnitude of the electrical field applied during the enrichment step.

The use of monoliths for the efficient SPE of proteins is particularly relevant. Monoliths provide a large surface area for analyte adsorption or interaction, leading to efficient analyte preconcentration. The synthesis and location of monoliths within microchannels are also easy to manage by modulating exposure to UV light. They are therefore attractive candidates for achieving high sensitivity in the microfluidic analysis of proteins. However, SPE based on monoliths has not been used for protein preconcentration and enrichment on chips since 2007. Interested readers should consult the reviews published on this topic [30, 112] to obtain more information about the potential of monoliths as a support for analyte preconcentration and enrichment.

One potentially interesting application of this technique unrelated to CE separation was recently developed by Liu *et al.* It involves the use of a polymer microfluidic chip with *in situ* photopolymerized polymethacrylate monoliths for HPLC separation [113]. The integrated chip design includes a 15-cm-long separation column coupled to a 5-mm-long methacrylate monolith trap column, which functions as a SPE element. The device is used to clean up the sample and to enrich the sample in fluorescein-labeled intact proteins. It improves sensitivity by a factor of 150 and decreases peak width by a factor of 10 after microchip gradient LC separation.

3.2 Detection of proteins on microchips

3.2.1 Optical detection, fluorescence-based detection

Miniaturization has many advantages, but it is extremely difficult to detect analytes in small volumes. The development of sensitive detection methods is one of the most complicated

requirements for improving the performance of LOC. Only proteins containing tryptophan and/or phenylalanine (which are often of low abundance) display native fluorescence, dyes are used therefore to label peptides and proteins.

At least three chemical groups may be used for protein derivatization: the amino, carboxylate and thiol groups. Despite several severe disadvantages, fluorescence analysis after a single derivatization step performed off-chip or on-chip remains the most widely used method for detecting proteins in microsystems. Labeling efficiency is protein dependent. Many proteins have multiple sites for the derivatization reaction (particularly for amino-derived labeling), potentially resulting in the production of several species of tagged proteins: mono, di, tri-tagged species. This greatly complicates the analysis because it reduces separation efficiency. These features and the dyes generally used for protein labeling will not be detailed here, and interested readers should refer to a specific review on this topic [114].

3.2.1.1 Native fluorescence

Native fluorescence, using excitation wavelengths in the deep UV region of the spectrum, is one alternative method of protein detection. A recent review by Schulze and Belder [115] summarized the current status of native fluorescence in microchannel electrophoresis. This method avoids the need for a labeling step, but is limited by the need for UV-transparent materials, for both the chip and the optical components of the excitation path. The fluorescence of tryptophan, the amino acid with the strongest intrinsic fluorescence in proteins, depends strongly on pH. The highest fluorescence intensities are obtained between pH 9 and 11, with emission intensities reduced to one-third the maximal intensity between pH 3 and 8 [116].

For excitation with UV radiation at a wavelength of 200–400 nm, corresponding to photon energies of 3–6 eV,

photodegradation is the dominant limiting factor, whereas fluorescence saturation is the principal limiting factor at high excitation intensities. It is therefore necessary to optimize excitation intensities. This was demonstrated by Schulze *et al.* [117], who investigated the effect of excitation intensity on the detection of proteolytic enzymes in MCE with a non-confocal setup. Sensitivities of 5 µg/mL were obtained for trypsinogen, chymotrypsinogen and lysozyme.

One of the main limitations of deep UV native fluorescence detection is the high background signal due to Rayleigh scattering of the excitation light and background fluorescence. In this context, two-photon excited (TPEX) fluorescence appears very attractive, as the excitation wavelength is twice that for one-photon excitation. The label-free TPEX fluorescence detection of native proteins and the use of this method in MCE have been achieved with commercial microfluidic glass chips, for solutions in the micromolar concentration range, with excitation at 420 nm. The high cost of the laser system currently outweighs the use of cheaper chip materials, such as glass or even some plastics, for this system. However, these data suggest that TPEX could become a very attractive technique when cheaper laser technology becomes available [118].

3.2.1.2 Fluorescence after protein labeling

Polymer substrates can be produced rapidly and at low cost, but their optical properties are often poorer than those of highly transparent glass substrates. Opacity in the near UV is a common property of many polymers (PMMA, COC, polycarbonates). Extensive fluorescence emission arising from bulk SU-8 is observed when the excitation wavelength is in the near UV region. The signal-to-noise ratio obtained for fluorescein dyes was four times higher through Borofloat glass than on SU-8 chips, for excitation at wavelengths of 450–490 nm. The analytical performances of SU-8 and commercial glass separation devices have also been compared in analyses of FITC-labeled peptides or proteins. The sensitivity of detection through SU-8 microchannels was found to be similar to that through Borofloat glass if fluorescence illumination was provided at a visible light wavelength greater than 500 nm [78].

Liu *et al.* [70] reported a PEG-functionalized copolymer with a high transmittance (over 90%) in the 395–600 nm range. This transmittance rapidly decreased below 290 nm, and light at wavelengths below 270 nm was completely absorbed by the copolymer. At wavelengths of 290 to 395 nm, the optical transparency of the copolymer was slightly less than that of Acrylite OP-1, but higher than that of Acrylite FF. Thus, sensitive visible LIF detection can be applied to microdevices made with this copolymer. Furthermore, UV sources emitting UV radiation at a wavelength of 320–390 nm could be used to initiate polymerization in the copolymer microchannels. Using this PEG-functionalized acrylic copolymer, FITC-HSA was resolved into three peaks, possibly corresponding to multiply tagged species or polymeric forms of HSA. The separation of four proteins from an FITC-labeled mixture (α -lactoglobulin A, thyroglobin, myoglobin

and HSA) was achieved, but the sensitivity of the method was not discussed [70].

One disadvantage of fluorescence detection methods based on the covalent labeling of proteins is the presence of impurities, reaction by-products and excess fluorophore on the electropherogram. The presence of these molecules may be detrimental to the separation and detection of comigrating proteins.

The online removal of free fluorescein and the enrichment of the sample in labeled proteins can be achieved simultaneously with an on-chip SPE column, enhancing sensitivity by a factor of 150 and decreasing peak width by a factor of 10 on a microchip designed for gradient LC separation. This proof-of-concept was obtained for chromatographic separation, but nonetheless provides a firm basis for the further development of this technique for the electrokinetic separation and detection of labeled proteins [113].

The limitations of derivatization-based approaches have led to the development of procedures for label-free or unlabeled protein detection in microfluidic systems. A novel label-free protein assay method has been developed in which microchip separation is combined with LIF detection, based on the principle of monomer–dimer equilibrium for the fluorescent dye pyronin Y (PY), in the presence of the anionic surfactant SDS. PY, a cationic dye, can form monomers and dimers in aqueous solution (Fig. 6 [84]). When SDS is added to the dye solution, the dye dimerizes, resulting in an increase in the amount of non-fluorescent dimer obtained. If BSA is added to the dye-surfactant system, BSA and SDS may interact to form a negative micelle-like cluster complex, which destroys the microenvironment required for PY dimer formation, resulting in the separation of PY dimers into monomers. The monomer–dimer transition leads to a dramatic change in fluorescence intensity on microchip electropherograms with LIF detection. The linear dependence of PY fluorescence intensity enhancement on BSA concentration, over the range of 5×10^{-6} to 1×10^{-3} mg/mL, has been demonstrated, and a LOD of 1×10^{-6} mg/mL was attained for BSA [84].

Integrated optical waveguide technologies have been proposed for the fabrication of miniaturized optical detection systems for sensing in microchannels. These methods make it possible to use both absorption and fluorescence measurement methods [119]. It has been suggested that the use of a liquid core waveguide for on-column luminescent excitation and detection in CE could be transposable to microchips [61]. These new developments are considered highly promising in the field of protein detection.

3.2.2 MS detection

The major challenge in the coupling of chips to MS is the development of a stable ESI interface with a small dead volume and a limited risk of plugging. In the past, considerable efforts have focused on coupling MS with microfabricated devices; an overview covering the period

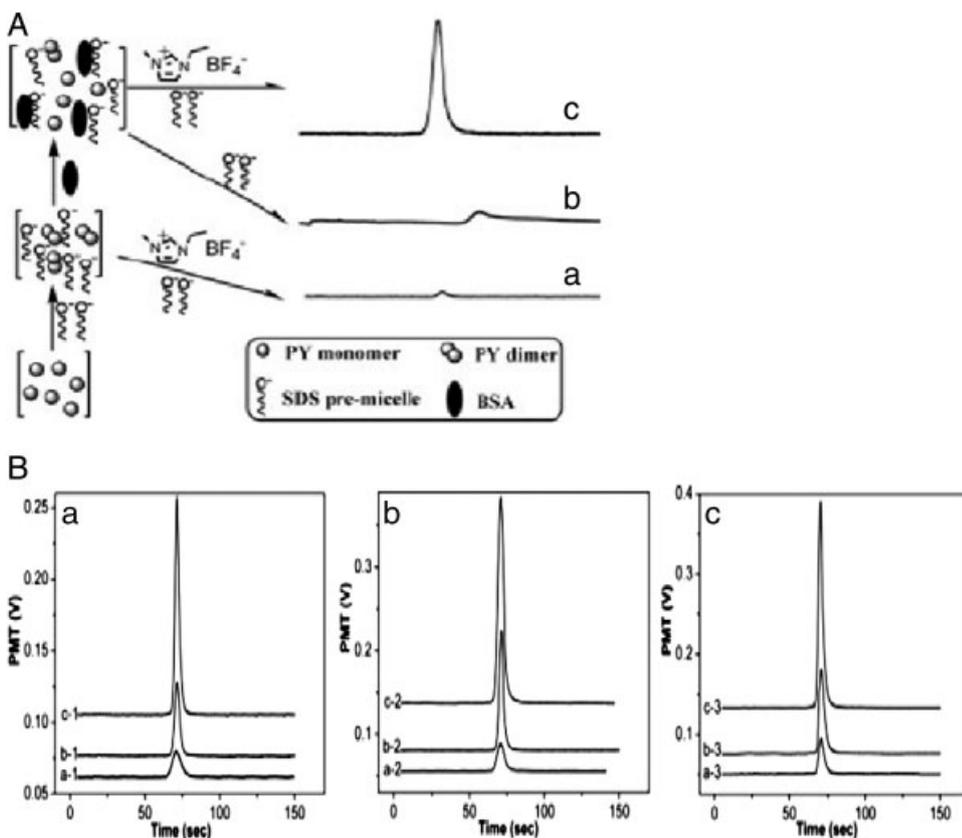


Figure 6. (A) Schema illustration of the label-free protein detection proposed by Xu and coworkers [65], (B) electropherogram from a chip analysis of four model proteins. (a) Bovine hemoglobin, (b) cytochrome c, (c) trypsin at various concentrations in 5 mM PY, 5 mM SDS and 10 mM PBS. Adapted with permission from [84].

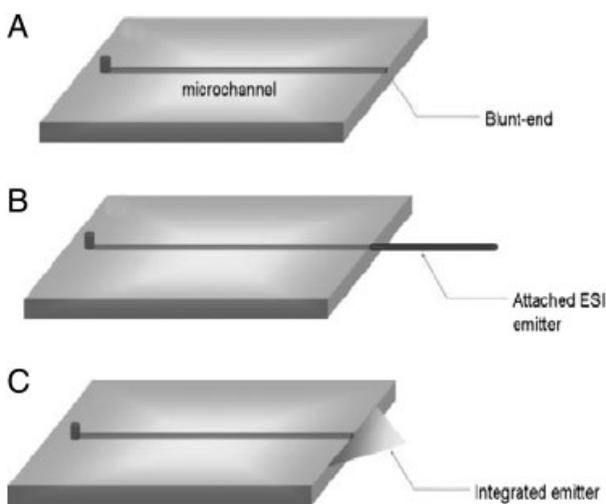


Figure 7. Different microchip interfaces for ESI [121]. Reprinted with permission.

1997 to 2006 is presented by Koster *et al.* [120]. The three areas of interfaces are discussed in Koster's review. The first approach developed involved spraying at the edge of the chip, the second involved the use of a silica capillary tube inserted into the microchips and the third approach involves fully integrated emitters, as shown in Fig. 7 [121]. A review dealing with the most recent developments in the interfacing of microfluidic devices with MS detection for use in the

challenging area of phosphoproteomics has recently been published [31].

New developments in the field of protein analysis have recently been proposed by the group of Ramsey. This group has reported a microfabricated device in which ESI is performed directly from the corner of a rectangular glass microchip, as described in Fig. 8 [122]. This set-up makes it possible to couple the chip directly with MS, without the use of external pressure. The spray tip, serving as an electrokinetic pump, was integrated into the chip. All the channels other than the side channels were coated with polyamine to reverse the surface charge [122]. A mixture of three proteins; horse skeletal myoglobin, horse heart cytochrome c and bovine pancreas ribonuclease A was successfully separated and detected with this system, following the injection of approximately 6 fmol of each protein.

A fully microfabricated and monolithically integrated CE-ESI chip for coupling with MS analysis was reported by Sikanen *et al.* These authors demonstrated the feasibility of using SU-8 microchips for protein CE-ESI/MS analysis. They carried out such an analysis on horse heart myoglobin, after the injection of 45 pg of this protein. Protein adsorption was prevented by adding 1-methoxy 2 propyl acetate to the BGE. This approach was considered more appropriate for MS analysis than that based on the commercial SU-8 developer previously reported by the same group. It had a lower surface activity and smaller impact on the electrospray process. For sheath flow, the ESI interface was patterned as an integral part

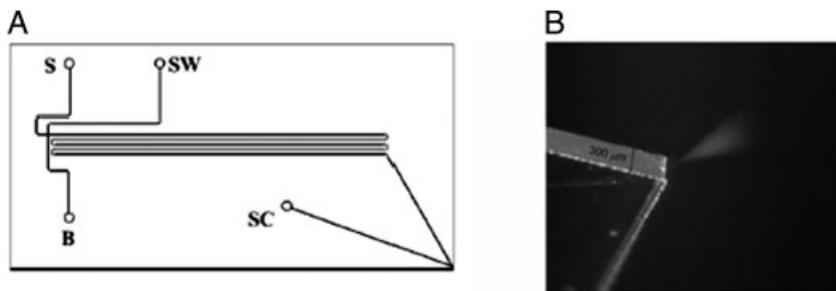


Figure 8. Schematic representation of a long-channel chip developed for CE-ESI-MS (A) and image of the electro spray plume generated from the corner of the chip (B). The length of the separation channel was 20.5 cm, the distance from the intersection of the separation channel and the side channel to the outlet was less than 200 μm and the channels were all 75 μm wide at full width and 10 μm deep. The liquid being sprayed was 0.2% acetic acid in 50/50 v/v methanol/water. The voltages applied to the microchip reservoirs raised the potential at the spray tip to 3.5 kV above that of the mass spectrometer inlet, causing the liquid to be pumped out of the chip at a flow rate 40 nL/min. Reprinted with permission from [122].

of the SU-8 chip and the fluidic design was dead volume-free, resulting in negligible peak broadening during analyses [79].

Many successful attempts at coupling MCE with MS have involved the use of peptide mixtures obtained from proteolytic digestions of proteins. For example, Li *et al.* [123] achieved a high level of sequence coverage (88.5%) for cytochrome on a PMMA-MCE connected to the low-sheath flow ESI interface *via* a connecting capillary. Finally, a single chip can integrate multiple processing steps, including efficient digestion, cell lysis, preconcentration, peptide separation and the MS sequencing of peptide fragments. The combination of these steps is highly promising for future developments in the field of proteomics.

3.2.3 Other modes of detection

The direct electronic detection of unlabeled molecules is an appealing solution as it is easily scalable and can be directly integrated into microchips. Alternative and innovative detection systems have been developed in recent years, but are mostly restricted to biosensing and not directly coupled to electrophoretic separation. Indeed, as pointed out by Xu *et al.* [124], electrochemical detectors have two major limitations that must be overcome in this field. The first is the ever-present surface of the electrode, which, while often advantageous in terms of its catalytic or adsorptive properties, is also frequently responsible for changes in sensitivity over time. The other is the decoupling of the electrical systems responsible for electrokinetic separation and the system operating the detector. There have been several demonstrations of the usefulness of this mode of detection for proteins in recent years, but very few studies have been published since these demonstrations. Electrochemical detection techniques are concentration-sensitive, so scaling down the size of the detector cell does not necessarily result in a loss of LOD. Miniaturization of the detection electrodes, defining the detector volume, may even improve LOD due to the lower levels of noise generated by the smaller electrodes used.

Three proteins, hemoglobin, albumin and glucose oxidase (at concentrations from 200 to 400 μM), were successfully separated and detected on a coated PDMS microchip, with end-channel amperometric detection based on the use of a copper electrode [62].

The LOD for conductivity is lower than that for other methods of electrochemical detection (such as amperometry), but this method has the advantage of being universal, overcoming the need for prior protein labeling. In 2007, Shadpour *et al.* described the first multichannel MCE device with integrated contact conductivity [125]. The 16-channel microchip capillary array was hot-embossed in polycarbonate. A pair of gold microelectrodes was incorporated into each of the 16 channels to serve as independent contact conductivity detectors. The performance of the device was evaluated by microchip-CZE of mixtures of amino acids, peptides and proteins. A LOD of 3.3 μM was reported for proteins.

4 Separation modes for protein electrophoresis on microchips

MCE is a promising technique for protein analysis because most modes of separation can be successfully transposed to microchips, allowing faster analysis. In this section, we will describe some recent innovations focusing on the various traditional modes (CZE, MEKC, CGE, CIEF), and some newer modes of separation (counterflow gradient focusing techniques) for analytical studies of proteins on microchips.

4.1 CZE and MEKC on chips

CZE on chips is one of the simplest and most rapid methods available and remains one of the most frequently used for protein analysis. However protein adsorption to channel walls remains a major problem in the CZE of proteins, whatever the type (glass-based or polymeric) of material used to make the microdevice. This leads to a loss of both

sample and performance. The surface materials are therefore often modified to increase separation efficiency and reproducibility. Two main approaches (dynamic and permanent coatings) to surface modifications have been used. However, dynamic adsorption is usually not reproducible or durable and permanent surface modification often involves multistep physical/chemical processing. Clearly, the development of new polymeric materials, with appropriate physical properties for microfabrication, which could be used for protein analysis without further surface modification, is of great interest. These points are extensively developed in Section 2.2, but most of the work concerns only the separation of model proteins. Based on published studies, it is clear that the main challenge currently facing us is the development of easy methods for coating the channel wall because surface modification is generally time-consuming and difficult, due to problems with wetting and bonding for channels with small diameters or the resistance of polymeric surfaces to chemical reaction. We present here only recent work not already discussed in Section 2.2.

Wang's group has proposed an improvement in the performance of their low-temperature bonding of quartz to microfluidic chips used for serum lipoprotein analysis. The strong adsorption of lipoproteins to the separation channel was a major problem in analyses of blood samples by MCE [126]. SDS was added to both the BGE and sample solution, to modify not only the channel surface and EOF, but also the lipoproteins themselves. SDS concentration in the sample was kept low enough (0.2 mM) to minimize particle delipidation, while allowing lipoprotein–SDS interaction. In these conditions, SDS increased the negative charge on the particles and walls, resulting in the repulsion of lipoproteins from the negatively charged wall. This method thus decreased lipoprotein adsorption and improved the resolution of lipoprotein separation. It was shown that small, dense low-density lipoproteins could be effectively separated with high reproducibility, leading to the determination of small, dense low-density lipoproteins in the serum of patients with coronary heart disease.

CZE has been recently combined with a new strategy for polymer microchannel surface modification, as reported by the groups of Lee [127] and Wolley [87]. This technique, ATRP, involves activation of the surface followed by the grafting of a suitable polymer. Sun *et al.* [86] reported the complete separation of four FITC-labeled proteins (β -lactoglobulin A, thyroglobulin, myoglobin and HSA) in 20 s with a hydrolyzed and PEG-grafted PGMAMMA device, with efficiencies of around 4×10^4 plates. The aminolysis-activated microdevice provided poor separation, demonstrating the major effect of the method used to activate the surface on the CE performance of microchips. Sun *et al.* subsequently improved the method for grafting a PEG-functionalized layer onto a PGMAMMA surface, using “in-channel ATRP” [127]. Fast and efficient CZE separations of proteins (HSA, insulin or protein mixtures) were obtained with the resulting microdevice, with 10 mM Tris-HCl at pH 8.8 used as the BGE. Separation efficiencies exceeded 1×10^4 plates

for a 3.5 cm separation channel. β -lactoglobulin A was used to evaluate the reproducibility and stability of this microdevice. The RSD for migration time and efficiency were 1.35 and 3.33%, respectively, over more than 200 sequential runs and over a 2-wk period for a single PEG-grafted PGMAMMA microchip. Thus, the in-channel grafted PEG-functionalized layer was more dense, homogeneous and stable in the long term than the PGMAMMA microchip modified by the previously reported ATRP method [86]. In another work, a PEG-functionalized TPE microdevice was used to separate, by CZE, phosphoducin-like protein (PhLP) from phosphorylated phosphoducin-like protein (p-PhLP), for measurement of the phosphorylation efficiency of this model protein [87]. The RSD of migration times was 6.6% over three runs for PhLP and 4.1% over four runs for p-PhLP, demonstrating the suitability of the microdevice for reproducible protein analysis.

Lee's group also proposed an original approach to fabricate a polymeric microchips, using PEG-functionalized acrylates as the major components of the monomer mixture, to prevent protein adsorption [70]. However, it was suspected that the small amount of MMA used to increase the mechanical strength of the material might affect CE performance. The authors recently investigated the effect of composition of monomers used for microchip construction [128]. Impure PEG diacrylate induced some EOF and increased the separation time, whereas MMA decreased the separation efficiency to approximately 25% that obtained for a microchip constructed without MMA. FITC- β -lactoglobulin A was used to assess the separation performance of the microchip. The efficiency of 3.2×10^4 plates for a 3.5-cm-long channel was obtained for microchips without MMA. Such microdevices separated *Escherichia coli* proteins in 70 s, with 10 mM Tris-HCl at pH 8.3 used as the BGE.

As pointed out in our previous review, MEKC is seldom used for protein analysis on chips. This trend has continued over the last few years, due to the low efficiency generally obtained with this mode for proteins. However, as multiple separation channels in microchips can be envisaged without the need for a connector, the combination of MEKC with other modes of separation (CZE or CGE) may be of particular value for multidimensional analytical systems. Several effective GE-MEKC 2-D microfluidic devices for protein mapping have recently been reported and will be described in Section 4.5. A recent review has also provided an overview of microchip designs and sample manipulations in microchip MEKC [11] but the authors have briefly considered the application of MEKC to biogenic compounds, including proteins. Several types of injectors (mixing-T or cross-channel) and separation channel geometries (spiral, cyclic and/or straight channels) have been proposed for MEKC on microchips, to increase efficiency. The problem of protein adsorption onto the microchannel surface may be partly resolved in MEKC by adding a surfactant to the buffer (SDS is the surfactant most commonly used). If adsorption is not completely abolished, it may be necessary to add salts or IL

to the electrolytes, forming mixed buffers requiring optimization. A simple but effective separation medium should therefore be designed. The use of surfactant may be compatible with several preconcentration methods such as sweeping and may find more interest [100].

Wang's group simplified the separation medium by synthesizing a water-soluble functionalized IL-BAS, which was successfully used for MEKC on a PDMS microchip [85]. This medium has the properties of both IL and surfactant and was used as both the supporting electrolyte and the surface modifier. The BAS solution with the optimum concentration (20 mM) had a stable pH (≈ 7.4) in the range of that of general biological buffers. This single, simple functionalized IL, replacing the mixed system of salts and surfactants, provided a good separation of protein mixtures (Fig. 9) [85].

Huang *et al.* reported the use of DDM/SDS mixed surfactants on PDMS microchips, to suppress analyte adsorption and control EOF; this topic is discussed in Section 2.2 [76]. This mixed surfactant system also formed negatively charged micelles, which acted as a separation medium in which proteins could be separated as a function of their affinity for the micelles (according to a MEKC mechanism). The low critical micellar concentration of these mixed micelles also made it possible to use SDS at a non-denaturing concentration, making it possible to analyze proteins in their native state. The immunocomplex between a membrane protein, β_2 adrenergic receptor and anti-FLAG antibody was fully separated with 0.1% w/v DDM and 0.03% w/v SDS. The effect of DDM/SDS mixed micelles was also demonstrated by the separation obtained for the 11 photosynthetic protein–chromophore complexes (including one transmembrane protein complex) of cyanobacteria. Thus, the method developed has many applications, as membrane proteins are often difficult to analyze because of their poor solubility.

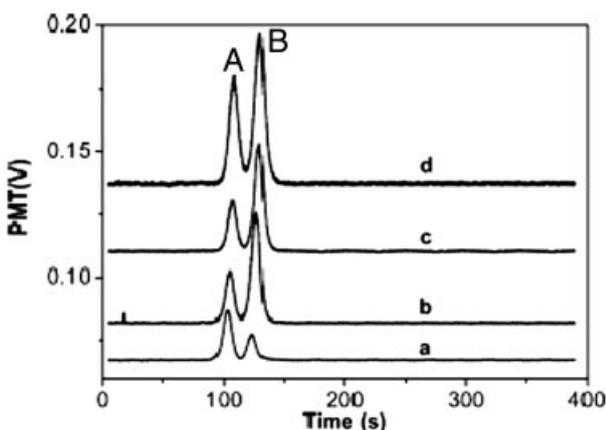


Figure 9. Electropherograms of Cy3-extravidin and Cy3-IgG mixtures: (a) 0.20 mg/mL Cy3-extravidin and 0.20 mg/mL Cy3-IgG; (b, c) 0.20 mg/mL Cy3-extravidin and 0.60 mg/mL Cy3-IgG; (d) 0.40 mg/mL Cy3-extravidin and 0.80 mg/mL Cy3-IgG, respectively. Fluorescence intensities of (A) Cy3-extravidin and (B) Cy3-IgG. Reprinted from [85].

4.2 Microchip CGE (μ CGE)

The rapid sizing of proteins by CGE on microchips is a very powerful technique widely used in a number of commercially available systems, as discussed in our previous review [20]. Several recent publications have described applications of these CGE LOC techniques (Agilent 2100 Bioanalyzer System, μ ChemLab or LabChip 90) or new developments of the technique.

On-chip CGE has been used for the rapid prescreening of mouse serum samples before proteomics analysis [129]. The CGE system was found to be faster and more stringent and to display lower levels of technical variation than SDS-PAGE. Chen *et al.* [130] described the use of the LabChip 90 instrument for monitoring the quality of a monoclonal antibody. Under both reducing and non-reducing conditions, microchip analyses provided a similar resolution and sensitivity to conventional CE-SDS separation, but were 70 times faster. μ CGE has also been shown to be suitable for characterizing cervicovaginal protein profiles and detecting IgA heavy and light chains in cervicovaginal samples [131]. Proteins with a wide range of molecular masses were separated within 1 min. A microfluidic assay on a 2100 bioanalyzer has been developed for the sensitive, specific and accurate measurement of microalbuminuria in urine samples from patients with diabetes [132]. Pizarro *et al.* [133] developed a rapid, portable chip GE for characterizing bacteria on the basis of their characteristic protein signatures. This method generated very different patterns for spores and vegetative cells. Similarly, Fruetel *et al.* [134] used μ CGE to generate protein signatures for various viruses. An analysis of two closely related bacteriophages, T2 and T4, showed that this technique was sufficiently sensitive and gave high enough resolution between protein peaks to distinguish these two phages. Baba's group investigated various polymer solutions such as linear-polyacrylamide [135], and dextran [67] as potential low-viscosity protein sieving matrices. Reproducible, highly efficient size-based separation of proteins was successfully achieved with a coated microchip reducing EOF and protein adsorption. This coating also improved the compatibility of SDS-protein complexes with PMMA microchips. The method used to coat the channel wall on the PMMA microchip by the thermal immobilization of cellulose derivatives was discussed in Section 2.2. Other authors from the same group demonstrated that, in addition to its role as a dynamic coating for PMMA microchips, 0.5% MC solution supplemented with 0.01% Tween-20 can also be used as a sieving medium [66]. Indeed, the MC polymer retained its entanglement characteristics in the presence of 0.01% Tween-20. A Ferguson plot for model proteins in non-denaturing conditions showed that the use of MC solutions at concentrations well below the entanglement point led to the establishment of GE-type separation rather than electrophoresis in free solution. These authors also reported a dynamic cross-linking effect of Mg^{2+} , enhancing the sieving properties of low-viscosity PVP solutions [136]. The separation resolution for proteins under non-denaturing conditions on PMMA microchips was improved by adding

Mg²⁺ to PVP solutions because this increased the hydrodynamic radius of PVP polymers by 20%, thereby stabilizing the structure of the PVP.

Several attempts have been made to combine CGE with other separation or preconcentration steps. PMMA microchip affinity CGE has been evaluated for the analysis of thrombin levels in plasma [137]. Dye-labeled aptamers were used as affinity probes under non-equilibrium electrophoresis conditions. The presence of the polymers made it possible to separate free aptamer from the thrombin–aptamer complex, while stabilizing the affinity complex. The successful integration of different methods for enriching samples (SPE, ITP, *etc.*) and CGE on the same microchip has been demonstrated by several groups [95, 111, 138, 139]. These devices enhance detection sensitivity by a stacking effect, as discussed in Section 3.1.

Makamba *et al.* [140] provided the first report of the photopatterning of single-walled carbon nanotube (SWNT) composites with soft hydrogel polymers in glass microchannels (Fig. 10) [140]. The SWNT gave the required physical strength, enabling the mechanically fragile organic polymer to resist breakdown when subjected to liquid flow within the microfluidic channel. The soft hydrogel polymers formed a polymerized sieving medium similar to those used in GE for protein separation. The nanocomposites were able to concentrate the injected protein samples (mixture of IgG, casein and BSA) and shortened the separation distance to within 1 cm with the use of gel-free buffers. The absence of a gel in this system considerably decreases the probability of channel blockage, thus prolonging the life of the device.

Root *et al.* [75] recently reported the use of an ALS as a replacement for SDS for size-based protein separations on microfluidic chips. ALS is of particular interest in proteomics, as it breaks down at low pH and can therefore be removed to reduce surfactant interference with downstream MS analysis. The electrophoretic mobilities of the proteins were not significantly affected by the replacement of SDS with ALS, consistent with the protein–surfactant complexes having a similar charge-to-size ratio for both surfactants. Protein separations with ALS on glass microchips dynamically coated with poly-*N*-hydroxyethylacrylamide were performed in less than 3 min, a significantly shorter time than that required for slab gel separations.

4.3 Microchip IEF (μ IEF)

μ IEF is a strong developing area in the field of protein analysis. IEF has considerable advantages in terms of

resolution, but IEF separation on microchips is highly challenging. A number of reviews have been devoted specifically to recent advances of IEF on microfluidic devices [32, 33] and another includes a significant contribution to this topic [35]. Most applications to date have been based on prototype chips and instrumentation that may be more costly than conventional approaches. However, some of the key challenges encountered in the widespread diffusion of μ IEF include the need to improve access to automation, visualization strategies improved separation resolution or peak capacities, particularly for 2-D implementations. Single-point detection is often used but is generally considered not to be ideal because it requires mobilization of the focused proteins through the detector, increasing the time required for analysis and inducing dispersive band broadening and degradation of the established pH gradient. Whole-column imaging detection (WCID) systems have been developed to eliminate the mobilization step, thereby reducing the de-focusing of protein bands and improving resolution. UV- and LIF whole-column imaging are the major methods of detection for μ IEF, as discussed in our previous review and in the paper by Ren [20, 141].

EOF sweeps the focused bands out of uncoated channels before focusing is completed, making it necessary to coat the chip with a substance to decrease EOF. Zhang *et al.* [69] studied the effect of HEC dynamic coatings on the IEF of proteins. This coating strategy was discussed in Section 2.2 of this review. It was shown to both decrease protein adsorption and reduce EOF. Both these attributes resulted in the highly efficient separation of BSA and GFP in both free-solution electrophoresis and IEF. A resolution of proteins with a *pI* difference of 0.1 pH values was demonstrated with an HEC-treated COC device.

A new method for integrating commercial dialysis membranes into PDMS microfluidic chip-based cartridges was developed for protein analysis by IEF-WCID [142]. The integrated membrane separates electrolytes and samples and reduces undesired pressure-driven flow, facilitating sample injection and significantly improving the repeatability of chip-based IEF (<1%). A mixture containing six *pI* markers (*pI* from 4.6 to 8.8) was successfully separated by IEF-WCID in a pH range of 3 to 10. The pH gradient was shown to be linear, by plotting the *pI* value against peak position. The separation of a more complicated human sample containing different hemoglobins (Hb), HbA, HbF, HbS, and HbC, was also achieved.

In an attempt to mimic a diluted gel structure, an original uncovered micropillar array for protein IEF

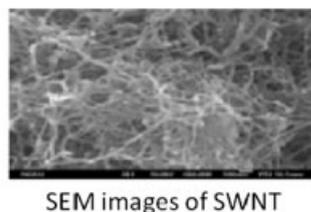
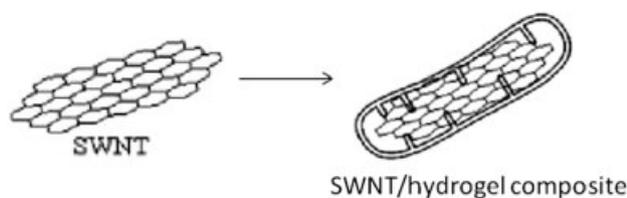


Figure 10. Structure of SWNT/hydrogel composite proposed by Makamba *et al.* for CGE on chips. Reprinted with permission from [140].

separation was designed. This array consisted of a rectangular zone of PDMS micropillars protruding into a block of PDMS (Fig. 11) [143]. The geometry of the micropillar array was optimized by evaluating the influence of pillar shape, pillar size and interpillar distance on evaporation and IEF separation. A mixture of proteins with pI values of 4.7–10.6 was successfully separated within this microdevice by IEF, with a resolving power no less than that obtained with a conventional minigel. The uncovered design facilitates access to the sample for immunoblotting after protein separation.

Several modeling studies have recently been published. These studies have focused on the investigation of EOF and electrophoretic mobilization in microchannels made of PMMA and PDMS [144], the effect of carrier ampholyte (CA) concentration on protein behavior in on-chip IEF [145] and the dispersion of protein bands in horseshoe microchannels during IEF [146]. In particular, Ivory's group has developed a model for simulating non-linear IEF in 2-D microgeometries [147].

Despite recent developments and the success of μ IEF devices, these systems still suffer from some drawbacks, such as poor temporal pH gradient stability due to cathodic drift, adverse protein–CA interactions, and the need for costly CA that must be replaced for each new analysis. For these reasons, several groups have developed non-ampholyte μ IEF methods, such as the IPG and EFG techniques discussed in Section 4.4 of this review. The first successful adaptation of IPGs to the microscale (μ IPGs), based on the use of a new method for fabricating precise and reproducible on-chip polymer gradients, was achieved by Sommer *et al.* [148]. This approach made it possible to establish a pH gradient due to the diffusion of Immobilines across the separation channel before its immobilization by gel photopolymerization (Fig. 12A and B) [148]. The resulting device allowed the rapid IEF (<20 min) of several fluorescent pI markers and proteins across a gradient of pH 3.8–7.0, in both denaturing and non-denaturing conditions, providing a resolution and

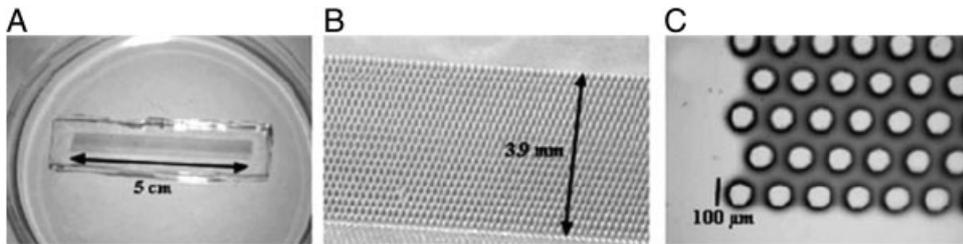


Figure 11. The micropillar array filled with a colored solution used for IEF on PDMS microchips. Micropillar array dimensions: 5 cm length, 3.9 mm width. (A) General view, (B) zoom on the micropillar area, (C) cylindrical micropillars (diameter 100 μm, height 50 μm) in triangular arrangements. Reprinted with permission from [143].

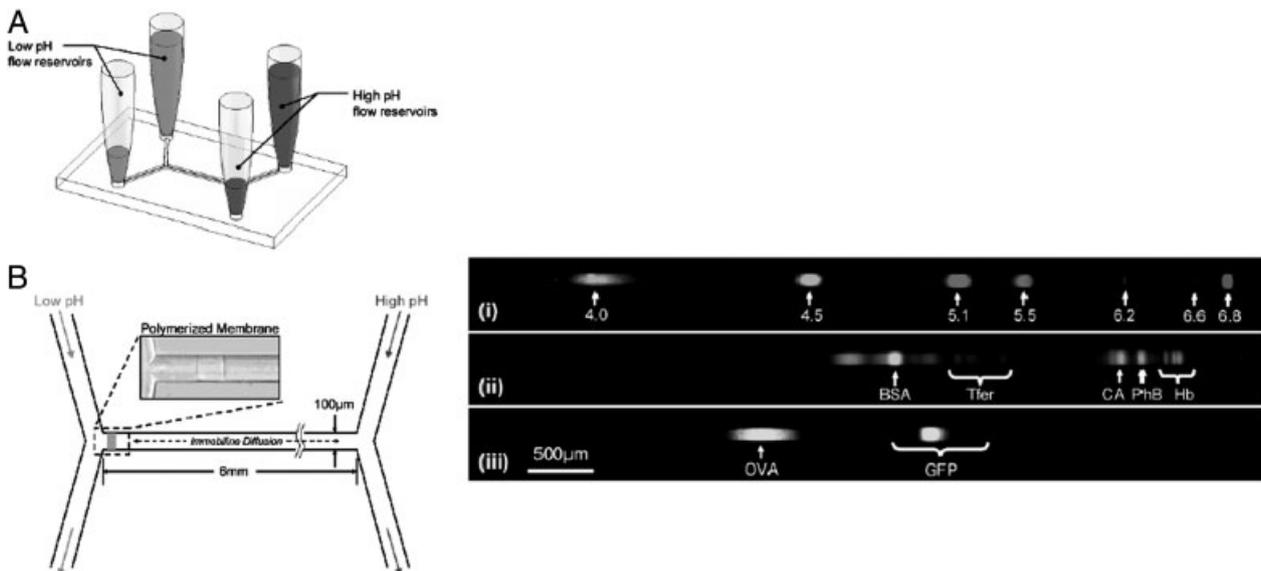


Figure 12. μ IPG of proteins on a glass microchip. (A, B) Chip design. (C) Fluorescent micrographs of focused pI markers (i) and proteins (ii and iii). Gravity was used to provide continuous pressure-driven flow from filled reservoirs through the side channels of the microchip. A thin polyacrylamide membrane prevented flow through the 6-mm separation channel but allowed the equilibration of Immobiline species *via* diffusion. Reprinted with permission from [148].

peak capacity similar to that achieved with CA-IEF (Fig. 12C) [148].

Qiu's group [141] improved the WCID system, using an organic light-emitting diode (OLED) array as a spatial-scanning light source and a single PMT tube as the detector. The advantage of OLEDs is their flat and thin profile, facilitating simple on-chip excitation in close proximity to microfluidic channels. However, the OLED systems described to date do not compare favorably with systems based on laser excitation [149]. Only a few techniques for imaging μ IEF devices have since been developed.

Vlčková *et al.* equipped a commercial Shimadzu MCE-2010 system with a UV photodiode array imaging detector for on-chip μ IEF assays [150]. After the optimization of μ IEF conditions, therapeutic proteins, hirudin, erythropoietin and bevacizumab were analyzed in an linear-polyacrylamide-coated quartz microchannel. The RSD of *pI* determination by μ IEF ranged from 0.2 to 0.6% and was almost twice that obtained for conventional IEF, for a separation time only about a third of that for conventional IEF.

Only IEF along the direction of fluid flow is discussed here. However, another kind of protein focusing and separation perpendicular to the direction of fluid flow has been proposed as an alternative mode of IEF on chips. This method is known as “free-flow isoelectric focusing” and has been attempted in various chip formats [151–153]. This IEF method is commonly used for sample preparation and fraction collection. Microfabricated free-flow isoelectric focusing devices are simple, inexpensive, and disposable prefractionation devices that can be integrated with separation techniques on chips. However, in most cases, CAs are continually consumed to establish a stable pH gradient. This is expensive and may also interfere with subsequent identification by MS/MS. Other problems include the generation of bubble-forming water electrolysis products in the electrode reservoirs, Taylor dispersion and Joule heating. Interested readers may refer to a recent review specifically focusing on the miniaturization of free-flow electrophoresis [154].

4.4 Counterflow gradient focusing techniques on chips

Over the last decade, a number of counterflow gradient focusing techniques, based on the principle of equilibrium gradients, have emerged. These techniques include EFGF techniques and its variants, including dynamic field gradient focusing (DFGF) and TGF. Excellent reviews covering recent advances in these techniques have been published [155–158]. These counterflow gradient focusing techniques facilitate protein separation by focusing proteins as a function of their electrophoretic mobility. However, the most useful current application of EFGF devices is in the preconcentration of target analytes as described in Section 3.1. These methods involve a combination of two forces under an electric field: the electrophoretic force of analytes

and a constant counterbalancing force due to bulk fluid flow. A gradient is applied to the electrophoretic velocity, such that the total velocity is equal to zero at a single point. The analyte moves from both directions toward the zero-velocity point at which it is focused into a concentrated plug.

Different types of counterflow gradient focusing may be defined on the basis of the mechanisms used to generate the velocity gradient necessary for focusing:

- (i) DFGF, involving the use of an array of electrodes separated from the separation channel by a dialysis membrane;
- (ii) EFGF, which can be performed with conductivity gradient focusing, dialysis membranes, or shaped ion-conducting polymers;
- (iii) TGF, involving the use of a buffer with a temperature-dependent ionic strength.

The groups of C. F. Ivory, M. L. Lee and D. Ross have been particularly active in the progress made over the last few years toward understanding fundamental processes and developing appropriate models for these gradient focusing methods. Indeed, most of the papers published in this field emanated from these groups.

The primary advantage of EFG methods is the focusing (rather than dispersive) nature of the separation. Miniaturization appears critical for exploitation of the full potential of EFG for both analyte concentration and peak capacity, as channel dimension affects not only the dissipation of Joule heating, but also the degree of Taylor dispersion. Moreover, μ EFGF devices provide a resolution for protein separation about four times greater than that for capillary-based EFGF systems (Fig. 13) [160], clearly demonstrating the advantages of miniaturization in gradient focusing methods [160].

Inorganic materials, such as silicon, glass and quartz, were initially used in the construction of microfluidic EFGF systems, but polymers, such as PDMS and acrylate-based copolymers, have also been considered. The major challenge of microfabrication lies in the integration of a

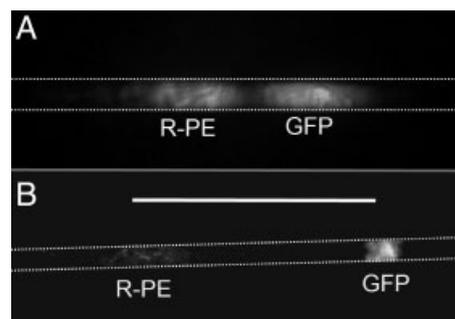


Figure 13. Separation of R-PE and GFP in (A) a capillary-based EFGF system and (B) a microchip EFGF device. The scale bar indicates 1 mm. For (A), the buffer was 5 mM Tris (pH 8.7), the counterflow rate was 30 nL/min, and the applied potential was +2000 V. For (B), the same buffer as in (A) was used, and the counterflow rate and applied potential were 20 nL/min and +600 V, respectively. Reprinted with permission from [160].

semi-permeable membrane into the microfluidic EFGF device. One of the most straightforward methods involves embedding a hollow dialysis fiber into the substrate during device assembly. TGF is easier to carry out than EFGF and can be applied to a broader class of analytes, including fluorescent dyes, amino acids, GFP and DNA.

4.4.1 EFGF

EFGF makes use of a gradient electric field along the length of a separation channel and a constant hydrodynamic counterflow. When the electric field at the inlet is higher than that at the outlet and the counterflow is introduced from the outlet, a faster electrophoretic migration of the analyte overcomes the hydrodynamic flow. The analyte therefore moves toward the outlet. As electrophoretic velocity is the product of electrophoretic mobility and electric field, each analyte slows as it moves to the zero-velocity point (Fig. 14) [155].

EFGF on planar microchips was first reported by Humble *et al.* [104]. This method used a region of changing cross-sectional area outside a fixed-width focusing channel to produce the required EFG. A shaped ion-conducting acrylic polymer was used that allowed the transport of small buffer ions while retaining proteins and other large analytes.

A four-protein mixture was analyzed and six peaks were observed, but the resolution was lower than predicted by theory. Indeed, this device has several limitations, including a low peak capacity and low resolution, mostly due to flow dispersion in the open channel as a result of the parabolic laminar counterflow profile. These authors [160] subsequently developed a mathematical model and showed that the poor performance of the device was due to the formation of concentration gradients in the EFGF channel. This phenomenon results from an imbalance in cation transport between the open separation channel and the hydrogel. The removal of acidic impurities from the monomers forming the hydrogel improved focusing stability, repeatability and resolution.

Lin *et al.* [161] compared theoretical and experimental studies, with the aim of optimizing the voltage program to “tease apart” proteins with similar electrophoretic mobilities. They demonstrated an improvement in resolution due

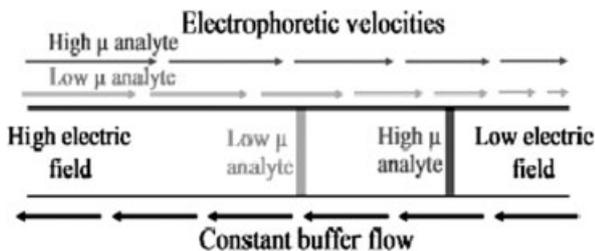


Figure 14. Schema of an EFGF separation of two components. Arrows are vectors representing the linear velocity of the constant buffer flow (black) and the electrophoretic velocities of analytes with high (dark gray) and low (light gray) electrophoretic mobilities. Reprinted with permission from [155].

to a stepwise decrease in the voltage applied to the EFGF device. They also demonstrated that dispersion increased with high bulk flow velocities or the use of a broader separation channel.

Other authors from Lee’s group improved the device previously developed by this group, with the fabrication of a device from PEG-functionalized acrylic plastic [64]. The incorporation of monoliths into the EFGF channel decreased the analyte band dispersion induced by laminar flow and narrowed the focused bands by a factor of three to six, depending on the voltage or counterflow rate applied. Figure 15 [64] compares the focusing and the separation of mixtures of proteins in an open EFGF channel and a monolith-filled EFGF channel. This EFGF device outperformed that described by Humble *et al.* [104, 160] in several ways: the focused bands were more symmetric, due to lower levels of protein adsorption, and focusing was easier to control because disturbances due to EOF were eliminated.

The performance of this device was further improved by changing the composition of the hydrogel to ensure that the

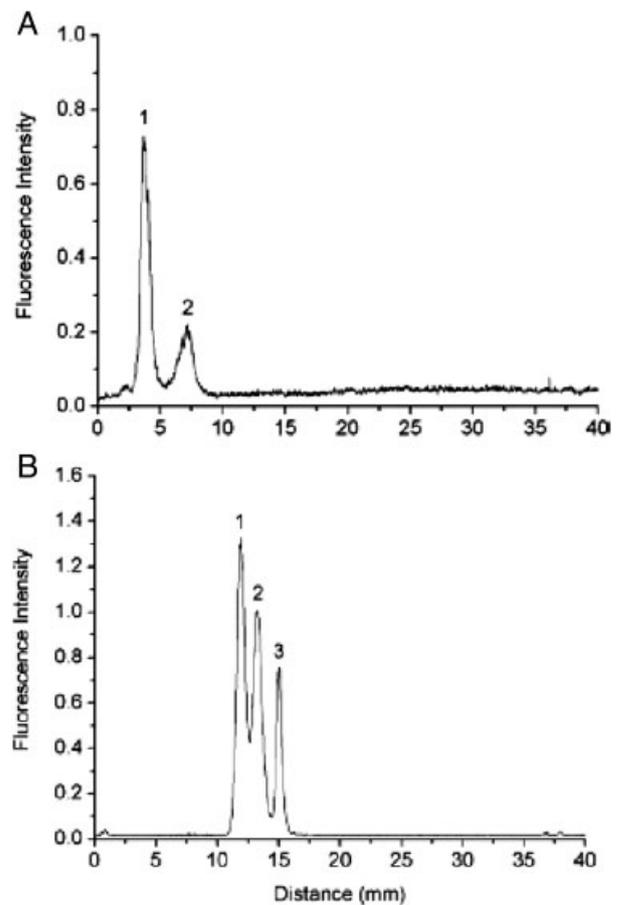


Figure 15. Comparison of focusing and separation of (A) R-phycocerythrin and green fluorescent protein (GFP) in an open EFGF channel and (B) FITC- β -globulin A, FITC-myoglobin and GFP in a monolith-filled EFGF channel. Adapted and reprinted with permission from [64].

current remained stable over time, giving a linear electric field distribution [108]. The authors also showed that narrower bands were obtained in channels with a smaller diameter due to the decrease in Taylor dispersion.

Liu *et al.* [105] developed another *in situ* fabrication method for integrating a PEG-functionalized acrylate/methacrylate or acrylamide semi-permeable membrane into μ EFGF devices based on a surface-reactive acrylic copolymer, polyglycidyl methacrylate-co-methyl methacrylate. The separation of GFP from R-PE, and the selective elution of GFP from a protein mixture containing GFP, FITC-labeled casein and FITC-labeled hemoglobin were demonstrated with this device. Unfortunately, the properties of the membrane, including its conductivity and the presence of carboxylic acid impurities, affect the EFG in the separation channel, impairing the performance of the μ EFGF device.

4.4.2 DFGF

This method, similar to EFGF and also applicable to protein separation, makes use of a computer-controlled array of individually addressable electrodes.

Myers and Bartle developed a DFGF system for PMMA devices. It consisted of a thick porous glass membrane separating the electrodes from the analytes and a separation channel packed with a PolyHIPE monolith to reduce dispersion. The EFG was established using a computer-controlled array of five electrodes, making it possible to separate six proteins in 15 min [162]. The effects of voltage degradation and electric field distortions on the performance of DFGF were recently investigated by Burke and Ivory, using a 2-D non-linear numerical simulation [163].

Voltage degradation refers to the difference between the voltage applied at the electrodes and the actual voltage measured within the separation channel, electrode placement being a critical parameter in DFGF. Burke and Ivory also used the model to examine protein elution and showed that elution under a constant EFG is more efficient than elution by shallowing the electric field. Tunon *et al.* compared EFGF and DFGF for separating the two oxidation states of myoglobin [164].

Three electrode configurations were used: a fixed 21-electrode set-up (EFGF) and dynamic three- and six-electrode set-ups (DFGF). The dynamic three-electrode system could focus analytes separately but not simultaneously, whereas the other two set-ups were able to carry out concurrent separations. A DFGF device based on a system similar to that used by Tunon *et al.* [164] and allowing the on-column detection of native and unlabeled proteins, has recently been described [165]. This visualization technique used, based on quenching of the fluorescence of manganese-activated zinc silicate, can be applied to all proteins, as all proteins display absorbance at 254 nm. This DFGF system was capable of resolving the two oxidation states of myoglobin, which had very similar mobilities under the experimental conditions used.

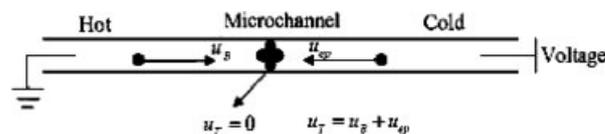


Figure 16. Schema of TGF in a microchannel. The microchannel is heated at one end and cooled at the other, resulting in a temperature gradient in the middle. Adapted and reprinted with permission from [167].

4.4.3 TGF

As an alternative to pH or EFGs, a temperature gradient (induced either by an externally imposed temperature field [109] or by Joule heating [166]) can be used to generate a gradient for focusing. This method is called TGF. A controlled flow of buffer (with a temperature-dependent ionic strength) is applied to counterbalance the electrophoretic mobilities of the analytes (Fig. 16) [167]. The sample solute velocity u_T is the sum of two opposite velocities: the electrophoretic velocity, u_{ep} and the bulk liquid velocity, u_B . As both u_{ep} and u_B are temperature-dependent, there is a single point along the channel at which u_T is equal to zero. The sample solutes move from both directions toward the zero-velocity point, where they are focused or concentrated.

Ross and coworkers carried out the pioneering work on TGF. A more complete description of appropriate buffers for TGF was presented by Shackman *et al.* [168], as a wide variety of buffer systems, ranging from pH 3 to 10.5, has been proposed. Works combining theoretical and experimental studies on band broadening caused by Taylor dispersion in TGF have also been published [169–170]. TGF is highly suitable for the development of integrated microfluidic system and has been shown to be suitable for the simultaneous concentration and separation of various samples, but there have been only a few reports describing the separation of proteins on a microfluidic TGF device [109–110].

Kim *et al.* [110] published a study of TGF based on inherent Joule heating in a variable-width PDMS device. They demonstrated the simultaneous separation and concentration of mixtures of fluorescein and FITC-BSA in less than 10 min. This work, in which sodium phosphate was used as the BGE, expanded the range of usable buffers. Studies combining Joule heating with external heating/cooling have provided further support for the hypothesis that temperature is the dominant factor governing focusing with this technique.

4.5 Multidimensional electrophoresis on chips

Multidimensional systems combine orthogonal separation methods, leading, in principle, to greater resolving power equal to the product of the resolving powers of individual dimensions. Many efforts have been made to implement

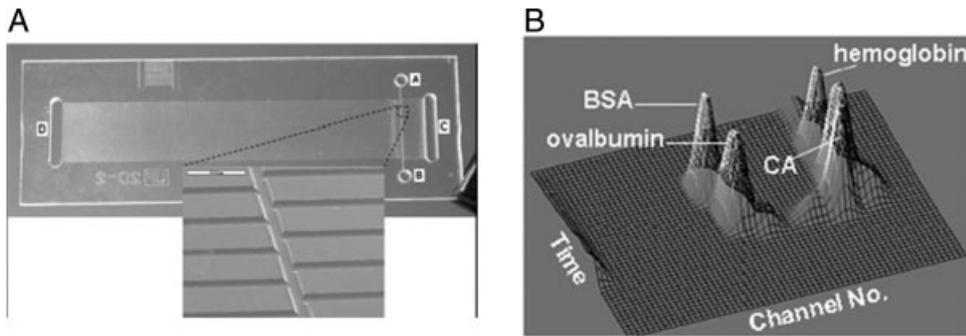


Figure 17. 2-DE of proteins on a COC microchip. (A) Picture of a plastic device for 2-D protein separation. Channel AB is for IEF and channels CD for GE. (Inset) Scanning electron micrograph (SEM) of channel intersections. (B) The three-dimensional plot corresponding to a 2-D map of BSA, ovalbumin, hemoglobin and carbonic anhydrase (CA) obtained in the 2-DE device. Reprinted from [172] with permission.

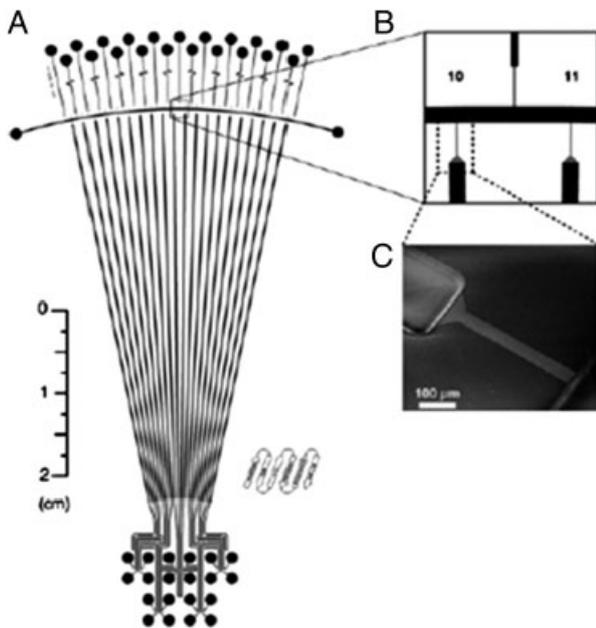


Figure 18. Design of one configuration for performing 2-DE protein separation in a microdevice. (A) The overall design includes an arc-shaped, horizontal channel for μ IEF in the first dimension, crossed by 20 vertical channels through which focused proteins are separated in the second dimension by native gel electrophoresis. (B) The separation channels of the two dimensions are joined by much smaller channels forming an MFI. (C) Electron micrographs of one connection channel. The MFI channels are 25 μ m wide, 400 μ m long, and are etched 4 μ m deep. Adapted from [173] with permission.

multidimensional electrophoresis and to demonstrate its reliability for proteomics applications. Thus, in attempts to mimic 2-D gels, chip 2-D often involves focusing samples in one channel and sizing IEF sections in cross-channels of various numbers and dimensions. Some successful 2-D separations of proteins on microchips have been reported, but multidimensional analyses remain subject to several key limitations (as pointed out in our previous review). Several approaches to overcoming these problems have been

described. Readers may refer to reviews devoted to recent advances in IEF in microfluidic devices containing a discussion of multidimensional separations [32, 33]. One very recent review summarized progress in 2-DE on microfluidic devices based on the use of two dimensions in two intersecting channels and the use of a large number of channels [171].

One particular challenge in the construction of 2-D devices concerns the development of the interface between the first and second dimensions: it must allow the quantitative and efficient transfer of focused bands from the IEF step to size-based separation, with no significant loss in the resolution acquired from the first dimension. Moreover, the diffusive and dispersive transport of focused bands interferes with dimensional transfer. Therefore, on-chip methods coupling IEF with CGE for the multidimensional separations of proteins and focusing specifically on the challenge of sample transfer between methods have been reported. Original designs and set-ups, including the integration of microfluidic valves into 2-DE devices, have been proposed to overcome this problem.

Fan's group developed a COC microfluidic device based on an array of pseudovalves created at the intersections of orthogonal channels by photodefinable, *in situ* gel polymerization (Fig. 17A) [172]. The valves made it possible to introduce two different types of separation medium into the channels, without cross-contamination of the two dimensions [172]. The presence of gel pseudovalves did not affect the performance of IEF or GE when investigated separately. Acrylamide was polymerized only in the GE channels, whereas CA was introduced specifically into the IEF channel. The potential of the 2-DE device was demonstrated by the separation of four fluorescently labeled proteins with either similar *pI* values or similar molecular weights. The total separation time was less than 10 min for IEF and PAGE (Fig. 17B) [172].

Another approach, in which the first- and second-dimension channels are connected by passive valve structures consisting of much shallower, narrower channels forming a microfluidic interface (MFI), has been presented

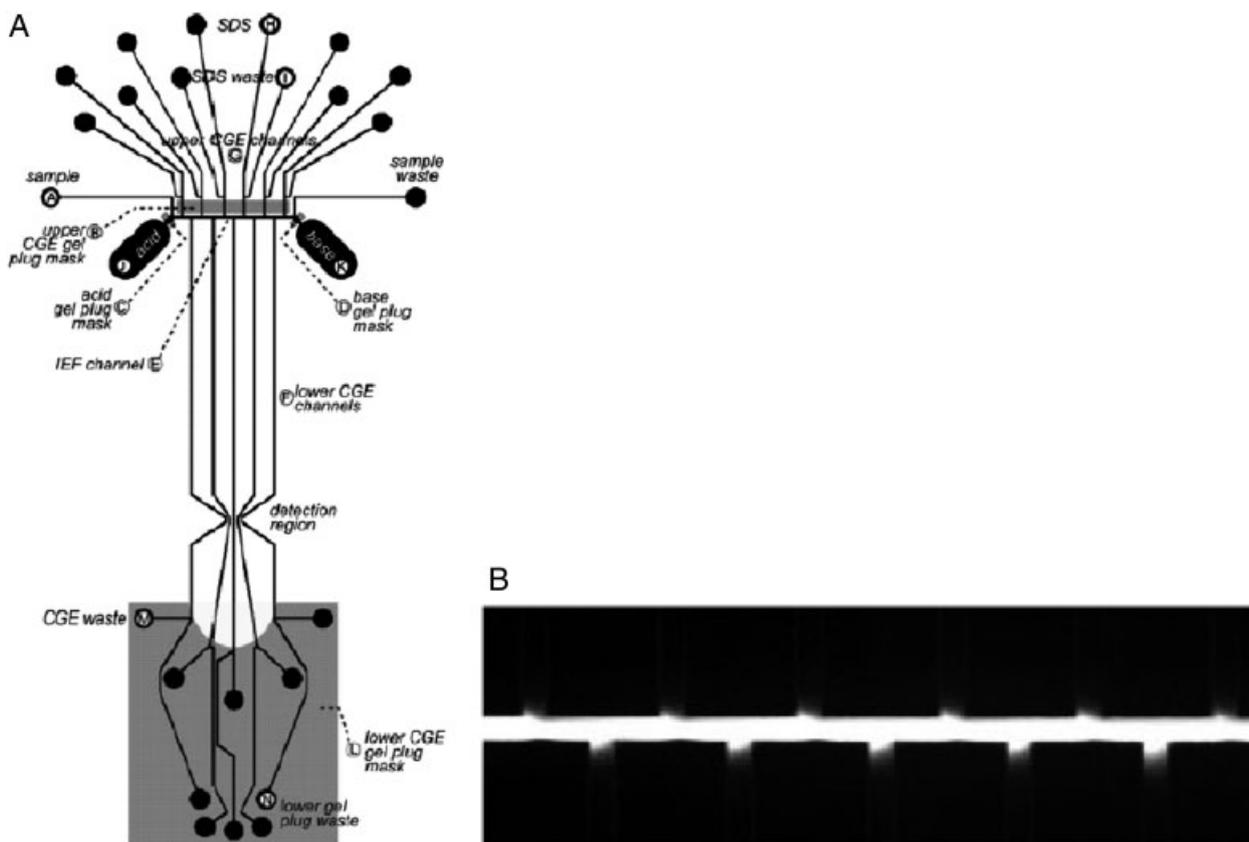


Figure 19. Online IEF-GE microfluidic 2-D device for the separation of proteins on a PMMA microchip. (a) Schematic diagram of the chip. Regions exposed to UV light during PAAm photopolymerization (B, C, D, and L) are shown in gray. (b) Sample injection into the IEF channel. Adapted from [174] with permission.

by Emrich *et al.* [173]. These authors developed a glass 2-DE device consisting of a single, arc-shaped 3.75-cm-long μ IEF channel and 20 orthogonal 6.9-cm-long channels for the second dimension (Fig. 18) [173]. The orthogonal separation systems were connected by smaller channels comprising a MFI preventing the leakage of medium between the two dimensions and allowing the bubble-free loading of discontinuous gel systems in the two dimensions. Resolution remained limited due to the lack of SDS in the second dimension, but reproducible 2D separations of protein mixtures were obtained by including 7 M urea in the separation matrix for the second dimension. The device was used to compare the induced protein profile of *E. coli* with the protein profile of control, non-induced cells.

Liu *et al.* used *in situ* photopolymerized PAA gel plugs as hydrodynamic flow control elements in a 2-D microfluidic system combining IEF and parallel SDS-GE for protein separation [174]. The device consisted of one IEF channel and five GE channels (Fig. 19A) [174]. The PAA gel plugs, integrated into critical regions of the chip, offered a simple valve-less approach for isolating reagents in the microfluidic system, thus preventing the undesirable mixing of ionic solutions, sample and sieving gel, without hindering the mobility of electromigrating ions. This made it possible to establish a well defined and stable interface

between the sieving gel and the free-solution IEF channel (Fig. 19B) [174]. The device was used to analyze FITC-labeled *E. coli* cell lysate with an average RSD in peak elution time of only 4.1%. The separation resolution for *E. coli* cell lysate was lower than that obtained by Emrich *et al.* [173], probably partly because the distance between the separation GE channels was 1 mm in Liu's design [174] and 650 μ m Emrich's design. Thus, parallel PAGE channels should be close enough to maintain IEF resolution during the transfer of focused proteins to the second dimension.

A new PMMA chip design, using multidimensional back-biasing channels to improve the quantitative transfer of focused proteins from the first to second dimension (Fig. 20A) [175], was proposed by DeVoe's group [175]. A combination of analytical modeling, numerical simulations and experimental validation revealed that a application of an appropriate bias voltage to these two channels can completely eliminate non-uniformities during both sample transfer and second-dimension separations, and prevent leakage of residual sample from the outer regions of the first-dimension channel (Fig. 20B) [175]. The authors also showed that an angled CIEF channel design helped to minimize sample plug tailing and initial sample plug length within the second-dimension channels, thereby improving peak capacities for the overall system.

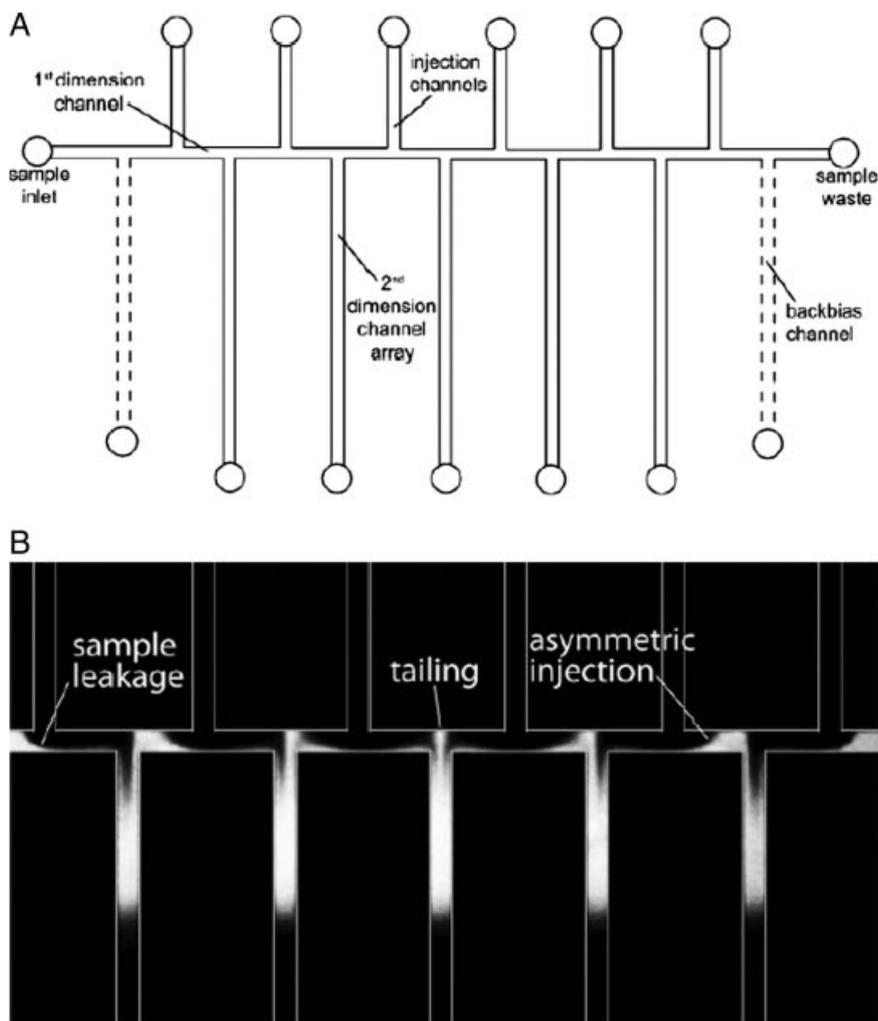


Figure 20. 2-DE device for protein separation on a PMMA microchip. (A) Simplified schema of a spatially multiplexed 2-D separation chip with five second-dimension microchannels. (B) Experimental sample transfer using a 2-D chip without back-biasing. Reprinted from [175] with permission.

These authors recently extended their work [174, 175] by developing a microfluidic IEF/SDS–GE separation system, based on design features including an angled μ IEF channel and back-biasing channels making use of a combination of multifunctional *in situ* photopolymerized PAA gels and a discontinuous SDS–GE buffer system [176]. In addition to acting as a high-resolution separation medium for GE, discrete PAA plugs integrated into specific regions of the chip facilitated the efficient isolation of various on-chip media, including anolyte, catholyte and sample/ampholyte solutions for IEF. The gel plugs also serve as reagent containers, making it possible to incorporate discrete packets of SDS and discontinuous buffers into the chip during the chip production process. This approach to on-chip reagent storage greatly reduces the complexity of the chip, by eliminating the need for separate SDS injection channels [174]. The use of a discontinuous buffer system makes it possible to sharpen sample bands during SDS–GE. The full 2-D system was validated with fluorescently labeled *E. coli* cell lysates.

Osiri *et al.* reported a high peak capacity 2-D protein separation system combining SDS–GE and MEKC using

PMMA microsystem [177]. A comprehensive 2-D map of fetal calf serum was completed 60 times faster and with a peak capacity three times higher than that obtained by conventional IEF/SDS–GE.

Various challenges must be met if microfluidics-based 2-DE is to attain the performance of conventional 2-DE. Improvements are required in IEF separation resolution, interface design and the manufacture of multiple-channel devices.

5 Concluding remarks

Microfluidic devices for protein analysis based on electrophoretic separation methods are attractive tools in the field of LOC applications. The combination of high separation performances with a relative ease of implementation and microfabrication favors the use of polymeric materials. However, we still lack important fundamental knowledge concerning the origin of surface charge and its global control.

This review describes recent efforts in microchip development that have yielded fascinating new devices for

protein separation, showing the potential of microsystems not only to replace conventional or multiplexing techniques, but also to open up new possibilities and to push back the limits of common analytical techniques for proteins.

The last few years have witnessed increasing efforts to develop detection instrumentation and online sample preconcentration techniques, which are now making it possible to detect analytes at extremely low concentrations.

Work on surface treatments has led to the emergence of novel approaches for fine-tuning EOF on polymer and hybrid chips. PEG, cellulose, acrylamide and their derivatives are often preferred for surface treatments because these molecules can efficiently limit protein adsorption. The next major challenge in this field will probably be the development of strategies for decreasing these undesirable adsorption phenomena and fine-tuning the EOF for analyses of complex mixtures, such as those found in living organisms. Various separation modes, including counterflow gradient focusing methods, have been successfully transposed to microchips. The expansion of microfluidic 2-DE separation methods, particularly those combining IEF and SDS-CGE, suggests that 2-DE devices could play an important role as an alternative to conventional IEF/PAGE in proteomics.

Thus, in the next 10 years, improvements will be required in detectability, reproducibility and ease of fabrication, together with the integration of different functional operations, to enable MCE for protein separation to provide comprehensive solutions for applications in the fields of proteomics, glycomics, biomarker detection for diagnosis and the development of new pharmaceutical drugs.

This work was supported by a European grant NeuroTAS (STREP-FP6).

The authors have declared no conflict of interest.

6 References

- [1] Manz, A., Graber, N., Widmer, H. M., *Sens. Actuators B* 1990, 1, 244–248.
- [2] Fu, L. M., Hong, T. F., Wen, C. Y., Tsai, C. H., Lin, C. H., *Electrophoresis* 2008, 29, 4871–4879.
- [3] Yeha, C. H., Huang, H. H., Changb, T. C., Linc, H. P., Lin, Y. C., *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 1661–1666.
- [4] Tay, E. T. T., Law, W. S., Li, S. F. Y., Kricka, L. J., *Methods Mol. Biol.* 2009, 509, 159–168.
- [5] Dufva, M., *Methods Mol. Biol.* 2009, 509, 135–144.
- [6] Escarpa, A., Gonzalez, M. C., Lopez Gil, M. A., Crevillén, A. G., Hervas, M., Garcia, M., *Electrophoresis* 2008, 29, 4852–4861.
- [7] Eves, D. J., Woolley, A. T., *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393, 431–435.
- [8] Dishinger, J. F., Kennedy, R. T., *Electrophoresis* 2008, 29, 3296–3305.
- [9] Pumera, M., *Talanta* 2007, 74, 358–364.
- [10] Muck, A., Svatoš, A., *Talanta* 2007, 74, 333–341.
- [11] Kitagawa, F., Otsuka, K., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 794–802.
- [12] García-Cañas, V., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2008, 29, 294–309.
- [13] Spisak, S., Tulassay, Z., Molnar, B., Guttman, A., *Electrophoresis* 2007, 28, 4261–4273.
- [14] Tanakaa, Y., Satoc, K., Shimizub, T., Yamatob, M., Okanob, T., Kitamoria, T., *Biosens. Bioelectron.* 2007, 23, 449–458.
- [15] Sinville, R., Soper, S. A., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1714–1728.
- [16] Escarpa, A., González, M. C., Crevillén, A. G., Blasco, A. J., *Electrophoresis* 2007, 28, 1002–1011.
- [17] Wirth, M. J., *Anal. Chem.* 2007, 79, 800–808.
- [18] Breadmore, M. C., *Electrophoresis* 2007, 28, 254–281.
- [19] Breadmore, M. C., Thabano, J. R. E., Dawod, M., Kazarian, A. A., Quirino, J. P., Guij, R. M. T., *Electrophoresis* 2009, 30, 230–248.
- [20] Peng, Y. Y., Pallandre, A., Tran, N. T., Taverna, M., *Electrophoresis* 2008, 29, 157–178.
- [21] Belder, D., Ludwig, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 3595–3606.
- [22] Makamba, H., Kim, J. H., Lim, K., Park, N., Hahn, J. H., *Electrophoresis* 2003, 24, 3607–3619.
- [23] Pallandre, A., de Lambert, B., Attia, R., Jonas, A. M., Viovy, J. L., *Electrophoresis* 2006, 27, 584–610.
- [24] Bilitewski, U., Genrich, M., Kadow, S., Mersal, G., *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, 556–569.
- [25] Chen, Y., Zhang, L., Chen, G., *Electrophoresis* 2008, 29, 1801–1814.
- [26] Sueyoshi, K., Kitagawa, F., Otsuka, K., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 2650–2666.
- [27] Kuramitz, H., *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 394, 61–69.
- [28] Xu, Z., Timerbaev, A. R., Hirokawa, T., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 660–670.
- [29] Korna, M. G. A., de Andradea, J. B., de Jesusa, D. S., Lemosc, V. A., Bandeiraa, M. L. S. F., dos Santosa, W. N. L., Bezerra, M. A. *et al.*, *Talanta* 2006, 69, 16–24.
- [30] Potter, O. G., Hilder, E. F., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1881–1906.
- [31] Lazar, L. M., *Electrophoresis* 2009, 30, 262–275.
- [32] Sommer, G. J., Hatch, A. V., *Electrophoresis* 2009, 30, 742–757.
- [33] Shimura, K., *Electrophoresis* 2009, 30, 11–28.
- [34] Wu, D., Qin, J., Lin, B., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 542–559.
- [35] Silvertand, L. H. H., Sastre Torano, J., van Bennekom, W. P., de Jong, G. J., *J. Chromatogr. A* 2008, 1204, 157–170.
- [36] Wang, W., Zhou, F., Zhao, L., Zhang, J.-R., Zhu, J. -J., *J. Chromatogr. A* 2007, 1170, 1–8.
- [37] Beattie, J. K., *Lab Chip* 2006, 6, 1409–1411.
- [38] Murray, R. W., *Anal. Chem.* 2003, 1, 5.
- [39] Tandon, V., Bhagavatula, S. K., Nelson, W. C., Kirby, B. J., *Electrophoresis* 2008, 29, 1092–1101.
- [40] Tandon, V., Kirby, B. J., *Electrophoresis* 2008, 29, 1102–1114.

- [41] Breuer, K. S. E., *Verlag 260 Microscale Diagnostic Techniques*, Springer, New York 2005.
- [42] Fu, C. G., Wang, A. B., Ye, J. N., Fang, Y. Z., *Chem. J. Chin. Univ. Chin.* 1998, 19, 53.
- [43] Vcelakova, K., Zuskova, I., Kenndler, E., Gas, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 309.
- [44] Wang, W., Zhao, L., Jiang, L. P., Zhang, J. R., Zhu, J. J., Chen, H. Y., *Electrophoresis* 2006, 27, 5132–5137.
- [45] Beckers, J. L., Everaerts, F. M., *J. Chromatogr. A* 1997, 787, 235.
- [46] Gas, B., Hruska, V., Dittmann, M., Bek, F., Witt, K., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1435–1445.
- [47] Huang, X. H., Gordon, M. J., Zare, R. N., *Anal. Chem.* 1988, 60, 1837–1838.
- [48] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Anal. Chem.* 1981, 53, 1298.
- [49] Lukacs, K. D., Jorgenson, J. W., *J. High Resolut. Chromatogr.* 1985, 8, 407.
- [50] Stevens, T. S., Cortes, H. J. *Anal. Chem.* 1983, 55, 1365.
- [51] Lauer, H. H., McManigill, D., *Anal. Chem.* 1986, 58, 166.
- [52] Schuetzner, W., Kenndler, E., *Anal. Chem.* 1992, 64, 1991.
- [53] Dearie, H. S., Spikmans, V., Smith, N. W., Moffatt, F., Wren, S. A. C., Evans, K. P., *J. Chromatogr. A* 2001, 929, 123.
- [54] Williams, B. A., Vigh, G., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1174.
- [55] Williams, B. A., Vigh, G., *Anal. Chem.* 1997, 69, 4445.
- [56] Wang, W., Zhao, L., Zhou, F., Zhang, J. R., Zhu, J. J., Chen, H. Y., *Electrophoresis* 2007, 28, 2893.
- [57] Shakalisava, Y., Poitevin, M., Viovy, J. L., Descroix, S., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 1030–1033.
- [58] Raffel, M., Willert, C., Wereley, S., Kompenhans, J., *Particle Image Velocimetry: A Practical Guide*, Springer-Verlag, Berlin. 2007.
- [59] Mehta, G., Lee, J., Cha, W., Tung, Y. -C., Linderman, J. J., Takayama, S., *Anal. Chem.* 2009, 81, 3714–3722.
- [60] Phillips, K. S., Kottegoda, S., Kang, K. M., Sims, C. E., Allbritton, N. L., *Anal. Chem.* 2008, 80, 9756–9762.
- [61] Vieillard, J., Mazurczyk, R., Morin, C., Hannes, B., Chevolut, Y., Desbène, P. -L., Krawczyk, S., *J. Chromatogr. B* 2007, 845, 218–225.
- [62] Wang, A. J., Xu, J. J., Chen, H. Y., *J. Chromatogr. A* 2007, 1147, 120–126.
- [63] Razunguzwa, T. T., Warriar, M., Timperman, A. T., *Anal. Chem.* 2006, 78, 4326–4333.
- [64] Sun, X., Farnsworth, P. B., Woolley, A. T., Tolley, H. D., Warnick, K. F., Lee, M. L., *Anal. Chem.* 2008, 80, 451–460.
- [65] Okoda, H., Kaji, N., Tokeshi, M., Baba, Y., *Electrophoresis* 2007, 28, 4582–4589.
- [66] Mohamadi, M. R., Mahmoudian, L., Kadji, N., Tokeshi, M., Baba, Y., *Electrophoresis* 2007, 28, 830–836.
- [67] Okoda, H., Kaji, N., Tokeshi, M., Baba, Y., *J. Chromatogr. A* 2008, 1192, 289–293.
- [68] Soper, S., Shapdour, H., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3519–3527.
- [69] Zhang, J., Das, C., Fan, Z. H., *Microfluid. Nanofluid.* 2008, 5, 327–335.
- [70] Liu, J. K., Sun, X. F., Lee, M. L., *Anal. Chem.* 2007, 79, 1926–1931.
- [71] Bi, H. Y., Meng, S., Li, Y., Guo, K., Chen, Y. P., Kong, J. L., Yang, P. Y. *et al.*, *Lab Chip* 2006, 6, 769–775.
- [72] Kitagawa, F., Kubota, K., Sueyoshi, K., Otsuka, K., *Adv. Mater.* 2006, 7, 558–565.
- [73] Long, T. M., Prakash, S., Shannon, M. A., Moore, J. S., *Langmuir* 2006, 22, 4104–4109.
- [74] Bi, H., Zhong, W., Meng, S., Kong, J., Yang, P., Liu, B., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3399–3405.
- [75] Root, B. E., Zhang, B., Barron, A. E., *Electrophoresis* 2009, 30, 2117–2122.
- [76] Huang, B., Kim, S., Wu, H., Zare, R. N., *Anal. Chem.* 2007, 79, 9145–9149.
- [77] Wang, H., Wang, D., Wang, J., Wang, H., Gu, J., Han, C., Jin, Q. *et al.*, *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 6343–6347.
- [78] Sikanen, T., Heikkilä, L., Tuomikoski, S., Ketola, R. A., Kostiaainen, R., Franssila, S., Kotiaho, T., *Anal. Chem.* 2007, 79, 6255–6263.
- [79] Sikanen, T., Tuomikoski, S., Ketola, R. A., Kostiaainen, R., Franssila, S., Kotiaho, T., *Anal. Chem.* 2007, 79, 9135–9144.
- [80] Zhou, J., Yan, H., ren, K., Dai, Wu, H., *Anal. Chem.* 2009, 81, 6627–6632.
- [81] Phillips, K. S., Kottegoda, S., Kang, K. M., Sims, C. E., Allbritton, N. L., *Anal. Chem.* 2008, 80, 9756–9762.
- [82] Sugiura, S., Imano, W., Takagi, T., Sakai, K., Kanamori, T., *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 1135–1140.
- [83] Xu, Y., Li, J., Wang, E., *Electrophoresis* 2007, 28, 4597–4605.
- [84] Xu, Y., Li, J., Wang, E., *Electrophoresis* 2008, 29, 1852–1858.
- [85] Xu, Y., Li, J., Wang, E., *J. Chromatogr. A* 2008, 1207, 175–180.
- [86] Sun, S., Liu, J., Lee, M. L., *Anal. Chem.* 2008, 80, 856–863.
- [87] Pan, T., Fiorini, G. S., Chiu, D. T., Woolley, A. T., *Electrophoresis* 2007, 28, 2904–2911.
- [88] Boonsong, K., Caulum, M. M., Dressen, B. M., Chailapaku, O., Crokek, D. M., Henry, C. S., *Electrophoresis* 2008, 29, 3128–3134.
- [89] Mruetusatorn, P., Mahfouz, M. R., Wu, J., *Sens. Actuator* 2009, A153, 237–243.
- [90] Cui, H., Dutta, P., F. Ivory, C., *Electrophoresis* 2007, 28, 1138–1145.
- [91] Mohamadi, M. R., Kaji, N., Tokeshi, M., Baba, Y., *Anal. Chem.* 2007, 79, 3667–3672.
- [92] Lin, C. C., Hsu, B. K., Chen, S. H., *Electrophoresis* 2008, 29, 1228–1236.
- [93] An, Y., Cooper, J. W., Balgley, B. M., Lee, C. S., *Electrophoresis* 2006, 27, 3599–3608.
- [94] Park, C. C., Kazakova, I., Kawabata, T., Spaid, M., Chien, R. L., Wada, H. G., Satomura, S., *Anal. Chem.* 2008, 80, 808–814.
- [95] Kawabata, T., Wada, H. G., Watanabe, M., Satomura, S., *Electrophoresis* 2008, 29, 1399–1406.

- [96] Breadmore, M. C., Thabano, J. R. E., Dawod, M., Kazarian, A. A., Quirino, J. P., Guijt, R. M., *Electrophoresis* 2009, 30, 230–248.
- [97] Lee, K. S., Park, S. H., Won, S. Y., Shim, Y. B., *Electrophoresis* 2009, 30, 3219–3227.
- [98] Shiddiky, M. J., Park, H., Shim, Y. B., *Anal. Chem.* 2006, 78, 6809–6817.
- [99] Gong, M., Wehmeyer, K. R., Limbach, P. A., Arias, F., Heineman, W. R., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3730–3737.
- [100] Pan, Q., Zhao, M., *Anal. Chem.* 2009, 81, 5333–5341.
- [101] Shackman, J. G., Ross, D., *Electrophoresis* 2007, 28, 556–571.
- [102] Tolley, H. D., Wang, Q. G., Lefebvre, D. A., Lee, M. L., *Anal. Chem.* 2002, 74, 4456–4463.
- [103] Warnick, K. F., Francom, S. J., Humble, P. H., Kelly, R. T., Woolley, A. T., Lee, M. L., Tolley, H. D., *Electrophoresis* 2005, 26, 405–414.
- [104] Humble, P. H., Kelly, R. T., Woolley, A. T., Tolley, H. D., Lee, M. L. *Anal. Chem.* 2004, 76, 5641–5648.
- [105] Liu, J. K., Sun, X. F., Farnsworth, P. B., Lee, M. L., *Anal. Chem.* 2006, 78, 4654–4662.
- [106] Lin, S. L., Li, Y. Y., Tolley, H. D., Humble, P. H., Lee, M. L., *J. Chromatogr. A* 2006, 1125, 254–262.
- [107] Kelly, R. T., Li, Y., Woolley, A. T., *Anal. Chem.* 2006, 78, 2565–2570.
- [108] Sun, X., Farnsworth, P. B., Tolley, H. D., Warnick, K. F., Woolley, A. T., Lee, M. L., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 159–164.
- [109] Ross, D., Locascio, L. E., *Anal. Chem.* 2002, 74, 2556–2564.
- [110] Kim, S. M., Sommer, G. J., Burns, M. A., Hasselbrink, E. F., *Anal. Chem.* 2006, 78, 8028–8035.
- [111] Herr, A. E., Hatch, A. V., Throckmorton, D. J., Tran, H. M., Brennan, J. S., Giannobile, W. V., Singh, A. K., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007, 104, 5268–5273.
- [112] Svec, F., *J. Chromatogr. B* 2006, 841, 52–64.
- [113] Liu, J., Chen, C. F., Tsao, C. W., Chang, C. C., Chu, C. C., DeVoe, D. L., *Anal. Chem.* 2009, 81, 2545–2554.
- [114] García-Campaña, A. M., Taverna, M., Fabre, H., *Electrophoresis* 2007, 28, 208–232.
- [115] Schulze, P., Belder, D., *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393, 515–525.
- [116] Jameson, D. M., Weber, G., *J. Phys. Chem.* 1981, 85, 953–958.
- [117] Schulze, P., Ludwig, M., Belder, D., *Electrophoresis* 2008, 29, 4894–4899.
- [118] Schulze, P., Schüttpeitz, M., Sauer, M., Belder, D., *Lab Chip* 2007, 7, 1841–1844.
- [119] Kuswandi, B., Nuriman, J., Huskens, J., Verboom, W., *Anal. Chim. Acta* 2007, 601, 141–155.
- [120] Koster, S., Verpoorte, E., *Lab Chip* 2007, 7, 1394–1412.
- [121] Lee, J., Soper, S. A., Murraya, K. K., *J. Mass Spectrom.* 2009, 44, 579–593.
- [122] Mellors, J. S., Gorbounov, V., Ramsey, R. S., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 2008, 80, 6881–6887.
- [123] Li, F. A., Huang, J. L., Her, G. R., *Electrophoresis* 2008, 29, 4938–4943.
- [124] Xu, X., Li, L., Weber, S. G., *Trends Analyt. Chem.* 2007, 26, 68–79.
- [125] Shadpour, H., Hupert, M. L., Patterson, D., Liu, C., Galloway, M., Stryjewski, W., Goettert, J., Soper, S. A., *Anal. Chem.* 2007, 79, 870–878.
- [126] Wang, H., Wang, H. M., Jin, Q. H., Cong, H., Zhuang, G. S., Zhao, J. L., Sun, C. L. et al., *Electrophoresis* 2008, 29, 1932–1941.
- [127] Sun, X., Liu, J., Lee, M. L., *Electrophoresis* 2008, 29, 2760–2767.
- [128] Sun, X., Li, D., Lee, M. L., *Anal. Chem.* 2009, 81, 6278–6284.
- [129] Grunert, T., Marchetti-Deschmann, M., Müller, I., Müller, M., Allmaier, G., *Electrophoresis* 2008, 29, 4332–4340.
- [130] Chen, X., Tang, K., Lee, M., Flynn, G. C., *Electrophoresis* 2008, 29, 4993–5002.
- [131] Werling, J., Kocsis, B., Dean, D., Kustos, I., *J. Chromatogr. B* 2008, 869, 54–58.
- [132] Pandey, S., Lu, C. M., Herold, D. A., *Am. J. Clin. Pathol.* 2008, 129, 432–438.
- [133] Pizarro, S. A., Lane, P., Lane, T. W., Cruz, E., Haroldsen, B., VanderNoot, V. A., *Electrophoresis* 2007, 28, 4697–4704.
- [134] Fruetel, J. A., West, J. A. A., Debusschere, B. J., Hukari, K., Lane, T. W., Najm, H. N., Ortega, J., *Anal. Chem.* 2008, 80, 9005–9012.
- [135] Okoda, H., Kaji, N., Tokeshi, M., Baba, Y., *Anal. Sci.* 2008, 24, 321–325.
- [136] Mohamadi, M. R., Kaji, N., Tokeshi, M., Baba, Y., *Anal. Chem.* 2008, 80, 312–316.
- [137] Obubuafo, A., Balamurugan, S., Shadpour, H., Spivak, D., McCarley, R. L., Soper, S. A., *Electrophoresis* 2008, 29, 3436–3445.
- [138] Park, C. C., Kazakova, I., Kawabata, T., Spaid, M., Chien, R. L., Wada, H. G., Satomura, S., *Anal. Chem.* 2008, 80, 808–814.
- [139] Lin, C. C., Hsu, B. K., Chen, S. H., *Electrophoresis* 2008, 29, 1228–1236.
- [140] Makamba, H., Huang, J. W., Chen, H. H., Chen, S. H., *Electrophoresis* 2008, 29, 2458–2465.
- [141] Ren, K., Liang, Q., Yao, B., Luo, G., Wang, L., Gao, Y., Wang, Y., Qiu, Y., *Lab Chip* 2007, 7, 1574–1580.
- [142] Ou, J., Glawdel, T., Samy, R., Wang, S., Liu, Z., Ren, C. L., Pawliszyn, J., *Anal. Chem.* 2008, 80, 7401–7407.
- [143] Dauriac, V., Descroix, S., Chen, Y., Peltre, G., Sénéchal, H., *Electrophoresis* 2008, 29, 2945–2952.
- [144] Thormann, W., Caslavská, J., Mosher, R. A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1155, 154–163.
- [145] Shim, J., Dutta, P., Ivory, C. F., *Electrophoresis* 2008, 29, 1026–1035.
- [146] Shim, J., Dutta, P., Ivory, C. F., *Electrophoresis* 2009, 30, 723–731.
- [147] Shim, J., Dutta, P., Ivory, C. F., *Electrophoresis* 2007, 28, 572–586.
- [148] Sommer, G. J., Singh, A. K., Hatch, A. V., *Anal. Chem.* 2008, 80, 3327–3333.

- [149] Götz, S., Karst, U., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, **387**, 183–192.
- [150] Vlčková, M., Kalman, F., Schwarz, M. A., *J. Chromatogr. A* 2008, **1181**, 145–152.
- [151] Han, B., Wang, P., Zhu, G., Zhang, L., Qu, F., Deng, Y., Zhang, Y., *J. Sep. Sci.* 2009, **32**, 1211–1215.
- [152] Albrecht, J. W., El-Ali, J., Jensen, K. F., *Anal. Chem.* 2007, **79**, 9364–9371.
- [153] Kohlheyer, D., Eijkel, J. C. T., Schlautmann, S., Van Der Berg, A., Schasfoort, R. B. M., *Anal. Chem.* 2007, **79**, 8190–8198.
- [154] Kohlheyer, D., Eijkel, J. C. T., Van den Berg, A., Schasfoort, R. B. M., *Electrophoresis* 2008, **29**, 977–993.
- [155] Kelly, R. T., Woolley, A. T., *J. Sep. Sci.* 2005, **28**, 1985–1993.
- [156] Shackman, J. G., Ross, D., *Electrophoresis* 2007, **28**, 556–571.
- [157] Ivory, C. F., *Electrophoresis* 2007, **28**, 15–25.
- [158] Meighan, M. M., Staton, S. J. R., Hayes, M. A., *Electrophoresis* 2009, **30**, 852–865.
- [159] Shackman, J. G., Munson, M. S., Ross, D., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, **387**, 155–158.
- [160] Humble, P. H., Harb, J. N., Tolley, H. D., Woolley, A. T., Farnsworth, P. B., Lee, M. L., *J. Chromatogr. A* 2007, **1160**, 311–319.
- [161] Lin, S. L., Li, Y., Woolley, A. T., Lee, M. L., Tolley, H. D., Warnick, K. F., *Electrophoresis* 2008, **29**, 1058–1066.
- [162] Myers, P., Bartle, K. D., *J. Chromatogr. A* 2004, **1044**, 253–258.
- [163] Burke, J. M., Ivory, C. F., *Electrophoresis* 2008, **29**, 1013–1025.
- [164] Tuñón, P. G., Wang, Y., Myers, P., Bartle, K. D., Bowhill, L., Ivory, C. F., Ansell, R. J., *Electrophoresis* 2008, **29**, 457–465.
- [165] Ansell, R. J., Tuñón, P. G., Wang, Y., Myers, P., Ivory, C. F., Keen, J. N., Findlay, J. B. C., *Analyst* 2009, **134**, 226–229.
- [166] Ross, D., Gaitan, M., Locascio, L. E., *Anal. Chem.* 2001, **73**, 4117–4123.
- [167] Tang, G., Yang, C., *Electrophoresis* 2008, **29**, 1006–1012.
- [168] Shackman, J. G., Munson, M. S., Kan, C. W., Ross, D., *Electrophoresis* 2006, **27**, 3420–3427.
- [169] Huber, D. E., Santiago, J. G., *Electrophoresis* 2007, **28**, 2333–2344.
- [170] Lin, H., Shackman, J. G., Ross, D., *Lab Chip* 2008, **8**, 969–978.
- [171] Chen, H., Fan, Z. H., *Electrophoresis* 2009, **30**, 758–765.
- [172] Das, C., Fredrickson, C. K., Xia, Z., Z. Fan, H., *Sens. Actuators A* 2007, **134**, 271–277.
- [173] Emrich, C. A., Medintz, I. L., Chu, W. K., Mathies, R. A., *Anal. Chem.* 2007, **79**, 7360–7366.
- [174] Liu, J., Yang, S., Lee, C. S., DeVoe, D. L., *Electrophoresis* 2008, **29**, 2241–2250.
- [175] Yang, S., Liu, J., DeVoe, D. L., *Lab Chip* 2008, **8**, 1145–1152.
- [176] Yang, S., Liu, J., Lee, C. S., DeVoe, D. L., *Lab Chip* 2009, **9**, 592–599.
- [177] Osiri, J. K., Shadpour, H., Park, S., Snowden, B. C., Chen, Z. Y., Soper, S. A., *Electrophoresis* 2008, **29**, 4984–4992.

2.3 Conclusion

Au travers de l'analyse de la bibliographie, on s'aperçoit que la combinaison de performances de séparation à haut débit avec la mise en œuvre relativement facile de la microfabrication plaident pour l'utilisation de matériaux polymères. Cependant, des efforts sont encore à réaliser afin de comprendre pleinement l'origine de la charge de surface en microsystème et réussir ainsi son contrôle global.

Cette revue a présenté les récents efforts dirigés vers le développement des laboratoires sur puce qui ont donné de nouveaux dispositifs fascinants pour les séparations de protéines montrant le potentiel de microsystèmes non seulement pour remplacer les techniques classiques d'analyse, mais aussi pour donner de nouvelles possibilités afin de faire évoluer les limites actuelles des techniques courantes d'analyse de protéines.

Ces dernières années ont vu s'accroître le nombre des techniques de détection utilisées avec les microsystèmes ainsi que l'instrumentation et les techniques de pré-concentration en ligne permettant la détection d'analytes à très faibles concentrations.

La modification de surface a vu de son côté l'émergence d'approches nouvelles pour régler la maîtrise du flux électroosmotique. Certaines stratégies se montrent efficaces pour limiter l'adsorption de protéines grâce notamment à des traitements de surface par du PEG, de la cellulose, de l'acrylamide et de leurs dérivés.

Même si de nombreux progrès ont été réalisés, des améliorations restent à apporter afin de permettre des analyses complètes avec un niveau d'intégration des modules plus élevé permettant d'atteindre des sensibilités de détection plus importantes et traiter efficacement des échantillons biologiques complexes. Ceci est particulièrement vrai dans le domaine de l'analyse de biomarqueurs et le développement de nouveaux outils de diagnostic afin de permettre un jour de multiplier les systèmes "Point of Care" pour diagnostiquer certaines pathologies sans recourir à des examens longs, coûteux et complexes.

Bibliographie

- [1] Detlev Belder and Martin Ludwig. Surface modification in microchip electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 24(21) :3595–3606, 2003. (Cité en page 34.)
- [2] Erin A. S. Doherty, Robert J. Meagher, Methal N. Albarghouthi, and Annelise E. Barron. Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 24(1-2) :34–54, 2003. (Cité en page 34.)
- [3] Sun Min Kim, Mark A. Burns, and Ernest F. Hasselbrink. Electrokinetic protein preconcentration using a simple Glass/Poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip. *Analytical Chemistry*, 78(14) :4779–4785, 2006. PMID : 16841895. (Cité en page 34.)
- [4] Jeong Hoon Lee, Seok Chung, Sung Jae Kim, and Jongyoon Han. Poly(dimethylsiloxane)-Based protein preconcentration using a nanogap generated by junction gap breakdown. *Analytical Chemistry*, 79(17) :6868–6873, 2007. (Cité en page 34.)
- [5] Jikun Liu and Milton L. Lee. Permanent surface modification of polymeric capillary electrophoresis microchips for protein and peptide analysis. *ELECTROPHORESIS*, 27(18) :3533–3546, 2006. (Cité en page 34.)
- [6] Zhicheng Long, Zheng Shen, Dapeng Wu, Jianhua Qin, and Bingcheng Lin. Integrated multilayer microfluidic device with a nanoporous membrane interconnect for online coupling of solid-phase extraction to microchip electrophoresis. *Lab Chip*, 7(12) :1819–1824, 2007. (Cité en page 34.)
- [7] Antoine Pallandre, Bertrand de Lambert, Rafaële Attia, Alain M. Jonas, and Jean-Louis Viovy. Surface treatment and characterization : Perspectives to electrophoresis and lab-on-chips. *ELECTROPHORESIS*, 27(3) :584–610, 2006. (Cité en page 34.)
- [8] Youyuan Peng, Antoine Pallandre, N Thuy Tran, and Myriam Taverna. Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods. *Electrophoresis*, 29(1) :157–178, January 2008. PMID : 18058769. (Cité en page 34.)
- [9] Gregory T Roman and Robert T Kennedy. Fully integrated microfluidic separations systems for biochemical analysis. *Journal of Chromatography. A*, 1168(1-2) :170–188 ; discussion 169, October 2007. PMID : 17659293. (Cité en page 33.)
- [10] Mercedes Vazquez and Brett Paull. Review on recent and advanced applications of monoliths and related porous polymer gels in micro-fluidic devices. *Analytica Chimica Acta*, 668(2) :100–113, June 2010. (Cité en page 34.)
- [11] Ying-Chih Wang, Anna L. Stevens, and Jongyoon Han. Million-fold preconcentration of proteins and peptides by nanofluidic filter. *Analytical Chemistry*, 77(14) :4293–4299, 2005. (Cité en page 34.)

- [12] Dapeng Wu, Jianhua Qin, and Bingcheng Lin. Electrophoretic separations on microfluidic chips. *Journal of Chromatography A*, 1184(1-2) :542 – 559, 2008. (Cité en page 34.)

Préconcentration de protéines et peptides sur support solide en microsystemes

3.1 Introduction

De nos jours, un des enjeux importants est d'économiser l'énergie, les réactifs, le coût et le temps. Les analystes ont de leur côté réalisé des efforts considérables pour réduire la durée des analyses, la consommation des réactifs tout en améliorant les performances analytiques. L'électrophorèse capillaire (EC), par exemple, a été développée pour miniaturiser les séparations et est devenue une technique de séparation essentielle en raison de sa haute résolution, de la rapidité des analyses ainsi que sa faible consommation de réactifs.

En 1990, un nouveau concept a été proposé par Manz et ses collaborateurs[8] ; il s'agit des "microsystemes d'analyse totale (micro-TAS)". Ce type de dispositif permet l'intégration des opérations chimiques sur une seule puce aussi bien qu'une réduction remarquable des temps d'analyse et de la consommation des réactifs. Il assure également une dissipation thermique efficace en raison de l'augmentation du rapport surface/volume. L'EC a été elle aussi appliquée à des dispositifs microfluidiques, et est alors appelée électrophorèse sur puce (MCE). En MCE, les analytes peuvent être séparés rapidement. De plus, toutes sortes de substances peuvent être analysées en raison des divers modes de séparation qu'offre l'EC et qui peuvent également être utilisés en MCE. Cependant, les faibles sensibilités observées en MCE sont souvent problématiques en raison de la courte longueur du chemin optique et de la faible quantité d'échantillons injectée. Les systemes de détection hautement sensibles, tels que la fluorescence (LIF), la SM, l'ampérométrie ou le microscope à lentille thermique, ont été cependant développés pour la MCE. Toutefois, les limites de détection restent insuffisantes, ce qui freine souvent la commercialisation d'appareils de MCE en dépit des hautes performances analytiques.

Afin d'augmenter la sensibilité de détection en MCE, plusieurs approches ont été proposées ; l'une de ces approches consiste à augmenter le chemin optique, l'autre est basée sur l'utilisation de techniques de préconcentration d'échantillons. L'amélioration de la longueur du trajet a été réalisée en EC mais demeure difficilement applicable en MCE, car il est difficile de modifier la profondeur du microcanal au point de la détection sans altérer les performances analytiques ou complexifier les étapes de microfabrication. Ainsi, ce sont les techniques de préconcentration d'échantillons

qui ont été principalement sollicitées et étudiées pour la MCE. La préconcentration d'échantillons en EC et MCE est souvent une étape essentielle. Ces techniques d'enrichissement peuvent être couplées en ligne ou encore hors ligne à la technique séparative. Les méthodes de préconcentration peuvent être subdivisées en deux catégories :

- Les méthodes de préconcentration électrophorétiques : elles sont généralement dynamiques, liées à des phénomènes électrocinétiques et conduisent à des compressions de bandes par différents moyens.
- Les méthodes de préconcentration chromatographiques : elles sont généralement statiques et sont basées sur des phénomènes d'extraction utilisant des supports solides.

Les méthodes de préconcentration électrophorétiques sont basées sur la différence de mobilité électrophorétique des analytes dans différentes zones. Ce mode de préconcentration exige l'existence d'une composante électrophorétique et la préconcentration des analytes s'effectue sur une frontière au travers d'un changement de vitesse des composés d'intérêt. Les principaux modes de préconcentration électrophorétique sont l'isotachophorèse, l'isoélectrofocalisation, ou encore les compressions de bande basées sur l'amplification de champs électriques. Bien que ces méthodes soient performantes avec des facteurs d'enrichissement allant de 10 à 100.000 voire 1.000.000 dans certains cas [2]. Lorsque l'injection hydrodynamique est appliquée, le volume du capillaire ou du canal limite le volume d'échantillon pouvant être introduit. Cette limitation peut être partiellement surmontée par l'utilisation de l'injection électrocinétique, mais cette approche souffre généralement d'une mauvaise reproductibilité, d'une discrimination de certains ions et est sensible à la composition de la matrice de l'échantillon. Le principal inconvénient de ces techniques électrophorétiques réside lors de l'analyse de matrices complexes puisque de nombreuses substances peuvent être concentrées simultanément avec les analytes d'intérêt, ce qui conduit finalement à des séparations peu résolutive et des facteurs d'enrichissement insuffisants.

Dans les méthodes de préconcentration chromatographiques, les analytes sont piégés de manière plus au moins spécifique et concentrés dans une structure poreuse appelée support solide de préconcentration. Les échantillons préconcentrés sont par la suite envoyés vers le module de séparation. Les avantages de ces techniques sont principalement les volumes d'échantillon injectés qui peuvent être plus élevés parce que les analytes sont adsorbés sur une phase stationnaire mais aussi parce que la préconcentration peut être plus spécifique. La (micro) extraction sur phase solide (SPE et SPME) est la technique d'extraction la plus couramment utilisée [20, 2]. La SPE peut donc enrichir les analytes présents à l'état de trace et éliminer les composés potentiellement interférents. De façon évidente, en absence de pertes, plus le rapport entre le volume d'échantillon et celui de l'élution est élevé, plus le facteur de préconcentration résultant pourrait être important [15]. Les recherches dans ce domaine se sont portées principalement sur le développement de supports solides compatibles avec les dispositifs microfluidiques et qui peuvent y être facilement introduits.

Le couplage entre la SPE et les microsystèmes d'analyse peut se réaliser selon

deux modes :

- Couplage hors-ligne ; dans ce mode, il n'y a pas d'intégration et les échantillons sont transférés manuellement ou de façon automatisée du module de préconcentration à celui de la séparation.
- Couplage en-ligne ; dans ce mode, une intégration complète entre les modules de SPE et MCE est assurée. Il s'agit d'insérer le support de préconcentration dans le canal du microsysteme ou encore d'assurer le contact entre les deux modules au moyen d'une connexion physique.

Différents matériaux ont été utilisés comme phase solide pour la préconcentration par SPE. Ces derniers peuvent avoir des spécificités différentes. On peut citer à titre d'exemple, les polymères à empreintes moléculaires (MIP), les phases particulaires, les billes fonctionnalisées ou encore les monolithes organiques ou ceux à base de silice. Toutefois, lorsqu'une sélectivité élevée est nécessaire, notamment dans le cas de la préconcentration de molécules biologiques tels que les protéines et peptides, des matériaux hautement spécifiques sont alors plus appropriés tels que les matériaux d'immuno-affinité. En matière de prétraitement de l'échantillon, particulièrement dans le cas de préconcentration de protéines et peptides, ce sont principalement les monolithes organiques qui ont été proposés dans la littérature. Les monolithes à base de silice, bien qu'ayant plusieurs avantages, n'ont pas été utilisés pour l'enrichissement des protéines et peptides mais plutôt dans la préconcentration de l'ADN.

Dans ce chapitre, nous nous intéressons en première partie aux monolithes organiques utilisés généralement pour la préconcentration de protéines et peptides, puis nous détaillerons leurs applications pour l'enrichissement de ces analytes en microsystemes analytiques. En deuxième partie, nous présentons quelques exemples de préconcentration de protéines et peptides par SPE sur des phases particulaires intégrées dans des microsystemes. Enfin, nous terminons en présentant brièvement le cas particulier de la préconcentration de phosphopeptides et phosphoprotéines, sur support solide.

3.2 Phases stationnaires monolithiques

Depuis leur apparition, au début des années 90 [12, 11], les monolithes ont été largement utilisés d'abord pour la chromatographie puis l'électrochromatographie. Depuis 1998, ils constituent une approche intéressante et de plus en plus utilisée pour la SPE. Elle est fondée sur la distribution des composés entre une phase liquide (l'échantillon) et une phase solide (l'adsorbant). En première approximation, cette technique d'extraction repose sur un simple principe chromatographique où l'adsorbant joue le rôle de phase stationnaire et l'échantillon percolé constitue la phase mobile. Si les analytes d'intérêt présentent une forte affinité vis-à-vis de l'adsorbant, ils y sont retenus au cours de l'étape de percolation alors que le solvant est éliminé. Les analytes sont ensuite élués avec un faible volume de solvant éluant.

Cette approche a contribué à un avancement remarquable dans la miniaturisation

et l'automatisation pour la préparation des échantillons.

L'utilisation des monolithes que ce soit en capillaire ou sur puce, pour la SPE ou la préconcentration, a été décrite et discutée dans plusieurs revues [15, 26, 20, 2, 4, 13, 30, 17, 22, 9, 16]. Le nombre de publications sur ce sujet a énormément augmenté ces 5 dernières années.

Dans le processus d'extraction "en ligne", les monolithes sont synthétisés, in-situ dans les dispositifs. Des progrès remarquables ont été réalisés afin de former des monolithes de façon homogène et répétable au sein des canaux des dispositifs microfluidiques et leur synthèse est rendue relativement facile dans différentes dimensions.

3.2.1 Monolithes organiques : synthèse, avantages et inconvénients

Une large gamme de monomères a été utilisée pour la synthèse de monolithes polymériques et près de 30 monomères distincts ont été répertoriés dans la littérature. Cependant, la plupart de ces monolithes polymériques peuvent être regroupés en trois grandes catégories :

- les monolithes à base de polystyrène
- les monolithes à base d'acrylamide
- les monolithes à base d'acrylate et de méthacrylate

Vlakh et Tennikova [27] ont publié une excellente description des différentes méthodes de préparation de monolithes à base de méthacrylate considérés comme les plus communément utilisés. Un autre article intéressant, récemment publié par Roberts et ses collaborateurs, traite la versatilité des monolithes de polyméthacrylate pour la purification de biomolécules [18].

La synthèse des monolithes organiques nécessite une simple procédure de prétraitement des canaux suivie d'une seule étape de polymérisation donnant lieu à une structure poreuse bien ancrée à la surface et ayant les groupements fonctionnels adaptés [3]. En règle générale, le mélange de pré-polymérisation est constitué de monomères, d'agent de réticulation, de solvants porogènes et d'initiateurs, dans un rapport approprié. Le mélange est par la suite placé aux ultrasons puis purgé avec de l'azote pour chasser l'oxygène présent en solution. La solution est ensuite introduite dans le canal du dispositif microfluidique.

Selon le matériau du dispositif utilisé, un prétraitement approprié doit être réalisé. Ainsi, les puces en verre sont couramment activées par un traitement avec un agent de silanisation γ -MAPS (3-(triméthoxysilyl) propyl methacrylate) avant l'introduction du mélange de pré-polymérisation [14]. Par réaction entre les groupements méthoxy du γ -MAPS et les groupements silanol du canal en verre, les groupements éthylènes peuvent se fixer de façon covalente à la paroi des canaux, et participent ainsi à l'enchaînement de la réaction de polymérisation mais aussi à l'ancrage du monolithe sur la surface du capillaire. Cette étape est cruciale pour obtenir une structure monolithique mécaniquement stable dans le dispositif. La figure 3.1 présente un cliché de microscopie électronique à balayage (MEB) d'un monolithe Poly(BMA-co-EDMA) synthétisé au sein d'une puce en verre [31].

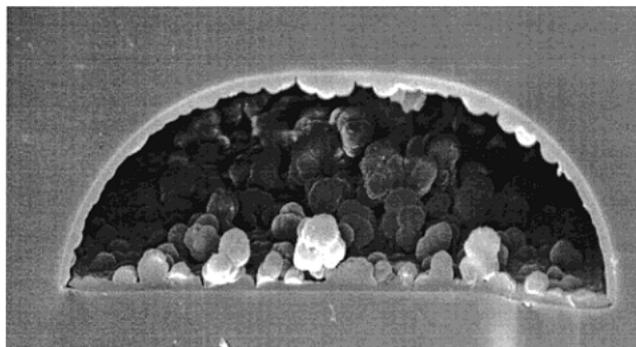


FIGURE 3.1 – Cliché MEB d'un monolithe de Poly(BMA-co-EDMA) synthétisé dans un microcanal en verre [31].

La polymérisation est généralement initiée par chauffage ou par rayonnement UV en présence d'amorceurs. Elle peut également être initiée, mais plus rarement, par des micro-ondes [35] ou encore par rayons γ [34]. Le matériau obtenu est finalement lavé avec de grandes quantités de solvants organiques pour éliminer les monomères qui n'ont pas réagi et les solvants porogènes en excès.

De façon générale, les monolithes organiques sont hautement biocompatibles et stables sur une large gamme de pH, ce qui les rend aptes à une utilisation pour des échantillons biologiques tels que l'urine ou le sérum. Cependant, dans la plupart des cas, ils souffrent de problèmes de gonflement lors de l'exposition aux solvants organiques, conduisant à une faible stabilité mécanique.

Les avantages des phases stationnaires monolithiques habituellement utilisées pour la chromatographie et l'électrochromatographie ont été bien décrits dans de nombreuses études [19]. Bon nombre de ces avantages sont également présents pour les monolithes polymériques à visée d'extraction. En général, ils permettent des vitesses d'écoulement linéaires relativement élevées. Ceci est considéré comme un grand avantage pour les analyses à haut débit ou les extractions à partir de grands volumes d'échantillon. La popularité des monolithes organiques dans la littérature ne s'explique qu'en partie par leurs avantages en terme de performance. Un avantage tout aussi important est leur facilité de synthèse, car ces monolithes peuvent être synthétisés in-situ dans un canal microfluidique [23]. Cet avantage est particulièrement intéressant pour les dispositifs micro et nanométriques, où l'incorporation de supports d'extraction particuliers tels que les particules de silice greffées, les billes fonctionnalisées ou encore la synthèse in-situ des monolithes de silice par procédé sol-gel est difficile [10]. En outre, les monolithes polymériques sont généralement au moins 60% plus poreux que les lits de particules et les monolithes polymériques. Leur porosité dépend des solvants porogènes utilisés (nature, proportion). En comparaison à leurs homologues à base de silice, les monolithes organiques présentent un inconvénient majeur, qui est leur faible surface spécifique. Ceci peut être considéré comme un inconvénient dès lors que l'on sait que la surface spécifique de la phase

monolithique est l'un des facteurs les plus importants pour garantir des rendements d'extraction élevés. Les surfaces spécifiques de monolithes déclarées dans plusieurs articles publiés sont généralement inférieures à $50m^2/g$.

3.2.2 Applications des monolithes organiques dans la préconcentration de protéines et peptides en microsystemes

La synthèse localisée de monolithe dans un canal microfluidique en utilisant une polymérisation photochimique à travers un masque, ainsi que leur possible fonctionnalisation ont permis le développement de quelques dispositifs microfluidiques complexes intégrant de multiples modules. Cependant, comme mentionné dans la revue du chapitre précédent, peu d'exemples de microsystemes intégrant une étape de préconcentration par extraction sur phase solide de protéines et peptides ont été décrits dans la littérature.

Le tableau 3.1 regroupe l'ensemble des publications portant sur la préconcentration de protéines et peptides par extraction réalisée sur support solide. Le tableau spécifie non seulement la nature du monolithe ou du support solide utilisé pour la préconcentration, mais aussi à quelle(s) protéine(s) il a été appliqué, ainsi que le mode de détection ou de séparation utilisé en aval. Lorsque le facteur d'enrichissement a été précisé, celui-ci est indiqué dans le tableau. On y retrouve principalement les monolithes organiques et les billes en tant que support solide, introduit au sein d'un microsysteme analytique.

Nous remarquons ainsi que le verre est le matériau le plus utilisé pour intégrer un support solide de préconcentration ce qui peut être expliqué par le traitement de surface relativement facile du verre en comparaison avec les autres matériaux. Le PDMS, au contraire, n'a jamais été exploité. Les monolithes organiques, principalement à base de méthacrylate, sont aussi les plus utilisés comme support solide de préconcentration.

Le premier microsysteme analytique intégrant un module de préconcentration sur support solide de protéines a été réalisé en 2001 par l'équipe de Yu [31]. Il s'agit d'un microsysteme en verre de type monocanal de $100\mu m$ de diamètre sur lequel a été polymérisé in-situ un monolithe BMA-co-EDMA de 7 mm de longueur. L'extraction et l'enrichissement de la GFP recombinante ont été réalisés avec succès par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes avec le monolithe. Un facteur d'enrichissement de 10^3 a été atteint. La préconcentration de la GFP en ligne sur puce en utilisant le poly (méthacrylate de butyle-co-éthylène diméthacrylate) comme support solide a été ultérieurement réalisée dans les mêmes auteurs avec un facteur d'enrichissement de 1000 [32]. Le monolithe a été synthétisé sur une longueur de 7 mm.

Plus tard, Lee et ses collaborateurs ont développé dans un microsysteme analytique en verre, présenté à la figure 3.2, un support d'immuno-affinité basé sur un monolithe de poly(GMA-co-TRIM) fonctionnalisé, via une attache covalente, avec du Cibacron-blue-3G-A pour la capture spécifique du lysosyme ou de HSA [6].

La figure 3.3 présente des images de fluorescence du monolithe en présence de lysosyme marqué au FITC, de cytochrome C marqué au FITC ou du mélange lyso-

Tableau 3.1 – Récapitulatif des publications portant sur la préconcentration de protéines et peptides par extraction sur support solide en microsystèmes analytiques.

Support solide	Analyte	Matériau du dispositif	Détection	Facteur d'enrichissement	Référence
Monolithe META/BMA/EDMA	Cytochrome C/ myoglobine	Verre	CEC CE-MS	-	[5]
Monolithe Zr^{4+} -IMAC (HEMA-co-EDMA)	digests (α S1caséine+ β caséine)	Verre	MALDI-TOF -MS	-	[29]
Monolithe Poly(BMA-co-TMPTMA)	FITC-ribonuclease A / FITC-cytochrome C	COP	HPLC	150	[7]
Monolithe Poly(GMA-co-EGDMA)	FITC-HSA et FITC-IgG	PMMA	EC	-	[21]
Monolithe Poly(LA-co-EDMA)	Myoglobine	COC	ESI-MS	-	[1]
Monolithe Poly(GMA-co-TRIM)	Lysosyme HSA	Verre	MALDI-TOF-MS	-	[25]
Monolithe Poly(BMA-co-EDMA)	GFP	-	EC-LIF	1000	[32]
Monolithe Poly(BMA-co-EDMA)	GFP	Verre	EC	10^3	[31]
Billes magnétiques	Peptides A β	PDMS	MALDI-TOF-MS	170	[24]
Billes Oasis TM HLB	Cytochrome C digérée	Verre	CE-MS	-	[28]
Billes d'agarose	β caséine digérée	Verre	EC cLC/MS	-	[33]

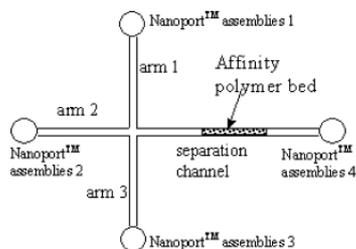


FIGURE 3.2 – Schéma du dispositif microfluidique en verre utilisé pour la capture par affinité du lysosyme ou de HSA [6].

syme et cytochrome C. La faible fluorescence observée en présence de cytochrome C marqué au FITC et, au contraire, la forte intensité de fluorescence obtenue en présence de lysosyme marqué au FITC indiquent une affinité forte et spécifique entre le monolithe fonctionnalisé et le lysosyme.

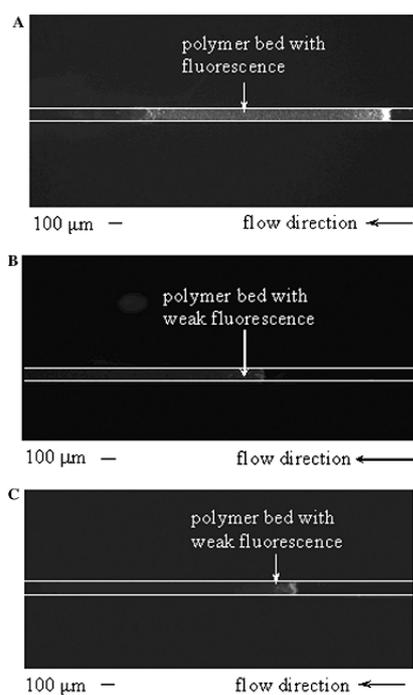


FIGURE 3.3 – Images de fluorescence du monolithe d'immunoaffinité de lysosyme synthétisé dans un dispositif microfluidique en verre. (A) après percolation de lysosyme marqué au FITC. (B) Après percolation de cytochrome C marqué au FITC. (C) Après percolation d'un mélange de lysozyme non dérivé et de cytochrome C marqué au FITC [6].

Lee et ses collaborateurs ont alors testé le monolithe modifié dans un canal microfluidique pour l'extraction de l'albumine humaine à partir du LCR, qui est un

mélange beaucoup plus complexe que celui constitué uniquement de lysozyme et de cytochrome C. Afin de détecter la capture de l'albumine par fluorescence, ils ont utilisé un dosage de type sandwich en utilisant des anticorps anti-albumine humaine marquée au FITC. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.4. On observe clairement une importante fluorescence dans le cas où la HSA est capturée (figure 3.4.A), et pas de fluorescence dans le cas du monolithe de contrôle sur lequel a été percolée uniquement la solution tampon (figure 3.4.B).

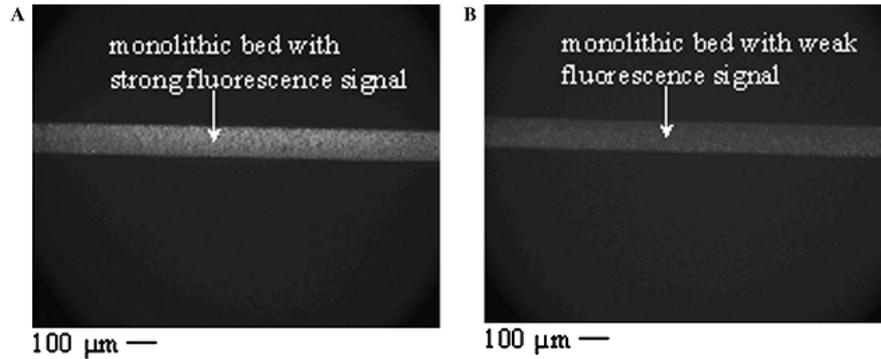


FIGURE 3.4 – Images de fluorescence du monolithe d'immunoaffinité pour la HSA en utilisant des anticorps anti-HSA. (A) Monolithe en présence de HSA capturée à partir du LCR (B) monolithe de contrôle [6].

Plus récemment, l'équipe de Bedair a proposé la polymérisation d'un monolithe Poly(LA-co-EDMA) à l'orifice de sortie d'un microsysteme en COC et son utilisation comme émetteur d'électrospray. L'application de ce monolithe comme support solide d'extraction de protéine avant la détection par spectrométrie de masse a été démontrée pour la préconcentration de la myoglobine [1].

L'extraction par immunoaffinité de protéines dérivées au FITC suivie de leur séparation par électrophorèse en ligne a été effectuée au sein d'une puce en PMMA. Celle-ci intègre un monolithe GMA-EGDMA de 2 mm de longueur placé en amont du canal de séparation [21]. Le dispositif utilisé ainsi qu'une image MEB du monolithe synthétisé sont représentés aux figures 3.5 et 3.6.

L'immobilisation des anticorps anti-FITC sur le monolithe est réalisée par réaction directe des groupements époxy du GMA avec les groupements amine des anticorps à 37°C pendant 24 h. Après immobilisation des anticorps, les groupements époxy résiduels sont bloqués avec du tampon Tris (pH 8), le Tween-20 (20%) a été ajouté à la solution de protéine afin d'éliminer leur adsorption non spécifique. Le monolithe est percolé par un mélange de HSA et d'IgG, tous deux dérivés au FITC, à différentes concentrations. Leur élution est suivie d'une séparation en ligne réalisée en mode électrophorèse de zone (3.7). La GFP non dérivée par le FITC a été également ajoutée au mélange des deux protéines dérivées au FITC, les électrophérogrammes obtenus indiquent l'extraction sélective des protéines HSA et IgG marquées au FITC. (figure 3.7)

Très récemment, Hua et ses collaborateurs ont développé un microsysteme ana-

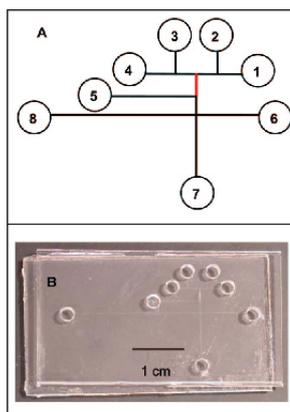


FIGURE 3.5 – Dispositif microfluidique proposé par Sun et al. pour la préconcentration la séparation en ligne de protéines sur puce en PMMA (A) Design de la puce en PMMA, (1-7) les réservoirs (B) Photo du dispositif fabriqué [21].

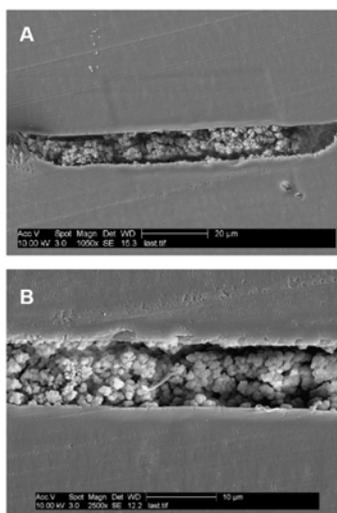


FIGURE 3.6 – Clichés MEB du monolithe poly(GMA-EGDMA) synthétisé au sein d'une puce en PMMA (A) image du canal entier (B) image agrandie [21].

lytique en verre intégrant 1mm d'un monolithe META/BMA/EDMA pour la digestion et la préconcentration du cytochrome C ou de la myoglobine [5]. Des photos du monolithe polymérisé dans le microcanal sont présentées à la figure 3.8.

La structure monolithique synthétisée retient les protéines dans des conditions aqueuses. En présence de 60% d'ACN, l'éluion puis la séparation par électrophorèse des protéines sont représentées par les profils de la figure 3.9 pour le cytochrome C et la myoglobine. Le pic fin obtenu pour le cytochrome C indique une désorption rapide par le tampon d'éluion. La myoglobine, plus hydrophobe, est éluée plus tard avec un pic plus large. Dans les deux cas, le système utilisé a permis de détecter les protéines.

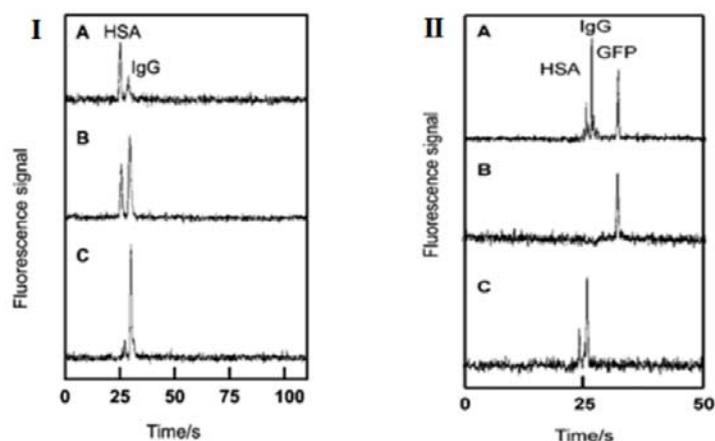


FIGURE 3.7 – (I) Electrophérogrammes d'élution de HSA et d'IgG de la surface du monolithe anti-FITC intégré dans une puce en PMMA. (II) Electrophérogrammes de purification puis séparation du FITC-IgG et FITC-HSA de la GFP [21].

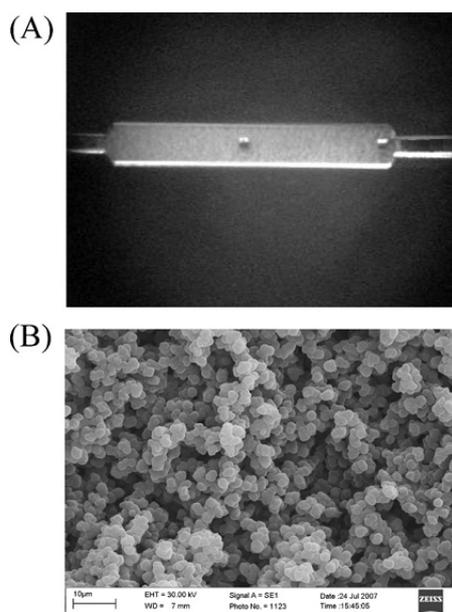


FIGURE 3.8 – (A) Photo optique du monolithe META/BMA/EDMA synthétisé dans un microcanal en verre (B) Image MEB du monolithe indiquant une structure uniforme [5].

Un article portant sur la préconcentration des phosphopeptides en microsystème a été récemment publié en 2011 (à la fin de ma thèse) par Wang et ses collaborateurs. Cette fois, le support solide d'extraction est constitué d'un monolithe organique synthétisé in-situ dans une puce en verre. Ces travaux seront présentés avec plus de détails dans le chapitre 7 de ce manuscrit.

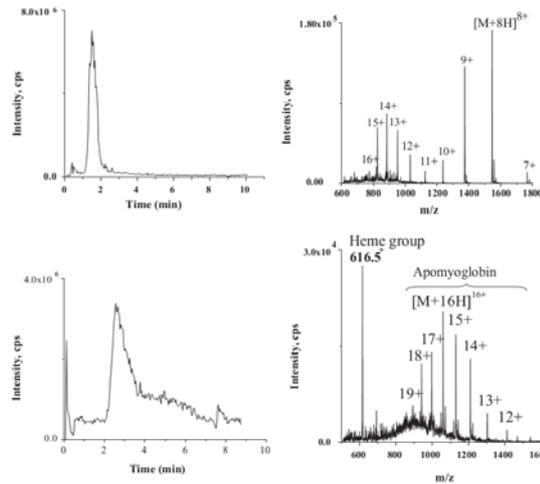


FIGURE 3.9 – Électrophérogammes (à gauche) et spectres de masse (à droite) du cytochrome C (en haut) et de la myoglobine (en bas) obtenus après leur préconcentration sur colonne monolithique à base de META/BMA/EDMA dans une puce en verre [5].

3.3 Préconcentration de protéines et peptides sur phases stationnaires particulières

Les phases particulières font partie des supports d'extraction fréquemment utilisés en SPE. Les phases particulières que l'on peut généralement rencontrer dans la littérature sont principalement des billes magnétiques et des particules de silice gréffées. Cependant, à ce jour, ces phases particulières ont été rarement exploitées en micro systèmes analytiques pour l'enrichissement des protéines et peptides.

Le premier système intégrant une phase particulière pour la préconcentration de peptides a été proposé en 2006 par Yue et al.[33]. Ces travaux seront explicités plus en détails dans le chapitre 7 de ce mémoire.

Récemment, l'équipe de Wang [28] a proposé un dispositif intégrant un module de digestion enzymatique, un module de préconcentration sur phase solide et un module de séparation couplé à un spectromètre de masse comme le présente la figure 3.10.

Afin d'évaluer le module de préconcentration conçu, les auteurs ont testé deux types de phases particulières : des billes POROS R2 et des billes de type *Oasis*TM HLB pour l'enrichissement des produits de la digestion trypsique du cytochrome C. Il s'est avéré que les billes *Oasis*TM HLB étaient plus efficaces.

Le module SPE intégré a d'abord été testé en utilisant un mélange de peptides standards (angiotensine, leu-enkaphalin, LHRH). La récupération a été évaluée à partir de la hauteur de pics du spectre de masse des peptides élués, par rapport aux pics de la solution initiale. Sur la base des rapports de volumes utilisés, un facteur d'enrichissement de 10 a été atteint.

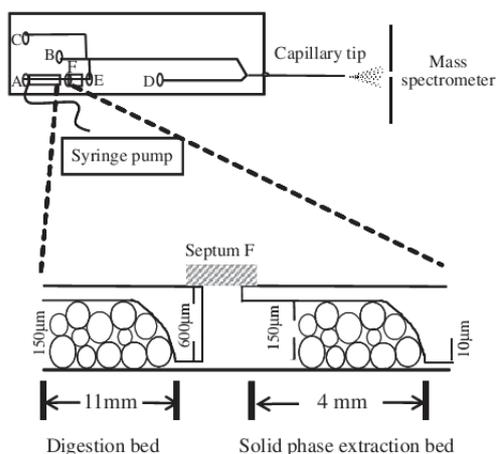


FIGURE 3.10 – Schéma du dispositif microfluidique en verre développé par Wang et al. intégrant des modules de digestion trypsique, de SPE, de séparation et une pointe d'électrospray [28].

Le module SPE a également été évalué avec l'analyse des peptides issus de la digestion du cytochrome C par la trypsine. Le spectromètre de masse de la figure 3.11 montre les résultats obtenus sans étape de SPE au préalable. Seuls cinq fragments du cytochrome C ont été observés alors que 17 peptides issus du cytochrome C ont pu être observés (3.11B) lorsqu'une étape de préconcentration a eu lieu sur un support SPE de 4 mm de longueur contenant 0,15 mg de billes. un facteur d'enrichissement de 13 a été obtenu.

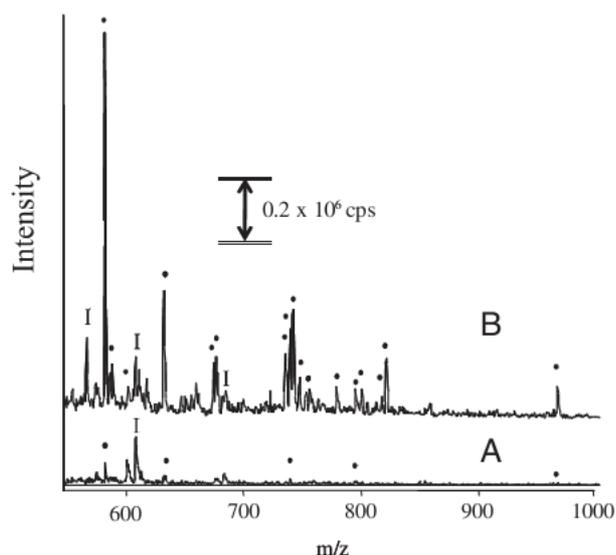


FIGURE 3.11 – Spectres de masse des produits de digestion du cytochrome C (A) sans préconcentration par SPE et (B) avec préconcentration par SPE [28].

Très récemment, des travaux publiés par Svobodova [24] et ses collaborateurs portant sur la préconcentration des peptides amyloïdes ($A\beta$) proposent un micro-système en PDMS intégrant un module d'immunoprécipitation, connu sous le nom de micro-immunoprécipitation (μ IP). La technique utilise, dans un canal microfluidique de 1 mm, un support immunosorbant, constitué de billes magnétiques sur lesquelles sont immobilisés des anticorps spécifiques anti- $A\beta$. Ces billes s'auto-organisent sous l'effet d'un champ magnétique en présence de 2 aimants permanents. Le dispositif microfluidique utilisé est présenté par la figure 3.12.

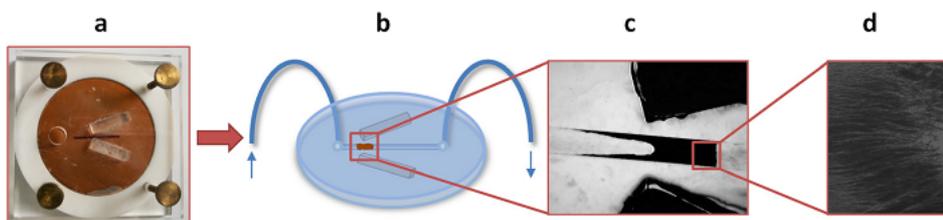


FIGURE 3.12 – Dispositif microfluidique proposé par Svobodova et al. (a) Photo du master utilisé pour le moulage du PDMS, (b) schéma du dispositif microfluidique en PDMS (c), (d) détails de la microcolonne d'affinité anti- $A\beta$ dans le canal microfluidique [24].

Après enrichissement des peptides amyloïdes sur le support, le peptide $A\beta$ 1-42 a été biospécifiquement capturé lors de l'étape de chargement et est efficacement libéré ensuite lors de l'étape d'élution. Les auteurs ont alors réussi à préconcentrer les peptides $A\beta$ sur le support à partir d'un volume de $100\mu\text{L}$ à un volume de $0.58\mu\text{L}$ ce qui signifie un enrichissement d'au moins 170 fois.

3.4 Conclusion

Les micro-systèmes analytiques se montrent des dispositifs performants pour l'analyse complète d'échantillons biologiques. La possibilité d'y intégrer un module de préconcentration pour des molécules d'intérêt se révèle intéressante afin non seulement d'augmenter la sensibilité de la méthode mais aussi de débarrasser les échantillons complexes des éléments interférents. Cependant, comme nous l'avons montré au cours de ce chapitre, l'exploitation de cette approche de préconcentration sur support solide en micro-système n'est pas encore répandue bien que les travaux réalisés à ce jour dans ce domaine montrent une bonne performance de ces techniques.

Le petit nombre d'applications existant dans la littérature peut probablement s'expliquer par la complexité des designs des dispositifs intégrant différents modules de préparation d'échantillons, de séparation ou encore de détection. En effet, ces systèmes nécessitent l'utilisation de plusieurs réservoirs pour chaque étape. En outre,

il est nécessaire que les différentes solutions utilisées soient compatibles du fait que chaque module nécessite ses propres conditions, le tampon de séparation est par exemple différent de celui d'éluion.

Nous remarquons que le verre est le matériau de microsystèmes le plus utilisé. Malgré tous ses avantages, surtout en terme de microfabrication et de flexibilité, le PDMS n'a pas été exploité dans le cadre de microsystèmes dédiés à la préconcentration d'échantillons biologiques. En outre, les monolithes organiques restent les plus utilisés en tant que supports solides de préconcentration par SPE en comparaison avec les phases particulières qui sont rarement exploitées.

D'après les exemples présentés dans ce chapitre, nous remarquons également que la préconcentration d'analytes se trouvant à l'état de trace dans des échantillons biologiques complexes, tels que le sérum ou l'urine, n'a jamais été réalisée et que les applications se limitent à des échantillons simples.

Enfin, il s'avère que le couplage "en ligne" d'un module de préconcentration en amont d'une étape de séparation reste marginal. Ainsi, c'est dans ce cadre que se situe mon sujet de thèse dont l'objectif est de proposer non seulement un couplage en ligne de la préconcentration et de la séparation de phosphopeptides mais également de travailler dans un matériau non exploité à ce jour pour la préconcentration qui est le PDMS.

Bibliographie

- [1] Mohamed F. Bedair and Richard D. Oleschuk. Fabrication of porous polymer monoliths in polymeric microfluidic chips as an electrospray emitter for direct coupling to mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 78(4) :1130–1138, 2006. (Cité en pages 73, 75, 118, 124 et 125.)
- [2] Michael C. Breadmore. Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips. *ELECTROPHORESIS*, 28(1-2) :254–281, 2007. (Cité en pages 68 et 70.)
- [3] Michael R. Buchmeiser. Polymeric monolithic materials : Syntheses, properties, functionalization and applications. *Polymer*, 48(8) :2187 – 2198, 2007. (Cité en page 70.)
- [4] Braden C. Giordano, Dean S. Burgi, Sean J. Hart, and Alex Terray. On-line sample pre-concentration in microfluidic devices : A review. *Analytica Chimica Acta*, 718(0) :11 – 24, 2012. (Cité en page 70.)
- [5] Yujuan Hua, Abebaw B. Jemere, and D. Jed Harrison. On-chip solid phase extraction and enzyme digestion using cationic polye-323 coatings and porous polymer monoliths coupled to electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(26) :4039 – 4044, 2011. (Cité en pages 73, 76, 77 et 78.)
- [6] Chen Li and Kelvin H. Lee. Affinity depletion of albumin from human cerebrospinal fluid using cibacron-blue-3g-a-derivatized photopatterned copolymer in a microfluidic device. *Analytical Biochemistry*, 333(2) :381 – 388, 2004. (Cité en pages 72, 74 et 75.)
- [7] Jikun Liu, Chien-Fu Chen, Chia-Wen Tsao, Chien-Cheng Chang, Chin-Chou Chu, and Don L. DeVoe. Polymer microchips integrating solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography using reversed-phase polymethacrylate monoliths. *Analytical Chemistry*, 81(7) :2545–2554, 2009. (Cité en page 73.)
- [8] A. Manz, N. Graber, and H.M. Widmer. Miniaturized total chemical analysis systems : A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 1(1-6) :244–248, January 1990. (Cité en pages 67 et 117.)
- [9] Akira Namera, Akihiro Nakamoto, Takeshi Saito, and Shota Miyazaki. Monolith as a new sample preparation material : Recent devices and applications. *Journal of Separation Science*, 34(8) :901–924, April 2011. (Cité en page 70.)
- [10] Richard D. Oleschuk, Loranelle L. Shultz-Lockyear, Yuebin Ning, and D. Jed Harrison. Trapping of Bead-Based reagents within microfluidic systems : On-Chip Solid-Phase extraction and electrochromatography. *Analytical Chemistry*, 72(3) :585–590, 2000. (Cité en page 71.)
- [11] Eric C. Peters, Miroslav Petro, Frantisek Svec, and Jean M. J. Fréchet. Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. *Analytical Chemistry*, 69(17) :3646–3649, 1997. (Cité en page 69.)

- [12] Eric C. Peters, Miroslav Petro, Frantisek Svec, and Jean M. J. Fréchet. Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 1. fine control of porous properties and surface chemistry. *Analytical Chemistry*, 70(11) :2288–2295, 1998. (Cité en page 69.)
- [13] Emily F Hilder Oscar G Potter. Porous polymer monoliths for extraction : diverse applications and platforms. *Journal of separation science*, 31(11) :1881–1906, 2008. (Cité en page 70.)
- [14] Gaelle Proczek, Violaine Augustin, Stephanie Descroix, and Marie-Claire Hennion. Integrated microdevice for preconcentration and separation of a wide variety of compounds by electrochromatography. *ELECTROPHORESIS*, 30(3) :515–524, 2009. (Cité en page 70.)
- [15] Patricia Puig, Francesc Borrull, Marta Calull, and Carme Aguilar. Recent advances in coupling solid-phase extraction and capillary electrophoresis (SPE-CE). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(7) :664 – 678, 2007. (Cité en pages 68 et 70.)
- [16] Rawi Ramautar, Govert W Somsen, and Gerhardus J de Jong. Recent developments in coupled SPE-CE. *Electrophoresis*, 31(1) :44–54, January 2010. PMID : 20014054. (Cité en page 70.)
- [17] Kyung Won Ro, Ranu Nayak, and Daniel R. Knapp. Monolithic media in microfluidic devices for proteomics. *ELECTROPHORESIS*, 27(18) :3547–3558, 2006. (Cité en page 70.)
- [18] Michael W. H. Roberts, Clarence M. Ongkudon, Gareth M. Forde, and Michael K. Danquah. Versatility of polymethacrylate monoliths for chromatographic purification of biomolecules. *Journal of Separation Science*, 32(15-16) :2485–2494, 2009. (Cité en page 70.)
- [19] Karel Stulik, Vera Pacakova, Jana Suchankova, and Pavel Coufal. Monolithic organic polymeric columns for capillary liquid chromatography and electrochromatography. *Journal of Chromatography B*, 841(1-2) :79 – 87, 2006. (Cité en page 71.)
- [20] Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, and Koji Otsuka. Recent progress of online sample preconcentration techniques in microchip electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 31(14) :2650–2666, 2008. (Cité en pages 68 et 70.)
- [21] Xiuhua Sun, Weichun Yang, Tao Pan, and Adam T. Woolley. Affinity Monolith-Integrated poly(methyl methacrylate) microchips for On-Line protein extraction and capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 80(13) :5126–5130, July 2008. (Cité en pages 73, 75, 76 et 77.)
- [22] Frantisek Svec. Less common applications of monoliths : Preconcentration and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 841(1-2) :52–64, September 2006. (Cité en page 70.)
- [23] Frantisek Svec, Eric C. Peters, David Sýkora, and Jean M.J. Fréchet. Design of the monolithic polymers used in capillary electrochromatography columns. *Journal of Chromatography A*, 887(1-2) :3 – 29, 2000. (Cité en page 71.)

- [24] Zuzana Svobodova, Mohamad Reza Mohamadi, Barbora Jankovicova, Hermann Esselmann, Romain Verpillot, Markus Otto, Myriam Taverna, Jens Wiltfang, Jean-Louis Viovy, and Zuzana Bilkova. Development of a magnetic immunosorbent for on-chip preconcentration of amyloid beta isoforms : Representatives of alzheimer's disease biomarkers. *Biomicrofluidics*, 6(2) :024126, 2012. (Cité en pages 73 et 80.)
- [25] S. Talaei, O. Frey, P.D. van der Wal, N.F. de Rooij, and M. Koudelka-Hep. Hybrid microfluidic cartridge formed by irreversible bonding of SU-8 and PDMS for multi-layer flow applications. *Procedia Chemistry*, 1(1) :381–384, September 2009. (Cité en page 73.)
- [26] F. W. Alexander Tempels, Willy J. M. Underberg, Govert W. Somsen, and Gerhardus J. de Jong. Design and applications of coupled SPE-CE. *ELECTROPHORESIS*, 29(1) :108–128, 2008. (Cité en page 70.)
- [27] Evgenia G Vlakh and Tatiana B Tennikova. Preparation of methacrylate monoliths. *Journal of Separation Science*, 30(17) :2801–2813, November 2007. PMID : 17960852. (Cité en page 70.)
- [28] Can Wang, Abebaw B. Jemere, and D. Jed Harrison. Multifunctional protein processing chip with integrated digestion, solid-phase extraction, separation and electrospray. *ELECTROPHORESIS*, 31(22) :3703–3710, 2010. (Cité en pages 73, 78 et 79.)
- [29] Hui Wang, Jicheng Duan, Hongjiu Xu, Liang Zhao, Yu Liang, Yichu Shan, Lihua Zhang, Zhen Liang, and Yukui Zhang. Monoliths with immobilized zirconium ions for selective enrichment of phosphopeptides. *Journal of Separation Science*, 34(16-17) :2113–2121, 2011. (Cité en pages 73, 109 et 140.)
- [30] Li Xu, Zhi-Guo Shi, and Yu-Qi Feng. Porous monoliths : sorbents for miniaturized extraction in biological analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(10) :3345–3357, April 2011. PMID : 20852850. (Cité en page 70.)
- [31] Cong Yu, Mark H. Davey, Frantisek Svec, and Jean M. J. Fréchet. Monolithic porous polymer for On-Chip Solid-Phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device. *Anal. Chem.*, 73(21) :5088–5096, 2001. (Cité en pages 70, 71, 72, 73, 117 et 125.)
- [32] Cong Yu, Mingcheng Xu, Frantisek Svec, and Jean M. J. Frechet. Preparation of monolithic polymers with controlled porous properties for microfluidic chip applications using photoinitiated free-radical polymerization. *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, 40(6) :755–769, 2002. (Cité en pages 72, 73 et 105.)
- [33] Guihua Eileen Yue, Michael G Roper, Catherine Balchunas, Abigail Pulsipher, Joshua J Coon, Jeffery Shabanowitz, Donald F Hunt, James P Landers, and Jerome P Ferrance. Protein digestion and phosphopeptide enrichment on a glass microchip. *Analytica Chimica Acta*, 564(1) :116–122, March 2006. PMID : 17723369. (Cité en pages 73, 78 et 140.)

-
- [34] Yu-Ping Zhang, Li-Qun Fan, Kwang-Pill Lee, Yi-Jun Zhang, Seong-Ho Choi, and Wen-Jun Gong. Preparation of monolithic capillary columns for capillary electrochromatography by γ -ray irradiation. *Microchimica Acta*, 158(3) :353–360, 2007. 10.1007/s00604-006-0694-7. (Cité en page 71.)
- [35] Yu-Ping Zhang, Xiong-Wen Ye, Meng-Kui Tian, Ling-Bo Qu, Seong-Ho Choi, Anantha Iyengar Gopalan, and Kwang-Pill Lee. Novel method to prepare polystyrene-based monolithic columns for chromatographic and electrophoretic separations by microwave irradiation. *Journal of Chromatography A*, 1188(1) :43 – 49, 2008. (Cité en page 71.)

Phosphorylation et biomarqueurs

4.1 Introduction

La phosphorylation est l'une des MPTs les plus communes et les plus étudiées. En 1992, il a été démontré que la phosphorylation réversible de protéines était un mécanisme de régulation, ce qui a valu le prix Nobel de Physiologie/Médecine à Edmond H. Fischer et Edwin G. Krebs. Très répandue, cette MPT concerne 30% des protéines cellulaires qui sont donc modifiées par l'attache covalente d'un groupement phosphate sur les acides aminés susceptibles de subir une phosphorylation. La phosphorylation est un évènement majeur intervenant dans la régulation de l'activité, de la localisation ou de la stabilité des protéines. Plusieurs pathologies sont associées à la dérégulation des voies de phosphorylation. Ces dernières sont impliquées dans certains cancers, certaines maladies métaboliques, neurologiques ou encore musculaires.

L'analyse protéomique permet d'étudier un grand nombre de protéines d'un échantillon ainsi que leurs modifications post-traductionnelles afin d'accéder à la réalité cellulaire et à la modulation de la fonctionnalité de ces protéines. Cette technique est également un outil permettant de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs potentiels d'une pathologie.

Les biomarqueurs sont définis comme des paramètres biologiques, des paramètres mesurables fonctionnels, cellulaires ou moléculaires, indicatifs d'un statut particulier génétique, épigénétique ou fonctionnel, pour un système biologique. Les biomarqueurs doivent permettre la caractérisation d'un état physiologique, un état pathologique, une évolution d'une maladie ou encore une réponse à un traitement donné. Leur dosage doit être précis, reproductible, fiable et réalisable par des méthodes peu invasives.

Dans le cas de la phosphorylation, le défi n'est pas simplement d'identifier et de répertorier tous les sites de phosphorylation d'une protéine, mais plutôt d'identifier le site ou les sites anormalement phosphorylés en réponse à des perturbations cellulaires ou des pathologies. L'exécution de cette tâche, compte tenu du grand nombre de sites de phosphorylation potentiels est particulièrement difficile. Ainsi, il est aussi nécessaire de comprendre les mécanismes par lesquels la phosphorylation des protéines contrôle le fonctionnement de la cellule. Plusieurs techniques d'analyse de phosphoprotéines, dont la spectrométrie de masse et l'électrophorèse, ont été développées afin de résoudre cette complexité et comprendre les différents mécanismes de cette modification.

Dans ce chapitre, nous présentons en première partie des notions générales sur la

phosphorylation de protéines et les différentes kinases impliquées dans cette réaction. Nous détaillons par la suite les différentes méthodes d'enrichissement des espèces phosphorylées dans des échantillons complexes ainsi que les techniques d'analyse de phosphoprotéines et phosphopeptides. Enfin, nous présentons un exemple de biomarqueurs phosphorylés potentiels de plusieurs pathologies humaines.

4.2 Phosphorylation de protéines

Les protéines peuvent subir d'importantes modifications, appelées MPTs, au cours et après leur biosynthèse. La présence de MPT sur une protéine peut influencer son activité, sa localisation, sa stabilité, ainsi que ses interactions avec d'autres protéines. Il existe actuellement près de 200 MPTs décrites dont la plus commune et la plus abondante est la phosphorylation. Elle consiste en l'ajout covalent du groupement phosphate terminal de l'adénosine triphosphate (ATP) sur le groupement hydroxyle d'un acide aminé de la protéine cible. Ce processus est une réaction enzymatique rapide et réversible catalysée par une protéine kinase. La déphosphorylation de la protéine est effectuée par une phosphatase. La figure 4.1 illustre la réaction de phosphorylation de la tyrosine.

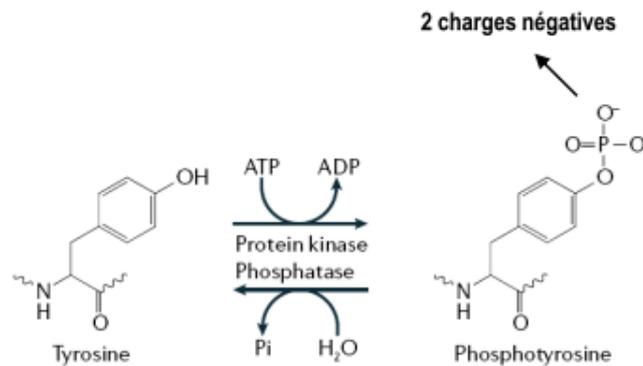


FIGURE 4.1 – Schéma général de la phosphorylation de la tyrosine

Chez les eucaryotes, les sites de phosphorylation les plus communs et les plus importants sont les résidus sérine, thréonine et tyrosine. Les résidus sérine et thréonine sont plus fréquemment phosphorylés que les résidus tyrosine, avec un ratio de (pS :pT :pY) 1000 :100 :1 dans une cellule de vertébré[11].

Les protéines kinases, enzymes responsables de la phosphorylation, sont si nombreuses qu'elles représentent la troisième grande famille de protéines par leur abondance dans le génôme humain. Les kinases sont caractérisées par un domaine catalytique commun retrouvé dans 478 des 518 séquences recensées. Selon le résidu modifié, on les classe habituellement selon 4 principaux groupes :

- les sérine-thréonine kinases : elles sont au nombre de 400 et représentent la plus grande portion des kinases (67%),

- les tyrosine kinases : elles représentent 17% de toutes les kinases. Elles sont responsables de fonctions clés telle que la transduction d'un stimulus externe au noyau de la cellule. Ce groupe est divisé en deux classes : récepteurs tyrosine kinase et tyrosine kinases cytoplasmiques,
- les tyrosine kinases-like : elles représentent 8% de toutes les kinases,
- les kinases atypiques (où l'on retrouve les lipides kinases) (8%).

4.3 Analyse de phosphoprotéines

Les MPTs ne peuvent généralement pas être prédites avec précision à partir de la traduction seule de la séquence du gène. Ainsi, la détermination expérimentale des différents sites de phosphorylation doit souvent être mise en oeuvre. À cette fin, le développement et l'optimisation de protocoles pour l'enrichissement des protéines ou des peptides phosphorylés est essentiel. En outre, diverses méthodes ont été développées pour l'analyse de protéines et peptides phosphorylés.[43].

L'analyse des phosphoprotéines n'est pas simple pour diverses raisons. En effet, seule une faible fraction du pool protéique total est modifiée à un instant donné et en réponse à un stimulus donné (signalisation et régulation cellulaire). En outre, les sites de phosphorylation sur les protéines peuvent varier, ce qui implique que toute phosphoprotéine est intrinsèquement hétérogène, c'est-à-dire qu'elle peut exister sous différentes formes phosphorylées. Une autre raison importante qui complique davantage l'analyse des phosphoprotéines est que la plupart des molécules de signalisation, cibles principales d'événements de phosphorylation, sont présentes à faible concentration dans les liquides biologiques et, dans ces cas, l'enrichissement est une condition nécessaire avant l'analyse.

4.3.1 Méthodes d'enrichissement des phosphoprotéines

Les protéines phosphorylées étant souvent peu abondantes dans les liquides physiologiques, un certain nombre de techniques a été développé pour purifier partiellement ou enrichir préférentiellement les phosphoprotéines et les phosphopeptides à partir d'un mélange complexe. La plupart des stratégies couramment utilisées sont résumées à la figure 4.2 et sont principalement basées sur l'immunoprécipitation, la chromatographie d'affinité et les modifications chimiques. Ces techniques ont été décrites dans plusieurs revues dans la littérature.[4, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 22, 26, 32, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 42, 44, 45, 49, 50, 53, 58, 61]. Au cours de cette section du chapitre, nous présentons brièvement, à titre d'exemple, uniquement les techniques d'enrichissement basées sur la chromatographie d'affinité.

4.3.1.1 La chromatographie d'affinité de type IMAC

L'IMAC est une technique d'enrichissement de phosphoprotéines et de phosphopeptides largement utilisée et qui est principalement basée sur l'emploi d'une matrice composée de support solide sur lequel sont immobilisés des ions métalliques [1]. Ces

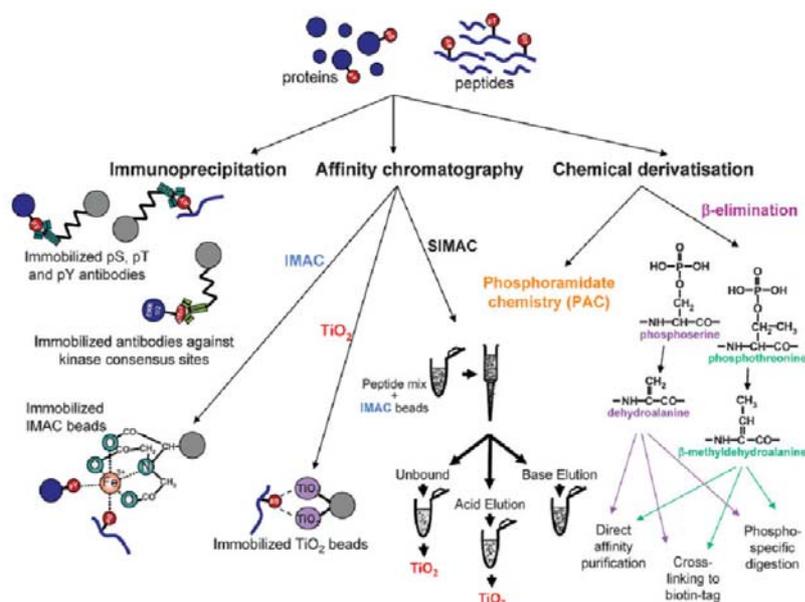


FIGURE 4.2 – Les stratégies d’enrichissement des protéines et peptides phosphorylés[54]

ions métalliques peuvent capturer les groupements phosphate des phosphoprotéines ou phosphopeptides via des liaisons de coordination. Au fil des années, une variété de supports ont été introduits pour l’enrichissement par IMAC, principalement les monolithes [64, 15], qui sont devenus les plus fréquemment utilisés pour l’enrichissement de phosphoprotéines et phosphopeptides. Des kits commerciaux pour l’enrichissement par IMAC sont également disponibles auprès de différents fournisseurs. Les ions métalliques les plus utilisés pour l’enrichissement des phosphopeptides, sont principalement le Fe^{3+} [41], le Ga^{3+} [46], le Zr^{4+} [63] et le Ti^{4+} [64].

4.3.1.2 La chromatographie d’affinité de type MOAC

A la différence de l’IMAC, la matrice de chromatographie de type MOAC (Metal oxide affinity chromatography) est elle-même composée d’oxydes ou d’hydroxydes métalliques de telle sorte que la présence d’un support d’ancrage n’est pas nécessaire. L’enrichissement de phosphopeptides a été généralement réalisé par du dioxyde de titane (TiO_2), alors que celui de phosphoprotéines se basait principalement sur l’hydroxyde d’aluminium ($Al(OH)_3$). Les oxydes de métaux alternatifs, tels que le dioxyde de zirconium (ZrO_2), l’oxyde de gallium (Ga_2O_3), l’oxyde ferrique (Fe_3O_4), oxyde de niobium (Nb_2O_3), l’oxyde d’étain (SnO_2) et l’oxyde de tantale (Ta_2O_5) n’ont été que rarement utilisés [33].

A titre d’exemple, la TiO_2 – MOAC est fréquemment utilisée pour l’enrichissement de phosphopeptides, et plusieurs protocoles ont été publiés. La TiO_2 – MOAC a été démontrée comme plus efficace que l’IMAC en terme de sélectivité [3, 30, 31] ou encore de sensibilité [23]. Un autre exemple est l’hydroxyde d’aluminium gén-

ralement utilisé pour l'enrichissement de phosphoprotéines par MOAC [60].

4.3.1.3 La chromatographie d'affinité de type SIMAC

La SIMAC (Sequential elution from IMAC) est une méthode d'enrichissement de phosphopeptides basée sur la combinaison des méthodes MOAC et IMAC [55]. Cette combinaison renforce la sélectivité et la sensibilité de l'enrichissement. L'utilisation de la SIMAC permet l'identification d'une plus grande quantité de phosphopeptides que si l'on utilise le MOAC seul et s'est avérée plus efficace, en particulier pour l'enrichissement de peptide multiphosphorylés [55]. Il en résulte la séparation des peptides multiphosphorylés et monophosphorylés. Une application de SIMAC a été réalisée de façon satisfaisante dans plusieurs travaux [7, 48].

L'éluion séquentielle est un autre avantage dans le cas du SIMAC. Disposant d'une plus grande quantité de fractions de phosphopeptides moins complexes, elle augmente la probabilité de leur ionisation et identification par SM.

Une autre approche d'enrichissement basée sur la chromatographie d'affinité a été très récemment publiée par Iliuk et ses collaborateurs [25]. La matrice d'enrichissement est composée d'un dendrimère fonctionnalisé avec des groupements latéraux (Figure 4.3) et l'immobilisation d'un ion métallique permet la capture des protéines et peptides phosphorylés. Les performances de cette technique ne peuvent être confirmées pour le moment parce qu'elle n'a pas été largement testée. Le détail de cette technique ne sera pas étudié dans cette partie.

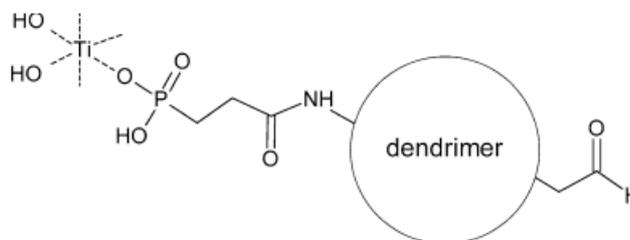


FIGURE 4.3 – Les deux types de chaînes latérales attachés au dendrimère de Polymac [25].

4.3.2 Analyse de phosphoprotéines

Plusieurs techniques analytiques ont été développées pour l'analyse de la phosphorylation des protéines. L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel (2DE), l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) sont largement utilisées en analyse. Ces méthodes nécessitent auparavant un préfractionnement des protéines ou des peptides afin de réduire la complexité de l'échantillon et de détecter les phosphorylations de faible abondance.

Nous nous intéresserons ainsi à ces techniques pour l'analyse de biomarqueurs phosphorylés ainsi qu'à l'apport de la spectrométrie de masse dans ce domaine.

4.3.2.1 L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel-2DE

L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel est une méthode d'analyse classique mais puissante. Elle permet de séparer des mélanges complexes de protéines en fonction de leurs points isoélectriques (par focalisation isoélectrique IEF) puis de leur masse moléculaire apparente (électrophorèse sur gel de polyacrylamide) en milieu dénaturant SDS-PAGE. Dans les gels 2-DE, le pI des protéines diminue après la phosphorylation. Cependant, ces changements, ne peuvent pas être toujours observés et peuvent être relatifs à d'autres MPTs. Ainsi, certains marquages "spécifiques" sont indispensables et permettent de détecter les protéines phosphorylées. La technologie du Pro-Q®Diamond offre la possibilité de détecter et de quantifier les protéines contenant des phosphosérines, phosphothréonines ou phosphotyrosines. De plus, cette technique est rapide, simple à mettre en œuvre, reproductible, réversible et compatible avec une analyse ultérieure par spectrométrie de masse. Cependant, la sensibilité de cette technique reste faible et nécessite une quantité importante d'échantillons.

L'inconvénient majeur du gel-2DE est le manque de reproductibilité entre les gels et le temps d'analyse important. En outre, l'analyse d'images nécessite habituellement l'appariement de gels pour éliminer des artefacts.

4.3.2.2 L'électrophorèse capillaire

L'EC est également un outil performant pour l'analyse des phosphoprotéines. La phosphorylation d'un peptide ou d'une protéine modifie en principe son pI, donc sa charge et sa mobilité électrophorétique, entraînant ainsi des différences dans les temps de migration en le mode ECZ.

Très récemment, Hu et ses collaborateurs ont utilisé un capillaire en silice fondue modifié avec des ions Fe^{3+} immobilisés sur des nanoparticules magnétiques pour la séparation par ECZ de protéines phosphorylées et non-phosphorylées [24]. L'effet positif de ces particules fonctionnalisées sur la séparation électrophorétique d'un mélange de protéines phosphorylées et non phosphorylées est illustré à la figure 4.4. Cet exemple prouve le potentiel de cette technique pour l'analyse des biomarqueurs phosphorylés.

Shiraishi et al.[51] ont séparé par CIEF-LIF différentes formes de peptides (non-phosphorylés, mono- et di-phosphorylés) des chaînes légères (LC_{20}) qui jouent un rôle important dans l'activation de la myosin II comme l'illustre la figure 4.5 [51]. Pour chaque analyse, le profil des pics obtenu est en conformité avec le degré de phosphorylation dans chaque échantillon. En effet, lorsqu'un échantillon à faible degré de phosphorylation (81,5% LC_{20} non-phosphorylé et 18,5% LC_{20} mono-phosphorylé) est analysé, on observe un tout petit pic et un autre plus intense et inversement lorsqu'un échantillon à un degré de phosphorylation plus élevé (3,6% LC_{20} non-phosphorylé, 84,2% LC_{20} mono-phosphorylé et 12,2% LC_{20} di-phosphorylé). Le pic intense correspond donc à la forme non phosphorylée alors que l'autre correspond à celle mono-phosphorylée. Ceci étant confirmé par l'analyse du mélange où

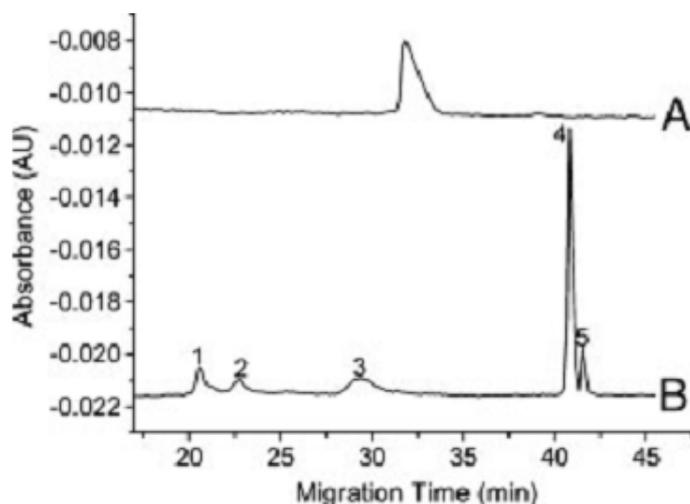


FIGURE 4.4 – Séparation par ECZ d'un mélange de protéines phosphorylées et non phosphorylées sur (A) un capillaire en silice et (B) un capillaire avec des nanoparticules fonctionnalisées par des ions Fe^{3+} . Pics : 1, α -lactalbumine ; 2, β -lactoglobuline ; 3, α -caséine ; 4, β -caséine ; et 5, k-caséin

l'on observe deux pics intenses correspondant aux LC_{20} mono-phosphorylé et non phosphorylé.

L'EC diagonale est une forme d'électrophorèse capillaire bidimensionnelle qui emploie le même mode de séparation dans chaque dimension. Cette technique a été développée par Woicik et ses collaborateurs pour suivre l'état de phosphorylation d'un mélange de peptides dans un réacteur contenant des phosphatases alcalines immobilisées [59]. Dans ce cas, l'extrémité du premier capillaire comprend un micro-réacteur enzymatique. Les analytes qui ne sont pas modifiés par le réacteur ont des temps de migration identiques dans les deux capillaires et génèrent des spots sur la diagonale de l'électrophérogramme bidimensionnel. Les analytes, qui subissent une modification enzymatique (phosphorylation) dans le réacteur, auront des temps de migration différents dans le second capillaire et génèrent des spots en dehors de la diagonale de l'électrophérogramme.

4.3.2.3 La spectrométrie de masse (SM)

Les phosphopeptides peuvent être détectés en SM par l'augmentation de masse caractéristique du groupement phosphate (HPO_3), qui correspond à +80Da pour une espèce monophosphorylée. La perte de masse de 80Da consécutive à un traitement par une phosphatase facilite aussi l'identification des phosphopeptides. Cependant, les phosphopeptides ont une efficacité d'ionisation plus faible que celle d'un peptide non-phosphorylé, il est donc plus difficile de détecter l'ion correspondant au phosphopeptide [20]. Il résulte de cette particularité que l'identification et la caractérisation des phosphorylations par SM restent toujours un défi et nécessitent des

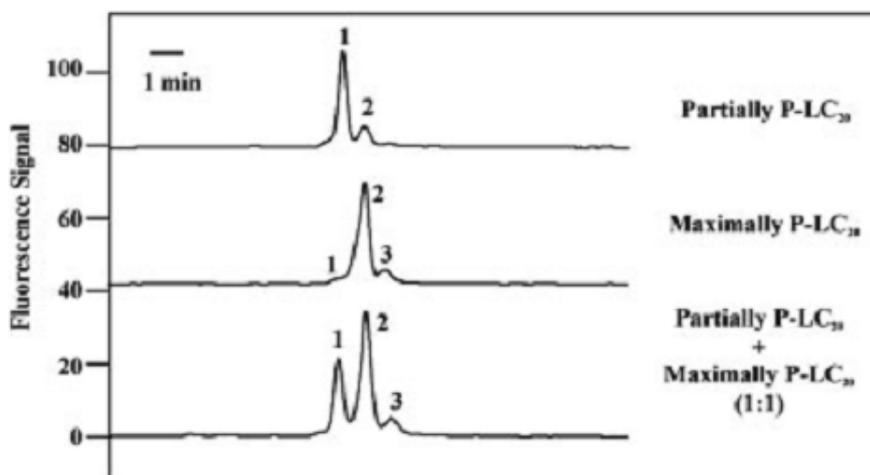


FIGURE 4.5 – Analyse par CIEF-LIF de différentes formes de LC_{20} [51]

stratégies adaptées.

L’empreinte peptidique massique est utilisée pour identifier les peptides phosphorylés. La comparaison des masses théoriques et des masses expérimentales des peptides permet de mettre en évidence les peptides ayant un adduit de masse de +80 Da. Ceci permet d’identifier les peptides phosphorylés [10]. Cependant, un peptide portant une sulfatation (adduit de +79.95 Da) peut être confondu avec un peptide phosphorylé du fait du même adduit de masse (+79.96 Da) [62]. Il est donc nécessaire de pouvoir différencier les peptides phosphorylés de ceux qui ne le sont pas, soit par détection d’ion métastable correspondant au peptide ayant perdu l’acide phosphorique, soit par comparaison entre l’échantillon non déphosphorylé et l’échantillon déphosphorylé. Les peptides portant une phosphorylation sont difficilement détectés par une analyse MALDI-MS. En effet, la phosphorylation diminue l’ionisation MALDI des peptides phosphorylés par rapport aux peptides non phosphorylés [20]. La déphosphorylation permet de mettre en évidence des peptides déphosphorylés, non détectés sous leur forme phosphorylée. Pour augmenter la détection des phosphopeptides, l’utilisation d’une matrice permettant de conserver plus facilement les groupements labiles peut être utilisée telle que l’acide 2,5 dihydrobenzoïque (DHB) [52]. Des études ont montré que l’ajout d’acide à cette matrice permet d’augmenter la détection des phosphopeptides : ajout de 1% d’acide phosphorique [27] ou de 1% d’acide méthanediphosphonique (MDPNA) [29]. L’utilisation d’une matrice liquide ionique formée à partir de DHB, de pyridine et de 1% d’acide phosphorique permet de mieux détecter les peptides phosphorylés notamment par le fait que le dépôt MALDI obtenu est plus homogène que celui obtenu avec la matrice sous forme cristalline [56]. Une modification chimique des phosphopeptides permet également d’augmenter leur efficacité d’ionisation en MALDI-MS. Ces modifications sont basées sur les réactions de β -élimination/addition de Michael et sont donc

applicables seulement aux phosphosérines et phosphothréonines. La modification consiste à remplacer le groupement phosphate chargé négativement par un groupement stable chargé positivement [28, 2, 57]. Les peptides phosphorylés peuvent être mis en évidence en utilisant le mode “balayage de perte de neutre” lors d’une analyse ESI-MS/MS. Cette méthode se sert de la fragmentation pour induire la perte du groupement neutre H_3PO_4 des phosphosérines ou des phospho-thréonines. Seuls les ions présentant une perte de masse de 98Da sont sélectionnés pour être séquencés. Cependant les résidus phospho-tyrosines ne peuvent pas être identifiés en mode de balayage par perte de neutre, à cause d’une plus grande stabilité du groupement phosphate sur ce résidu. Le balayage des ions précurseurs ou “precursor ion scan” est aussi utilisé en spectrométrie de masse en tandem en mode négatif pour identifier les phosphopeptides. Chaque ion parent libérant des ions négatifs à $m/z=79$ après la fragmentation, est sélectionné et analysé par MS/MS en mode positif. Le mode “precursor ion scan” peut aussi être utilisé en mode positif pour identifier l’ion immonium caractéristique des résidus phospho-tyrosines (m/z 216,04) [38]. Il est donc utilisé pour identifier les peptides pT à partir de mélanges complexes. Les avancées technologiques réalisées en combinant l’enrichissement de phosphopeptide et la spectroscopie de masse ont permis la détermination de centaines de milliers de sites de phosphorylation [21].

4.4 Les biomarqueurs

Les biomarqueurs sont définis comme des paramètres mesurables fonctionnels, cellulaires ou moléculaires, indicatifs d’un statut particulier génétique, épigénétique ou fonctionnel, pour un système biologique. Les biomarqueurs reflètent un état physiologique de la cellule à un moment spécifique : c’est la signature moléculaire. Des peptides et des protéines sont actuellement utilisés comme biomarqueurs moléculaires de pathologie, tel que le PSA (Prostate Specific Antigen) dans le cas du cancer de la prostate, l’insuline et le peptide-C dans le diabète, des fragments de collagène pour l’ostéoporose, l’hormone parathyroïde, la calcitonine, le pro-GRP (Gastrin Releasing Peptide) dans le cancer du poumon à petites cellules, les peptides β amyloïdes dans la maladie d’Alzheimer, la résistine dans l’obésité, ... etc.

La phosphorylation des protéines est l’un des mécanismes post-traductionnels développés par les cellules pour réguler finement les voies métaboliques et la plus faible dérégulation d’une de ces voies peut entraîner une pathologie. Plusieurs maladies sont ainsi associées à une dérégulation de la phosphorylation telles que les maladies neurodégénératives ou encore le cancer. Dans ce paragraphe est illustré à titre d’exemple le cas de la maladie d’Alzheimer. Les maladies neurodégénératives constituent un groupe de pathologies d’évolution progressive, lié à un dysfonctionnement biochimique au sein du tissu nerveux, conduisant à la souffrance puis à la mort sélective de certains groupes de neurones du système nerveux. Parmi les principales affections, citons par exemple, la maladie d’Alzheimer, la maladie de Parkinson, les ataxies cérébelleuses ainsi que de nombreuses neuropathies périphériques et des

dystrophies musculaires.

La MA est une altération progressive de la mémoire et de l'idéation, qui influent fortement les activités de la vie quotidienne de la personne atteinte. Elle se caractérise par la présence d'au moins un des troubles suivants : langage, calcul, jugement, altération de la pensée abstraite, praxies,gnosies ou modification de la personnalité (selon la définition de l'OMS 2006). Cette maladie évolue de façon progressive et de manière irréversible en raison d'une dégénérescence du tissu cérébral, et est la principale cause de démence chez les personnes âgées. L'origine physiopathologique de la MA est encore controversée. La méconnaissance de l'étiologie de cette maladie laisse place à de nombreuses hypothèses portant aussi bien sur la genèse de cette pathologie que sur l'existence de facteurs de risques environnementaux. Cette maladie est caractérisée, au niveau du cerveau, par la présence de plaques séniles constituées de peptides amyloïdes et par des dégénérescences neurofibrillaires constituées majoritairement de protéines Tau hyperphosphorylées (figure 4.6).

Il existe actuellement trois principaux biomarqueurs moléculaires de la maladie d'Alzheimer dans le LCR : la protéine Tau totale, la protéine Tau hyperphosphorylée et le peptide β amyloïde. Le dosage des biomarqueurs dans le LCR se fait après ponction lombaire selon plusieurs techniques. Les méthodes immunoenzymatiques reposant sur l'ELISA sont de loin les plus utilisées.

La protéine Tau est une protéine phosphorylée du cytosquelette responsable de la polymérisation et de la stabilisation des microtubules. Du fait de ses propriétés, elle est impliquée, à l'état physiologique, dans la plasticité neuronale. Dans le LCR, le taux de protéine Tau s'élève au cours du vieillissement normal et reflète donc la lyse neuronale. Le taux de protéine Tau totale est élevé dans le LCR de personnes atteintes de maladie d'Alzheimer. Ceci est lié soit directement à la dégénérescence neurofibrillaire (DNF), soit à la lyse neuronale. Dans la maladie d'Alzheimer, la dégénérescence neurofibrillaire est due à l'hyperphosphorylation anormale de Tau qui sous sa forme phosphorylée, perd ses fonctions de liaison aux microtubules et s'agrège en filaments [47].

La phosphorylation de la protéine Tau peut se faire sur différents sites (thréonine 181, thréonine 231, sérine 235 et 199 et 396). En fonction de l'acide aminé qui est hyperphosphorylé, les agrégats forment différents types de lésions définissant plusieurs cadres nosographiques telle que la dégénérescence neurofibrillaire dans le cas de la MA.

Par ailleurs, dans la maladie d'Alzheimer, les peptides amyloïdes, particulièrement les peptides $a\beta$ 1-42 s'agrègent et se déposent pour former des plaques amyloïdes extracellulaires. Ce dépôt en plaques diffuses serait responsable d'une activation microgliale et astrocytaire, puis d'une réponse inflammatoire et d'un stress oxydatif qui altérerait ensuite les activités enzymatiques des kinases et phosphatases. Cette altération de l'activité kinase et phosphatase serait impliquée dans l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, et donc secondairement dans le développement de la DNF. Le tau du peptide $a\beta$ 1-42 est très abaissé dans le cas de la maladie d'Alzheimer. Cela a été démontré dans de nombreuses études avec une spécificité et une sensibilité supérieure à 80% permettant de différencier le malade du sujet

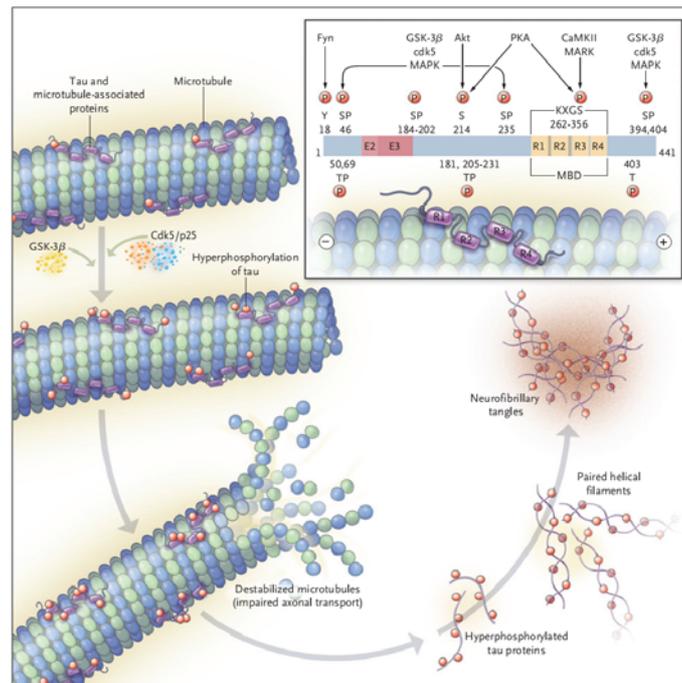


FIGURE 4.6 – Structure et fonctions de la protéine Tau [47].

sain [5].

4.5 Conclusion

La phosphorylation est une MPT importante qui régule plusieurs processus cellulaires d'où l'intérêt de son analyse. Bien que plusieurs techniques aient été développées pour analyser les protéines et peptides phosphorylés, cette tâche demeure relativement difficile compte tenu de la forte hétérogénéité de la phosphorylation aussi bien que sa faible abondance. C'est ainsi, que divers modes d'enrichissement de protéines et peptides phosphorylés ont été développés pour augmenter les sensibilités des analyses.

Bibliographie

- [1] Lennart Andersson and Jerker Porath. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe^{3+}) affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, 154(1) :250 – 254, 1986. (Cité en page 89.)
- [2] Giorgio Arrigoni, Svante Resjö, Fredrik Levander, Rebecka Nilsson, Eva Degerman, Manfredo Quadroni, Lorenzo A Pinna, and Peter James. Chemical derivatization of phosphoserine and phosphothreonine containing peptides to increase sensitivity for MALDI-based analysis and for selectivity of MS/MS analysis. *Proteomics*, 6(3) :757–766, February 2006. PMID : 16372258. (Cité en page 95.)
- [3] Uma K. Aryal and Andrew R. S. Ross. Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(2) :219–231, 2010. (Cité en page 90.)
- [4] Mohamed Azarkan, Joelle Huet, Danielle Baeyens-Volant, Yvan Looze, and Guy Vandebussche. Affinity chromatography : A useful tool in proteomics studies. *Journal of Chromatography B*, 849(1-2) :81–90, April 2007. (Cité en page 89.)
- [5] Kaj Blennow. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for alzheimer’s disease. *Neurotherapeutics*, 1(2) :213–225, 2004. (Cité en page 97.)
- [6] Helena Block, Barbara Maertens, Anne Spriestersbach, Nicole Brinker, Jan Kubicek, Roland Fabis, Jorg Labahn, Frank Schafer, Richard R. Burgess, and Murray P. Deutscher. Chapter 27 immobilized-metal affinity chromatography (IMAC) : a review. In *Guide to Protein Purification, 2nd Edition*, volume Volume 463, pages 439–473. Academic Press, 2009. (Cité en page 89.)
- [7] Montserrat Carrascal, David Ovelheiro, Vanessa Casas, Marina Gay, and Joaquin Abian. Phosphorylation analysis of primary human t lymphocytes using sequential IMAC and titanium oxide enrichment. *Journal of Proteome Research*, 7(12) :5167–5176, 2008. PMID : 18986192. (Cité en page 91.)
- [8] Philip Cohen. The role of protein phosphorylation in human health and disease. *European Journal of Biochemistry*, 268(19) :5001–5010, 2001. (Cité en page 89.)
- [9] Mark O. Collins, Lu Yu, and Jyoti S. Choudhary. Analysis of protein phosphorylation on a proteome-scale. *PROTEOMICS*, 7(16) :2751–2768, 2007. (Cité en page 89.)
- [10] Chiara D’Ambrosio, Simona Arena, Gabriella Fulcoli, Meir H Scheinfeld, Dawang Zhou, Luciano D’Adamio, and Andrea Scaloni. Hyperphosphorylation of JNK-interacting protein 1, a protein associated with alzheimer disease. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 5(1) :97–113, January 2006. PMID : 16195223. (Cité en page 94.)
- [11] Marjo de Graauw, Paul Hensbergen, and Bob van de Water. Phospho-proteomic analysis of cellular signaling. *ELECTROPHORESIS*, 27(13) :2676–2686, 2006. (Cité en pages 88 et 89.)

- [12] Sergio de la Fuente van Bentem, Wieslawa I Mentzen, Alberto de la Fuente, and Heribert Hirt. Towards functional phosphoproteomics by mapping differential phosphorylation events in signaling networks. *Proteomics*, 8(21) :4453–4465, November 2008. PMID : 18972525. (Cité en page 89.)
- [13] Frédéric Delom and Eric Chevet. Phosphoprotein analysis : from proteins to proteomes. *Proteome Science*, 4(1) :15, July 2006. (Cité en page 89.)
- [14] Zhiping Deng, Shuolei Bu, and Zhi-Yong Wang. Quantitative analysis of protein phosphorylation using two-dimensional difference gel electrophoresis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 876 :47–66, 2012. PMID : 22576085. (Cité en page 89.)
- [15] Jing Dong, Houjiang Zhou, Renan Wu, Mingliang Ye, and Hanfa Zou. Specific capture of phosphopeptides by zr4+-modified monolithic capillary column. *Journal of Separation Science*, 30(17) :2917–2923, 2007. (Cité en pages 90, 106 et 109.)
- [16] Jamie D. Dunn, Gavin E. Reid, and Merlin L. Bruening. Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 29(1) :29–54, 2010. (Cité en page 89.)
- [17] Beate Eyrich, Albert Sickmann, and René Peiman Zahedi. Catch me if you can : mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies. *Proteomics*, 11(4) :554–570, February 2011. PMID : 21226000. (Cité en page 89.)
- [18] Jan Fila and David Honys. Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino acids*, October 2011. PMID : 22002794. (Cité en page 89.)
- [19] V Gaberc-Porekar and V Menart. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1-3) :335–360, October 2001. PMID : 11694288. (Cité en page 89.)
- [20] Jan Gropengiesser, Balamurugan T Varadarajan, Heike Stephanowitz, and Eberhard Krause. The relative influence of phosphorylation and methylation on responsiveness of peptides to MALDI and ESI mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS*, 44(5) :821–831, May 2009. PMID : 19301359. (Cité en pages 93 et 94.)
- [21] Albrecht Gruhler, Jesper V. Olsen, Shabaz Mohammed, Peter Mortensen, Nils J. Faergeman, Matthias Mann, and Ole N. Jensen. Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(3) :310–327, March 2005. (Cité en page 95.)
- [22] Guanghui Han, Mingliang Ye, and Hanfa Zou. Development of phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteome analysis. *The Analyst*, 133(9) :1128, 2008. (Cité en page 89.)
- [23] Hui-Ching Hsieh, Calvin Sheu, Fong-Ku Shi, and Ding-Tzai Li. Development of a titanium dioxide nanoparticle pipette-tip for the selective enrichment of phosphorylated peptides. *Journal of Chromatography A*, 1165(1-2) :128 – 135, 2007. (Cité en page 90.)

- [24] Qin Hu, Shaoqiang Hu, Zhenyang Zhang, Ximin Zhou, Shanshan Yang, Yuan Zhang, and Xinguo Chen. Fe³⁺-immobilized nanoparticle-modified capillary for capillary electrophoretic separation of phosphoproteins and non-phosphoproteins. *ELECTROPHORESIS*, 32(20) :2867–2873, 2011. (Cité en page 92.)
- [25] Anton B. Iliuk, Victoria A. Martin, Bethany M. Alicie, Robert L. Geahlen, and W. Andy Tao. In-depth analyses of kinase-dependent tyrosine phosphoproteomes based on metal ion-functionalized soluble nanopolymers. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(10) :2162–2172, 2010. (Cité en page 91.)
- [26] Min Jia, Kah Wai, and Serhiy Souchelnyskyi. Phosphoproteomics : Detection, identification and importance of protein phosphorylation. In Hon-Chiu Leung, editor, *Integrative Proteomics*. InTech, February 2012. (Cité en page 89.)
- [27] Sven Kjellström and Ole Norregaard Jensen. Phosphoric acid as a matrix additive for MALDI MS analysis of phosphopeptides and phosphoproteins. *Analytical chemistry*, 76(17) :5109–5117, September 2004. PMID : 15373450. (Cité en page 94.)
- [28] Clementine Klemm, Stephan Schröder, Matthias Glückmann, Michael Beyermann, and Eberhard Krause. Derivatization of phosphorylated peptides with s- and n-nucleophiles for enhanced ionization efficiency in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 18(22) :2697–2705, 2004. PMID : 15487013. (Cité en page 95.)
- [29] Hiroki Kuyama, Kazuhiro Sonomura, and Osamu Nishimura. Sensitive detection of phosphopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry : use of alkylphosphonic acids as matrix additives. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 22(8) :1109–1116, April 2008. PMID : 18335463. (Cité en page 94.)
- [30] Hye Kyong Kweon and Kristina Hakansson. Selective zirconium Dioxide-Based enrichment of phosphorylated peptides for mass spectrometric analysis. *Analytical Chemistry*, 78(6) :1743–1749, 2006. (Cité en page 90.)
- [31] Martin R. Larsen, Tine E. Thingholm, Ole N. Jensen, Peter Roepstorff, and Thomas J. D. Jørgensen. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(7) :873–886, 2005. (Cité en page 90.)
- [32] Iulia M. Lazar. Recent advances in capillary and microfluidic platforms with MS detection for the analysis of phosphoproteins. *ELECTROPHORESIS*, 30(1) :262–275, 2009. (Cité en page 89.)
- [33] Alexander Leitner. Phosphopeptide enrichment using metal oxide affinity chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(2) :177 – 185, 2010. (Cité en page 90.)

- [34] Alexander Leitner, Martin Sturm, and Wolfgang Lindner. Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules : A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1) :19–30, October 2011. (Cité en page 89.)
- [35] Francesco Lonardoni and Alessandra Maria. Phosphoproteomics. In Rizwan Ahmad, editor, *Protein Purification*. InTech, January 2012. (Cité en page 89.)
- [36] Elena Lopez, Isabel Lopez, Antonio Ferreira, and Julia Sequi. Clinical and technical phosphoproteomic research. *Proteome Science*, 9(1) :27, June 2011. (Cité en page 89.)
- [37] Elena Lopez, Rune Matthiesen, Isabel Lopez, Keith Ashman, Jesus Mendieta, Jan-Jaap Wesselink, Paulino Gomez-Puertas, and Antonio Ferreira. Functional phosphoproteomics for current immunology research. *Journal of Integrated OMICS*, 1(1), February 2011. (Cité en page 89.)
- [38] Matthias Mann, Shao En Ong, Mads Granborg, Hanno Steen, Ole N Jensen, and Akhilesh Pandey. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry : deciphering the phosphoproteome. *Trends in Biotechnology*, 20(6) :261–268, June 2002. PMID : 12007495. (Cité en page 95.)
- [39] Sandra Morandell, Taras Stasyk, Karin Grosstessner-Hain, Elisabeth Roitinger, Karl Mechtler, Guenther K Bonn, and Lukas A Huber. Phosphoproteomics strategies for the functional analysis of signal transduction. *Proteomics*, 6(14) :4047–4056, July 2006. PMID : 16791829. (Cité en page 89.)
- [40] Yasmine M Ndassa, Chris Orsi, Jarrod A Marto, She Chen, and Mark M Ross. Improved immobilized metal affinity chromatography for large-scale phosphoproteomics applications. *Journal of proteome research*, 5(10) :2789–2799, October 2006. PMID : 17022650. (Cité en page 89.)
- [41] David C. A. Neville, R. Reid Townsend, Christine R. Rozanas, A. S. Verkman, Elmer M. Price, and Darren B. Gruis. Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using a novel metal-ion affinity resin and matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Protein Science*, 6(11) :2436–2445, 1997. (Cité en page 90.)
- [42] Carol L. Nilsson. Advances in quantitative phosphoproteomics. *Analytical Chemistry*, 84(2) :735–746, 2011. (Cité en page 89.)
- [43] Aleksandra Nita-Lazar, Hideshiro Saito-Benz, and Forest M. White. Quantitative phosphoproteomics by mass spectrometry : Past, present, and future. *PROTEOMICS*, 8(21) :4433–4443, 2008. (Cité en page 89.)
- [44] Alberto Paradela and Juan Pablo Albar. Advances in the analysis of protein phosphorylation. *Journal of Proteome Research*, 7(5) :1809–1818, 2008. (Cité en page 89.)
- [45] Leo L. Bonilla ;Gary G. Means ;Kimberly K. Lee ;Scott S. Patterson. The evolution of tools for protein phosphorylation site analysis : from discovery to clinical application. *Biotechniques*, 44(5) :671, April 2008. The importance of the analysis of signaling pathways has been proven for many years by the elucidation of key signaling molecules. Ho. (Cité en page 89.)

- [46] Matthew C. Posewitz and Paul Tempst. Immobilized Gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Analytical Chemistry*, 71(14) :2883–2892, 1999. (Cité en pages 90 et 148.)
- [47] Henry W Querfurth and Frank M LaFerla. Alzheimer’s disease. *The New England Journal of Medicine*, 362(4) :329–344, January 2010. PMID : 20107219. (Cité en pages 96 et 97.)
- [48] Christof Rampitsch, Rajagopal Subramaniam, Slavica Djuric-Ciganovic, and Natalia V. Bykova. The phosphoproteome of fusarium graminearum at the onset of nitrogen starvation. *PROTEOMICS*, 10(1) :124–140, 2010. (Cité en page 91.)
- [49] Katrin Schmelzle and Forest M White. Phosphoproteomic approaches to elucidate cellular signaling networks. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4) :406–414, August 2006. (Cité en page 89.)
- [50] Stefan R. Schmidt, Fritz Schweikart, and Martin E. Andersson. Current methods for phosphoprotein isolation and enrichment. *Journal of Chromatography B*, 849(1-2) :154–162, April 2007. (Cité en page 89.)
- [51] Mitsuya Shiraishi, Rodger D. Loutzenhiser, and Michael P. Walsh. A highly sensitive method for quantification of myosin light chain phosphorylation by capillary isoelectric focusing with laser-induced fluorescence detection. *ELECTROPHORESIS*, 26(3) :571–580, 2005. (Cité en pages 92 et 94.)
- [52] K. Strupat, M. Karas, and F. Hillenkamp. 2,5-dihydroxybenzoic acid : a new matrix for laser desorption/ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 111(0) :89–102, December 1991. (Cité en page 94.)
- [53] Tine E Thingholm, Ole N Jensen, and Martin R Larsen. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics*, 9(6) :1451–1468, March 2009. PMID : 19235172. (Cité en page 89.)
- [54] Tine E. Thingholm, Ole N. Jensen, and Martin R. Larsen. Analytical strategies for phosphoproteomics. *PROTEOMICS*, 9(6) :1451–1468, 2009. (Cité en page 90.)
- [55] Tine E. Thingholm, Ole N. Jensen, Phillip J. Robinson, and Martin R. Larsen. SIMAC (Sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(4) :661–671, April 2008. (Cité en page 91.)
- [56] Andreas Tholey and Elmar Heinzle. Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 386(1) :24–37, September 2006. PMID : 16830111. (Cité en page 94.)
- [57] Hiroki Tsumoto, Moonjin Ra, Keijiro Samejima, Ryo Taguchi, and Kohfuku Kohda. Chemical derivatization of peptides containing phosphorylated serine/threonine for efficient ionization and quantification in matrix-assisted laser

- desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 22(7) :965–972, April 2008. PMID : 18320539. (Cité en page 95.)
- [58] Fangjun Wang, Chunxia Song, Kai Cheng, Xinning Jiang, Mingliang Ye, and Hanfa Zou. Perspectives of comprehensive phosphoproteome analysis using shotgun strategy. *Analytical Chemistry*, 83(21) :8078–8085, 2011. (Cité en page 89.)
- [59] Roza Wojcik, Michael Vannatta, and Norman J. Dovichi. Automated Enzyme-Based diagonal capillary electrophoresis : Application to phosphopeptide characterization. *Anal. Chem.*, 82(4) :1564–1567, 2010. (Cité en page 93.)
- [60] Florian Wolschin, Stefanie Wienkoop, and Wolfram Weckwerth. Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). *PROTEOMICS*, 5(17) :4389–4397, 2005. (Cité en page 91.)
- [61] Ying-Qing Yu, Jennifer Fournier, Martin Gilar, and John C. Gebler. Phosphopeptide enrichment using microscale titanium dioxide solid phase extraction. *Journal of Separation Science*, 32(8) :1189–1199, 2009. (Cité en page 89.)
- [62] Yonghao Yu, Adam J. Hoffhines, Kevin L. Moore, and Julie A. Leary. Determination of the sites of tyrosine o-sulfation in peptides and proteins. *Nature Methods*, 4(7) :583–588, July 2007. (Cité en page 94.)
- [63] Houjiang Zhou, Ruijun Tian, Mingliang Ye, Songyun Xu, Shun Feng, Chen-song Pan, Xiaogang Jiang, Xin Li, and Hanfa Zou. Highly specific enrichment of phosphopeptides by zirconium dioxide nanoparticles for phosphoproteome analysis. *ELECTROPHORESIS*, 28(13) :2201–2215, 2007. (Cité en page 90.)
- [64] Houjiang Zhou, Mingliang Ye, Jing Dong, Guanghui Han, Xinning Jiang, Renan Wu, and Hanfa Zou. Specific phosphopeptide enrichment with immobilized titanium ion affinity chromatography adsorbent for phosphoproteome analysis. *Journal of Proteome Research*, 7(9) :3957–3967, 2008. (Cité en pages 90, 106, 109 et 140.)

Synthèse et caractérisation du monolithe organique EGMP-co-BAA en format capillaire

5.1 Introduction

La synthèse d'un monolithe organique met en jeu la copolymérisation d'un ou plusieurs monomère(s) fonctionnel(s) avec un agent réticulant en présence d'un porogène et d'un amorceur. La polymérisation d'un monolithe peut se faire selon plusieurs modes, dont le plus répandu est celui de la polymérisation radicalaire. Celle-ci peut être réalisée par voie thermique ou photochimique.

L'initiation par voie thermique est la plus facile à mettre en œuvre. Cependant, ce mode d'initiation présente un inconvénient majeur dû à la durée de polymérisation relativement importante de cette voie. Elle est également difficile à effectuer de manière localisée et particulièrement dans les microsystèmes. En effet, il est pratiquement impossible de placer uniquement une partie d'un microsystème dans un bain marie pour permettre une polymérisation localisée du monolithe. Ce type d'initiation est aussi incompatible avec certains agents porogènes, surtout les solvants de faible poids moléculaire tels que les alcools à courtes chaînes aliphatiques car ceux-ci possèdent de faibles températures d'ébullition. Dans certains cas, l'initiation par voie thermique peut être à l'origine de fissures dans le monolithe.

En revanche, dans le cas d'initiation par voie photochimique, une plus large gamme de solvants peut être utilisée comme agent porogène même ceux ayant les plus faibles températures d'ébullition[7]. Un des avantages de ce type d'initiation est la possibilité de réaliser un contrôle spatial de la polymérisation permettant ainsi une polymérisation aisée dans un canal de microsystème tout en évitant que la polymérisation ne s'étale sur toute la longueur de celui-ci. Ce mode d'initiation est généralement réalisé sous irradiations UV à 365nm. Ce mode d'amorçage est donc limité à l'utilisation de supports de polymérisation transparents aux irradiations UV et ayant de faibles épaisseurs. Ceci s'explique par le fait que l'épaisseur des chaînes de polymérisation devient de plus en plus importante au fur et à mesure de l'avancement de la réaction et le mélange réactionnel de plus en plus opaque ce qui ne permet pas aux irradiations UV de traverser le milieu avec suffisamment d'efficacité pour atteindre les solutions non encore polymérisées.

Compte-tenu des nombreux avantages de l'initiation des réactions de polymérisation par voie photochimique, celle-ci a été choisie au cours de ce travail pour réaliser la synthèse d'un monolithe organique à base de l'éthylène glycol méthacrylate phosphate (EGMP) et de bis acrylamide (BAA). Plusieurs amorceurs peuvent être utilisés. Le plus fréquemment utilisé est le 2,2'-azobis-isobutyronitrile (AIBN). Il a été très souvent utilisé dans les réactions de polymérisation par voie thermique mais aussi pour initier des réactions de polymérisation sous rayonnement UV à 365nm.

Ce monolithe à base d'EGMP est destiné à servir comme support solide de préconcentration de phosphopeptides par chromatographie d'affinité de type IMAC en microsysteme. Un monolithe similaire a été auparavant synthétisé pour la préconcentration de phosphopeptides [3, 9]. Cependant, il a été synthétisé en utilisant le mode d'initiation thermique.

Ainsi, dans le but de réaliser ce monolithe dans un canal de microsysteme de $50\mu\text{m}$ de diamètre et en utilisant le mode d'initiation par voie photochimique, il a été indispensable d'optimiser un certain nombre de paramètres essentiels pour sa synthèse, principalement les rapports monomère/agent réticulant et monomère/porogène ainsi que l'énergie d'irradiation à 365nm. La composition de base de la solution à polymériser ainsi que la méthode employée ont, en effet, un impact sur de nombreuses caractéristiques du monolithe obtenu. Celles-ci doivent être compatibles avec l'utilisation du monolithe pour une application de préconcentration. Il doit, en premier lieu, être parfaitement homogène, permettre un bon écoulement de l'échantillon entre ses micropores et mésopores et avoir une large surface spécifique favorisant les interactions entre le monolithe et les différents analytes à préconcentrer.

Au cours de ce chapitre, nous présentons en premier lieu les étapes d'optimisation de la synthèse du monolithe dans les capillaires en silice de $75\mu\text{m}$ de diamètre interne en termes de compositions chimiques et d'énergie d'irradiation ainsi que les caractérisations rapides que nous avons effectuées afin de comparer la qualité des différents monolithes synthétisés (morphologie, perméabilité). L'optimisation de la synthèse du monolithe a été réalisée en format capillaire pour simplifier les étapes de caractérisation. En effet, les microsystemes sont relativement coûteux et ne permettent pas une caractérisation facile du monolithe synthétisé. Une caractérisation plus approfondie (porosité, surface spécifique) de la colonne monolithique retenue est présentée en deuxième partie.

5.2 Matériels et méthodes

5.2.1 Préparation du monolithe en capillaire

Cette procédure comporte deux étapes fondamentales. La première correspond au traitement du capillaire par un réactif de silanisation et la deuxième à la polymérisation proprement dite du monolithe dans le capillaire.

5.2.1.1 Traitement des capillaires avec du γ -MAPS

Avant la polymérisation du monolithe, les capillaires doivent être traités avec un agent de silanisation afin de permettre au monolithe de s'accrocher de façon covalente à la paroi interne du capillaire. Les capillaires utilisés sont des capillaires flexibles en silice fondue (TSU, Polymicro Technologies) de diamètre interne de $75\mu\text{m}$ et de diamètre externe de $375\mu\text{m}$. Ces capillaires se caractérisent par leur transparence aux UV et permettent ainsi la polymérisation photochimique du monolithe. Étant donné que le protocole de traitement du capillaire est relativement long, nous avons décidé de traiter une longueur importante pouvant aller jusqu'à 2 mètres du capillaire puis de le découper ensuite en morceau de 15 cm prêts à être utilisés. Les capillaires traités, rincés à l'eau puis séchés à l'azote sont bouchés et conservés à 8°C à l'abri de la lumière. Le protocole de traitement du capillaire avec le γ -MAPS est détaillé en annexe A.

5.2.1.2 Synthèse du monolithe

La préparation des colonnes monolithiques est réalisée par remplissage des capillaires de 15 cm de longueur prétraités au γ -MAPS avec le mélange de polymérisation suivie d'un amorçage photochimique à 365nm. Ce mélange réactionnel de polymérisation est constitué d'EGMP comme monomère, de BAA comme agent réticulant, d'un porogène tertiaire composé de diméthylsulfoxyde (DMSO), du dodecanol et de N, N'-diméthylméthanamide (DMF). L'initiateur utilisé est l'AIBN. Ce dernier est présent dans le mélange réactionnel à une teneur massique égale à 1% de la masse totale du monomère. La réaction de polymérisation du monolithe EGMP-co-BAA est détaillée dans la figure 5.1. La préparation de la solution de polymérisation ainsi que le remplissage des capillaires au moyen d'un nanobaume sont détaillés en annexe B. Le monolithe est synthétisé sur toute la longueur du capillaire de 15 cm.

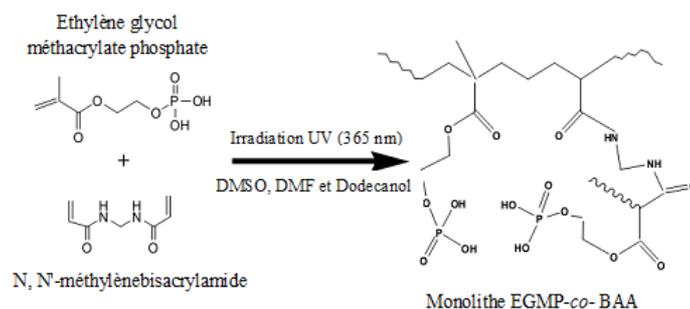


FIGURE 5.1 – Réaction de polymérisation du monolithe EGMP-co-BAA

5.2.2 Caractérisation du monolithe

Afin de déterminer si le monolithe obtenu possède les propriétés attendues, un certain nombre de caractérisations ont été mises en œuvre, principalement pour

évaluer la morphologie et la perméabilité des monolithes.

5.2.2.1 Morphologie du monolithe

La morphologie est une caractéristique très importante d'un monolithe. Elle est généralement dépendante de la composition du monolithe ainsi que la proportion de chacun de ses constituants. Elle est étudiée par des clichés de microscopie électronique à balayage (MEB). Ceux ci ont été obtenus grâce à un microscope HITACHI 3600N à pression variable et ont été réalisés au sein de la Centrale de Technologie Universitaire (CTU) de l'institut d'Electronique Fondamentale (IEF) d'Orsay. En effet, les capillaires contenant le monolithe sont découpés par des coups secs puis métallisés par un dépôt de silicium pendant 60 secondes. Les clichés MEB sont réalisés à différents agrandissements afin de pouvoir évaluer au mieux la morphologie des monolithes.

5.2.2.2 Perméabilité du monolithe

La perméabilité des différentes colonnes monolithiques préparées au cours de ce travail a été mesurée par μ -LC à la plateforme protéomique "TRANS-PROT" de Châtenay Malabry. Il s'agit de faire circuler une phase mobile, de l'eau dans notre cas, dans la colonne monolithique à différents débits entre 0,7 et 5 μ L/min et de relever la perte de charge (ΔP) entre les extrémités de la colonne monolithique, qui est directement liée à la structure poreuse du monolithe.

Au cours de cette étude, la détermination de la perméabilité B_0 est basée sur l'application de la loi de Darcy donnée par la relation 5.1

$$B_0 = \frac{\eta L Q}{A \Delta P} \quad (5.1)$$

où η représente la viscosité dynamique de la phase mobile, L la longueur contenant le monolithe, Q le débit de l'éluant, ΔP la perte de charge et A la section de la colonne. Dans notre cas, la section des colonnes monolithiques est égale à $4,41 \cdot 10^3 \mu m^2$. La composition de la phase mobile utilisée pour réaliser la mesure est de 100% de l'eau. La viscosité est égale donc à $0,896 \text{ mPa.s}$ à $20^\circ C$.

5.2.2.3 Autres caractérisations

La colonne monolithique, choisie selon sa morphologie et sa perméabilité, a été par la suite caractérisée de manière plus approfondie en déterminant sa surface spécifique ainsi que sa porosité. Ces deux caractérisations ont été réalisées au sein de l'Equipe Systèmes Polymères complexes, ICMPE UMR CNRS 7182 Thiais, par Mr. Mohamed GUERROUCHE. Un échantillon macroscopique (environ 2mL du mélange) dans un pilulier a été alors préparé par irradiation aux UV à 365 nm pendant 3h. Une extraction au méthanol par un soxhlet a été ensuite réalisée pendant une nuit puis le monolithe est séché sous vide. Les mesures de la surface spécifique ainsi

que des diamètres moyens des pores ont été réalisées par la méthode d'adsorption d'azote (B.E.T) à l'aide d'un Quantachrome Instruments (Autosorb iQ Station 1) sur un échantillon de masse égale à 0,0472 g en utilisant l'azote. Par ailleurs, la porosité du monolithe a été mesurée par un porosimètre au mercure de type Micromeritics AutoPore IV 9500 porosimeter.

5.3 Résultats et discussions

5.3.1 Mise au point de la synthèse du monolithe

L'optimisation de la synthèse du monolithe EGMP-co-BAA a été réalisée dans un premier temps en format capillaire afin de faciliter leur caractérisation ultérieure. Nous avons toutefois conservé des dimensions de capillaires ($75\mu\text{m}$ ID) voisins de celles des canaux des microsystèmes ($50\mu\text{m}$ ID).

5.3.1.1 Activation de la paroi du capillaire en silice

La synthèse de monolithe en format capillaire nécessite une étape préliminaire d'activation de la paroi interne du capillaire via une modification chimique des groupements silanols présents à sa surface par le γ -MAPS. Il s'agit d'un silane insaturé. Il est l'agent de silanisation le plus utilisé dans la littérature. L'emploi de ce réactif permet de relier le polymère à la paroi du tube par des ponts siloxanes Si-O-Si-C. Cet agent de fonctionnalisation réagit en premier lieu via ses groupements méthoxy avec les groupements silanols de la surface du capillaire puis avec le polymère en croissance dans le capillaire sous l'effet des irradiations UV. Ainsi, ce prétraitement permet l'obtention d'un monolithe covalentement attaché à la surface du capillaire sans aucun espace indésirable entre la paroi interne du capillaire en silice et le monolithe synthétisé. Cette étape de prétraitement est indispensable afin de permettre l'ancrage efficace du monolithe à la surface interne du capillaire, car elle permet d'éviter tout décrochage du monolithe de la surface du capillaire notamment lors des étapes suivantes de rinçage sous pression ou encore l'application d'un champ électrique [2, 4].

Plusieurs protocoles de traitement des capillaires avec le γ -MAPS ont été décrits dans la littérature [9, 6, 8, 3], celui que nous avons utilisé au cours de cette étude a été adapté à partir de ces références.

5.3.1.2 Optimisation du mélange de polymérisation

La synthèse d'un monolithe à base d'EGMP-co-BAA a été reportée dans la littérature pour son utilisation en tant que module de préconcentration de phosphoprotéines par IMAC en format capillaire [9, 3]. Cependant, désirent employer une voie de polymérisation différente, nous avons re-optimisé la composition chimique en termes de rapports Monomère/Agent réticulant (EGMP/BAA) et Monomère/Porogène (EGMP/P) afin de déterminer la proportion la plus favorable de chaque composé pour notre application. Nous avons également optimisé l'énergie

d'irradiation à 365nm allant de 2 à 12 Joules. Ainsi, plus de 50 colonnes monolithiques ont été préparées en variant les différents rapports cités précédemment ainsi que l'énergie d'irradiation. Une simple observation au microscope optique a permis une présélection des colonnes monolithiques. En effet, nous avons remarqué que la présence du mélange tertiaire du porogène en forte proportion par rapport à celle du monomère ne permet pas la polymérisation d'un monolithe quelle que soit l'énergie d'irradiation utilisée.

Par ailleurs, la polymérisation n'a pas pu avoir lieu lorsque les énergies utilisées sont en dessous de 4 Joules. Cependant, lorsque celles-ci sont au dessus de 10 Joules, nous avons observé au microscope optique une formation non homogène du monolithe présentant plusieurs trous vides sur toute la longueur de la colonne.

Ces différentes observations nous ont permis de sélectionner 15 colonnes monolithiques dont le détail est présenté dans le tableau 5.1. Les différents rapports indiqués ainsi que les valeurs des énergies d'irradiation comprises entre 4 et 8 joules ont permis une polymérisation du monolithe dans les capillaires, polymérisation confirmée par des observations optiques.

Tableau 5.1 – Différentes colonnes monolithiques préparées dans le cadre de l'optimisation de la composition du monolithe et de son énergie de polymérisation

Colonne monolithique	Rapport EGMP/BAA	Rapport EGMP/P	Energie d'irradiation (J)
Mn1	1,3/1	1/10	8
Mn2	1,3/1	1/10	4
Mn3	1,3/1	1/10	6
Mn4	1,3/1	1/8	8
Mn5	1,3/1	1/8	6
Mn6	2,6/1	1/10	8
Mn7	2,6/1	1/10	6
Mn8	1,8/1	1/8	6
Mn9	1,8/1	1/10	6
Mn10	1,8/1	1/10	8
Mn11	3,2/1	1/10	6
Mn12	3,2/1	1/10	8
Mn13	3,2/1	1/15	8
Mn14	3,6/1	1/15	6
Mn15	3,6/1	1/15	8

Ainsi, la caractérisation des monolithes Mn1 à Mn15 a été menée notamment en s'intéressant à leur morphologie, en se basant sur les photos de microscopie électronique mais aussi sur des mesures de perméabilité. Le monolithe sélectionné parmi les 15 retenus en premier lieu sur la base de ces deux critères a été par la suite caractérisé de manière plus approfondie par la détermination de sa surface spécifique et de son diamètre moyen des pores.

Les clichés MEB obtenus ont permis d'une part, de valider la polymérisation du monolithe dans les 15 colonnes présélectionnées et, d'autre part, de déterminer

quels étaient les meilleurs rapports EGMP/BAA et EGMP/Porogène ainsi que la meilleure énergie d'irradiation. Ainsi, nous avons écarté toutes les compositions donnant lieu à des monolithes trop compacts, par exemple, ou mal polymérisés. En effet, lorsque l'on utilise une proportion trop élevée de monomère par rapport à celle du porogène, on obtient un monolithe très compact, polymérisé sur une partie seulement de la section du capillaire. De même, lorsque la proportion de l'agent porogène est trop importante dans le mélange réactionnel en comparaison à celle des monomères, on a observé un monolithe inhomogène avec des macropores et mésopores très larges.

Les clichés MEB ont été pris à plusieurs niveaux de la colonne monolithique afin de pouvoir évaluer l'homogénéité du monolithe synthétisé. La figure 5.2 montre une image de microscopie électronique d'une section d'un capillaire présentant un monolithe parfaitement homogène obtenu dans les conditions Mn1 du tableau 5.1.

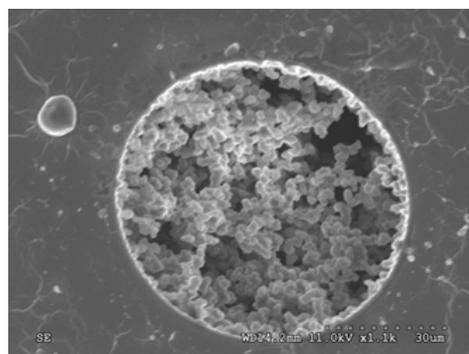


FIGURE 5.2 – Image MEB d'une coupe transversale du monolithe EGMP-co- BAA (Mn1)

L'imagerie MEB a également permis de visualiser l'accrochage du monolithe à la paroi interne du capillaire. La figure 5.3 représente deux clichés MEB du même monolithe synthétisé dans un capillaire sans traitement (Figure 5.3 (A)) et dans un autre prétraité avec du γ -MAPS (Figure 5.3 (B)). Le cliché de la figure 5.3(A) montre que le monolithe est décollé du capillaire en absence du traitement, ce qui n'est pas le cas lorsque le monolithe est polymérisé dans un capillaire traité auparavant. Ainsi, le traitement au γ -MAPS s'est révélé indispensable et ceci quelque soit le monolithe polymérisé.

La stabilité mécanique du monolithe est un paramètre important permettant d'évaluer le degré de résistance du monolithe à la pression ainsi qu'à l'application de champ électrique. Cette stabilité est évaluée en augmentant progressivement et par palier de 5 bars la pression de rinçage du monolithe par une solution de méthanol et en utilisant le nanobaume. Au cours de cette étape, nous avons vérifié à l'aide d'un microscope optique un déplacement éventuel du monolithe dans le capillaire sous l'effet de la pression. Nous avons ainsi remarqué que les monolithes présentant de forte proportion en agent porogène ne sont pas stables au-delà de 30 bars. En effet, ceci peut être expliqué par la morphologie du monolithe qui présente des macropores

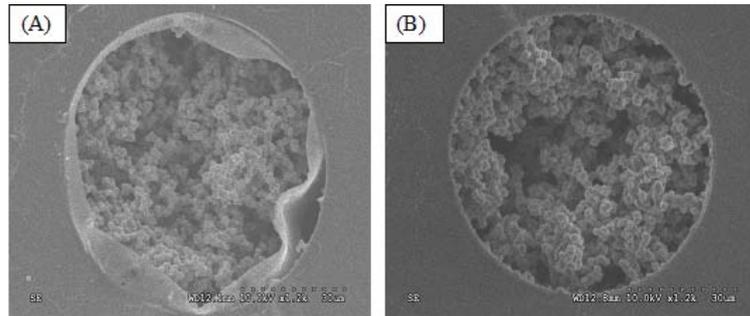


FIGURE 5.3 – Images MEB d’une coupe transversale du monolithe EGMP-co-BAA (Mn1) synthétisé dans un capillaire (A) non traité et (B) traité au γ -MAPS

et mésopores relativement larges et donc peuvent être facilement décrochés de la surface du capillaire sous l’effet de la pression de rinçage appliquée. Les colonnes dans lesquelles sont synthétisés des monolithes compacts sont, quant à elles, éjectées du nanaubaume sous l’effet de la pression et ne sont par ailleurs pas perméables.

Lors de cette étude, nous avons démontré que le monolithe EGMP-co-BAA Mn1 était stable jusqu’à une pression égale à 70 bars. A des pressions de rinçage plus élevées, le monolithe est décroché du capillaire.

La propriété hydrodynamique la plus importante d’un monolithe est sa perméabilité qui constitue une grandeur intrinsèque du support qui donne une information indispensable pour son utilisation ultérieure et qui est un bon indicateur de la structure du réseau poreux. La mesure de la perméabilité nous a permis de comparer les différents monolithes préparés.

Parmi les colonnes monolithiques présentées dans le tableau 5.1, nous avons sélectionné celles qui présentent la plus grande homogénéité à la suite de l’étude morphologique et qui étaient stables à l’application de la pression. Les mesures de perméabilité ont été alors effectuées seulement sur les monolithes ne générant pas une surpression au dessus de 70 bars lors du passage de l’eau à un débit de $5\mu\text{L}/\text{min}$. Ainsi, seules les colonnes Mn1 à Mn4 avaient cette caractéristique.

Les valeurs de la perméabilité obtenues pour les différentes colonnes monolithiques testées sont indiqués dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2 – Valeurs de perméabilité des différentes colonnes monolithiques ($L=15\text{cm}$, 25°C)

Colonne monolithique	Perméabilité $B_0(10^{-13}\text{m}^2)$
Mn1	3,16
Mn2	1,625
Mn3	1,97
Mn4	0,9

Les valeurs de perméabilité obtenues varient du simple au triple. Nous avons remarqué que les colonnes Mn4 et Mn3 présentaient un écoulement très faible par rap-

port à celui des colonnes Mn1 et Mn2 et donc ne sont pas suffisamment perméables. L'eau étant moins visqueuse que les tampons organiques utilisés en EC par exemple, ces valeurs de perméabilité obtenues ne sont pas satisfaisantes et pas adaptées pour notre application. Nous avons ainsi choisi la colonne Mn1 possédant une valeur de perméabilité de l'ordre de $3,16 \cdot 10^{-13} m^2$. Cette valeur est comprise dans la gamme de valeur indiquée dans la littérature pour des monolithes de préconcentration. C'est une perméabilité relativement modérée qui permet un bon écoulement de fluide à l'intérieur du monolithe. Il s'agit par ailleurs d'un monolithe qui a présenté une très bonne homogénéité et une stabilité à l'application de pression intéressante.

5.3.2 Caractérisation du monolithe retenu

A l'issue de l'étude morphologique, des caractérisations de perméabilité et de stabilité mécanique, c'est donc la colonne monolithique Mn1 que nous avons retenue. Afin de mieux connaître ses caractéristiques, nous avons évalué sa porosité et sa surface spécifique.

5.3.2.1 Porosité du monolithe

La figure 5.4 représente le profil de distribution des tailles des pores ainsi que du diamètre moyen des pores du monolithe choisi Mn1. On obtient ainsi une distribution monomodale. Le monolithe se caractérise par un diamètre moyen des pores de $0,8 \mu m$ et un volume poreux de $0,62 cm^3/g$.

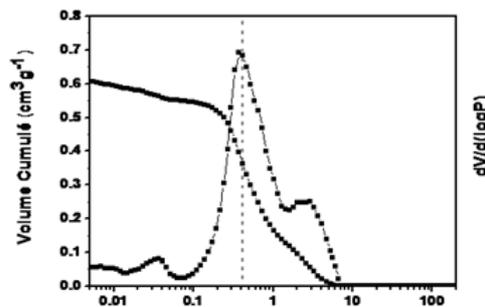


FIGURE 5.4 – Profil de la distribution des pores et du diamètre moyen des pores

5.3.2.2 Surface spécifique du monolithe

La surface spécifique (S_s) décrit la surface développée par les parois des pores. Dans le cas d'un monolithe destiné à une application de préconcentration, la surface spécifique permet d'évaluer l'importance des interactions entre la phase solide et les échantillons. C'est l'un des facteurs les plus importants pour l'extraction d'un analyte de la solution d'échantillon par SPE. La surface spécifique est inversement proportionnelle au diamètre moyen des pores.

La surface spécifique obtenue pour le monolithe Mn1 est égale à $34,085 \text{ m}^2/g$. Cette valeur est particulièrement intéressante pour un monolithe de préconcentration. Elle est par exemple nettement supérieure à celle obtenue par Armenta et al.[1] qui est égale à $4,8 \text{ m}^2/g$ et qui a permis une préconcentration des IgG du sérum humain avec un facteur d'enrichissement allant jusqu'à 65000. Dans ses publications, Svec a déclaré que les monolithes qui ont généralement des surfaces spécifiques allant de 5 à $20 \text{ m}^2/g$, sont considérées comme faibles pour être utiles en SPE [5]. De manière générale, les surfaces spécifiques annoncées dans plusieurs articles publiés sont inférieures à $50 \text{ m}^2/g$.

5.4 Conclusion

L'ensemble des caractérisations effectuées au cours de cette partie de mon travail a permis de retenir la colonne monolithique Mn1 pour la suite des études. En effet, ce monolithe présente les caractéristiques les plus adaptées pour son utilisation ultérieure en tant que phase solide de préconcentration de phosphopeptides par IMAC. D'un point de vue morphologique, ce monolithe est parfaitement homogène sur toute la section du capillaire. Il possède également une bonne stabilité à la pression (jusqu'à 70 bars) et une perméabilité à l'écoulement satisfaisante ($3,16 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2$). De plus, il se caractérise par une large surface spécifique égale à $34,085 \text{ m}^2/g$ qui est une propriété souhaitable pour un monolithe de préconcentration permettant une grande capacité de rétention des analytes de l'échantillon.

Bibliographie

- [1] Jenny M. Armenta, Binghe Gu, Paul H. Humble, Craig D. Thulin, and Milton L. Lee. Design and evaluation of a coupled monolithic preconcentrator-capillary zone electrophoresis system for the extraction of immunoglobulin g from human serum. *Journal of Chromatography A*, 1097(1-2) :171 – 178, 2005. (Cité en page 114.)
- [2] Julien Courtois, Michal Szumski, Emil Bystram, Agnieszka Iwasiewicz, Andrei Shchukarev, and Knut Irgum. A study of surface modification and anchoring techniques used in the preparation of monolithic microcolumns in fused silica capillaries. *Journal of Separation Science*, 29(1) :14–24, 2006. (Cité en page 109.)
- [3] Jing Dong, Houjiang Zhou, Renan Wu, Mingliang Ye, and Hanfa Zou. Specific capture of phosphopeptides by zr⁴⁺-modified monolithic capillary column. *Journal of Separation Science*, 30(17) :2917–2923, 2007. (Cité en pages 90, 106 et 109.)
- [4] Graham T.T. Gibson, Samuel M. Mugo, and Richard D. Oleschuk. Surface-mediated effects on porous polymer monolith formation within capillaries. *Polymer*, 49(13-14) :3084–3090, 2008. (Cité en page 109.)
- [5] Frantisek Svec. Less common applications of monoliths : preconcentration and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 841(1-2) :52–64, September 2006. PMID : 16650811. (Cité en page 114.)
- [6] Hui Wang, Jicheng Duan, Hongjiu Xu, Liang Zhao, Yu Liang, Yichu Shan, Lihua Zhang, Zhen Liang, and Yukui Zhang. Monoliths with immobilized zirconium ions for selective enrichment of phosphopeptides. *Journal of Separation Science*, 34(16-17) :2113–2121, 2011. (Cité en pages 73, 109 et 140.)
- [7] Cong Yu, Mingcheng Xu, Frantisek Svec, and Jean M. J. Frechet. Preparation of monolithic polymers with controlled porous properties for microfluidic chip applications using photoinitiated free-radical polymerization. *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, 40(6) :755–769, 2002. (Cité en pages 72, 73 et 105.)
- [8] Liyuan Zhang, Hui Wang, Zhen Liang, Kaiguang Yang, Lihua Zhang, and Yukui Zhang. Facile preparation of monolithic immobilized metal affinity chromatography capillary columns for selective enrichment of phosphopeptides. *Journal of Separation Science*, 34(16-17) :2122–2130, 2011. (Cité en pages 109 et 140.)
- [9] Houjiang Zhou, Mingliang Ye, Jing Dong, Guanghui Han, Xinning Jiang, Renan Wu, and Hanfa Zou. Specific phosphopeptide enrichment with immobilized titanium ion affinity chromatography adsorbent for phosphoproteome analysis. *Journal of Proteome Research*, 7(9) :3957–3967, 2008. (Cité en pages 90, 106, 109 et 140.)

Microfabrication des puces en PDMS et transposition de la synthèse du monolithe EGMP-co-BAA en microsystème

6.1 Introduction

Depuis une dizaine d'année, les dispositifs microfluidiques ont reçu beaucoup d'attention [20, 13, 2, 40, 4, 19, 10, 27], en raison de leurs avantages concurrentiels aux techniques traditionnelles, en particulier en ce qui concerne la réduction de la consommation d'échantillon et de réactifs, du temps d'analyse ainsi que l'automatisation accrue [12]. Typiquement, ces systèmes sont fabriqués à partir du silicium, du verre, de polymères, ou de la combinaison de ces matériaux. Une étude récente de Henares et al. [1] résume les avantages et les inconvénients de ces trois matériaux.

Lorsque l'on considère le coût et la durée de microfabrication des dispositifs microfluidiques, les polymères et élastomères sont de plus en plus attractifs. On peut par exemple citer le poly(styrène) [46], le poly(propylène) [46], le PVC [26], le poly(carbonate) [46, 8, 38], le poly(méthacrylate de méthyle) [8, 14, 24] et le PDMS [23, 41, 36, 33, 44, 49, 45, 28]. Parmi ceux-ci, le PDMS est de loin le matériau polymère le plus utilisé pour la microfluidique. Cela peut être attribué non seulement à ses principales caractéristiques, qui sont ses propriétés élastomères, sa biocompatibilité, sa transparence optique, sa facilité de moulage dans des structures submicrométriques, son inertie chimique relativement élevée, et ses faibles coûts de fabrication, mais également aux possibilités d'intégration de différents modules aux sein d'un seul et unique dispositif microfluidique tel que par exemple un module de préconcentration de l'échantillon en amont de l'étape de séparation et de détection.

En raison de ces nombreux avantages, l'électrophorèse capillaire en puce (MCE) a été développée comme une technique d'analyse robuste et largement utilisée dans l'industrie chimique, biochimique ou encore dans le domaine biomédical, agroalimentaire ou environnemental depuis l'apparition du micro-TAS [20, 13]. Toutefois, dans le cas de l'analyse d'analytes à faible concentration dans des matrices biologiques complexes, la MCE est souvent précédée par des procédures appropriées de prétraitement [2]. Diverses méthodes de prétraitement ont été développées dans des systèmes microfluidiques telles que la purification et la préconcentration [40, 4], la filtration [19], la digestion enzymatique [10, 27] et la culture cellulaire [12].

La microextraction en phase solide (SPME) a été introduite comme une excellente méthode de préconcentration et de purification d'échantillon compte tenu de sa grande sensibilité et de son automatisation relativement facile. [1, 46, 26] Les monolithes poreux à base de polymère (PPM) sont des supports solides largement utilisés en SPME compte-tenu de leur simplicité de synthèse et leurs grandes et diverses réactivités chimiques nécessaires pour la fonctionnalisation de surface [33, 44, 49]. Jusqu'à présent, l'incorporation de PPM dans les systèmes microfluidiques est quasiment restreinte aux puces fabriquées dans des matériaux rigides tels que le verre, le PMMA et le COC, dans lesquels le PPM peut être facilement polymérisé soit thermiquement soit photochimiquement. Le PDMS, pourtant largement employé [50], est rarement utilisé pour des systèmes intégrant un support monolithique organique.

La polymérisation in-situ des PPM organiques au sein d'un canal en PDMS natif reste toujours un défi, en raison de sa grande capacité d'absorption et son importante perméabilité à l'oxygène [3]. Depuis 2006, seuls quelques travaux ont décrit la photopolymérisation de PPM à l'intérieur de microcanaux en PDMS. Bedair et Oleschuk [3] ont synthétisé un monolithe poly(MA-EDMA) qui a été utilisé comme émetteur électrospray pour le couplage direct avec la spectrométrie de masse. Faure et al. [9] ont synthétisé in-situ dans un microsystème hybride PDMS-Verre un monolithe à base d'hexyl acrylate et de 1,3-butanediol diacrylate comme phase stationnaire pour la séparation électrochromatographique de catecholamines. Kang et al. [18] ont synthétisé un monolithe poly(MAA-co-EGDMA) qui a été utilisé comme support solide de microextraction de la dopamine en couplage avec l'électrophorèse. Très récemment, Burke et ses collaborateurs [5] ont réussi à synthétiser un monolithe à base de butyl méthacrylate au sein d'un microsystème en PDMS pour la préconcentration de cellules lymphocytes B. Dans ces travaux, le problème de polymérisation de monolithe dans les canaux de PDMS a été résolu par une seule approche fondée sur la modification de surface de PDMS par greffage photochimique de polymère (photografting) pour la rendre plus réactive dans le but de permettre un ancrage efficace du monolithe sur la paroi des canaux.

Dans ce chapitre, nous présentons dans une première partie les différentes étapes de microfabrication des microsystèmes en PDMS utilisés au cours de ce travail et les optimisations apportées, notamment pour la fabrication des masters et la mise au point de la fermeture des canaux. Nous développons dans une deuxième partie les différentes stratégies de traitement de surface des canaux en PDMS envisagées principalement pour rendre la surface du PDMS plus hydrophile afin de polymériser in-situ un monolithe organique à base d'EGMP et de BAA. C'est ainsi que nous avons essayé de faire face aux deux problèmes majeurs du PDMS, notamment son hydrophobie élevée et sa forte perméabilité à l'oxygène, qui ont été évoqués à plusieurs reprises dans la littérature pour expliquer la difficulté de la synthèse in-situ de monolithe.

6.2 Matériels et méthodes

6.2.1 Préparation des puces en PDMS

La préparation des puces en PDMS a été réalisée au sein de la CTU. Cette microfabrication repose sur plusieurs étapes à savoir l'enrésinement, l'insolation, le développement, le coulage et les recuits.

6.2.1.1 Fabrication des masters

Le dépôt de résine a été réalisée sous une hotte d'enrésinement des résines photosensibles à l'aide d'une tournette de type RC5 Karl Suss par "spincoating" (rotation à quelques milliers de tours par minute) sur un substrat plan et propre (type verre ou silicium). Les recuits ont été réalisés sur des plaques chauffantes (EMS). Les résines utilisées sont des résines négatives de Type SU8 (2100, 2002 et 3050) (Newton, États-Unis). L'insolation aux UV à 365nm est assurée en utilisant un aligneur double face (EVG 620). Les masques utilisés sont préparés par impression haute résolution sur papier transparent. Les motifs de ces masques sont dessinés par un logiciel de dessin TURBOCAD. La géométrie des masques utilisés ainsi que leurs dimensions sont présentés en annexe C. Le développement de la résine a été réalisé manuellement dans un bain de solvant approprié sous une hotte à flux laminaire dédiée au développement des résines photosensibles. Le contrôle des dimensions des motifs présents sur le master réalisé est assuré par un microscope optique de type Olympus muni d'un logiciel Analysis.

Pour la préparation des masters, nous avons utilisé deux protocoles différents. Un premier protocole I adapté des travaux de Xia et al. [42] que l'on a par la suite optimisé pour aboutir au protocole II de préparation des masters. En effet, dans le protocole I, la préparation des masters est relativement longue et nécessite plusieurs étapes :

- Nettoyage des substrats de verre à l'isopropanol pendant 4mn
- Dépôt, à l'aide de la tournette, de la première couche de résine SU8 2002. (500tr/min durant 20sec puis 3000tr/min durant 40sec)
- Recuit à 60°C (5min) puis à 90°C (25min)
- Insolation sans masque à 350mJ
- Recuit à 200°C durant 1h
- Dépôt de la deuxième couche de résine SU8 2100 (500tr/min durant 20sec puis 3000tr/min durant 40sec)
- Recuit à 60°C durant 5min puis à 90°C durant 25min
- Insolation, en mode soft contact, de la résine à 350mJ en utilisant le masque et le support adapté.
- Recuit final à 60°C durant 5min puis à 90°C durant 25min
- Développement pendant 12min dans un bain de "SU8 developer"
- Recuit final à 200°C durant 30min

Le protocole II de préparation de master, contrairement au premier, nécessite moins d'étape et donc moins de temps. Nous avons changé le type de résine et nous

avons utilisé une seule résine de type SU8 3050 au lieu de deux dans le protocole I ce qui a permis de minimiser le temps de préparation du master dans le protocole II final (1/2 journée). Par ailleurs, nous avons changé de substrat dans le protocole II et avons choisi de travailler avec des plaques de silicium au lieu des substrats en verre.

L'ensemble des étapes de la préparation du master selon le protocole II est résumé ici :

- Nettoyage des substrats de silicium avec un bain d'HF pendant 1min30 puis rinçage à l'eau déminéralisée.
- Dépôt, à l'aide de la tournette, de la résine SU8 3050. (500tr/min durant 10sec puis 2000tr/min durant 30sec)
- Recuit à $95^{\circ}C$ pendant 29sec.
- Insolation, en mode soft contact, à $300mJ/cm^2$ en utilisant le masque et le support adapté.
- Recuit à $65^{\circ}C$ pendant 1sec (apparition des premiers motifs), puis à $95^{\circ}C$ pendant 4sec.
- Développement pendant 7min dans un bain de "SU8 developer".

6.2.1.2 Fabrication des puces

Le coulage du PDMS : cette étape a été réalisée manuellement après avoir dégazé pendant 1h le PDMS mélangé avec son agent réticulant dans une proportion de l'ordre 10/1 (Sylgard 184, DOW CORNING, US) en utilisant une pompe à vide. Le mélange est par la suite coulé sur le master placé au fond d'un récipient et l'ensemble est placé au four, à $75^{\circ}C$ pendant 1h, pour permettre la réticulation. Le PDMS durcit et prend ainsi les formes du master et est finalement démoulé de son récipient. Les réservoirs sont par la suite percés manuellement à l'aide d'un tube en aluminium de 2mm de diamètre. Le support de la puce, appelé également capot, est préparé en coulant du PDMS non réticulé, à l'aide de la tournette, sur une plaque de verre (4000tr/mn durant 40s).

La fermeture des canaux : cette étape a été réalisée avec un appareil de plasma appelée délaqueur PICO, produit chez Plasma-Surface-Technology. Cette machine permet de générer un plasma d'oxygène. Selon qu'il s'agit d'une soudure irréversible, ou réversible, les paramètres de traitement par plasma d'oxygène ne sont pas les mêmes. Ainsi, selon le cas, on varie la pression d'oxygène, la puissance générée et le temps de traitement. Pour l'obtention d'une puce PDMS- PDMS irréversible, les deux surfaces de PDMS sont traitées par un plasma d'oxygène à une puissance de 80% pendant 1min à 0.4 mbar. Dans le cas d'une puce PDMS-PDMS réversible, les deux surfaces de PDMS sont traitées par un plasma d'oxygène à une puissance de 80% durant 12sec et à 0,7 mbar. Dans les deux cas, les deux surfaces sont alors oxydées et se soudent facilement de façon irréversible.

Le recuit de la puce : cette dernière étape de microfabrication, est réalisée en mettant la puce dans une étuve MEMMERT UE400 programmable à $75^{\circ}C$ pendant 1 heure.

6.2.2 Caractérisation des surfaces de PDMS

- Angle de contact : les mesures d'angle de contact pour caractériser la surface du PDMS ont été réalisées sur une surface plane en utilisant un instrument Dataphysics OCA20 (San Jose, USA).
- FTIR (Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier) : les mesures FTIR par réflexion en angle rasant ont été réalisées sur des surfaces de PDMS afin de pouvoir déterminer l'effet des traitements par plasma d'oxygène. L'acquisition des spectres a été réalisée avec un spectromètre de type Varian 670 IR utilisant une source MCT (Mercury Cadmium Telluride) refroidi à l'azote liquide, couplé à un microscope 620 optique/IR.

6.3 Résultats et discussions

L'utilisation du PDMS est devenue monnaie courante dans le domaine de la microfluidique et les méthodes de microfabrication des puces en PDMS sont largement décrites dans de nombreux articles [21, 30, 31, 7, 29] et ouvrages [11, 34].

6.3.1 Optimisation de la fabrication du master

Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord adopté le protocole I de microfabrication des puces PDMS-PDMS. Cependant, ce protocole présentait plusieurs inconvénients dont principalement la durée de préparation relativement longue (24h) et l'instabilité du master dans le temps. Afin de faire face à ces inconvénients, nous avons apporté quelques optimisations, notamment en modifiant le type de résine et de substrats utilisés et donc l'énergie d'insolation ainsi que les temps de recuits et de développement, qui ont, par la suite, mené au protocole II de microfabrication.

Dans le protocole I, la préparation du master a été réalisée en utilisant deux résines négatives SU8 2100 et 2002. Il s'agit de résines photosensibles couramment utilisées dans la fabrication de microsystèmes. C'est un polymère très visqueux qui peut être étalé sur une épaisseur allant de $1\mu\text{m}$ à 2mm. Ainsi, nous avons remarqué que l'utilisation de la SU8 2100 était très délicate. En effet, sa viscosité étant importante, nous avons été obligés de recommencer l'étape d'étalement de la résine sur le substrat deux fois ou plus, de façon à ce que sa répartition soit uniforme sur toute la surface du substrat. La présence de deux couches de résines différentes sur le substrat de verre provoquait la formation de plusieurs irrégularités sur ce substrat et donc une instabilité de cette résine. Ceci conduisait ainsi à la fragilité du master final, ce qui empêchait sa réutilisation sur une période relativement longue.

Par ailleurs, la préparation du master dans le protocole I nécessitait une journée de travail en salle blanche. Nous avons ainsi travaillé avec un autre type de résine

qui est la SU8 3050. Il s'agit d'une nouvelle génération de résine dont la densité est un peu plus faible (1,153 g/ml au lieu de 1,237g/ml) ce qui a permis d'éviter les problèmes d'étalement de la résine. De plus, l'utilisation de la SU8 3050 au lieu des résines SU8 2002 et 2100 implique une seule insolation et non deux et une diminution de la durée du développement.

Enfin, nous avons changé de substrat et utilisé le silicium plutôt que le verre afin d'augmenter la stabilité de la résine pour permettre une possible réutilisation du nouveau master à plusieurs reprises et de façon quotidienne.

Les principales différences entre les protocoles I et II sont présentées dans le tableau 6.1.

Tableau 6.1 – Tableau comparatif des deux protocoles I et II de préparation de master

	Protocole I	Protocole II
Substrat utilisé	Verre	silicium
Type de résine	SU8 2002 et SU8 2100	SU8 3050
Temps de préparation	1 journée	1/2 journée
Durée de vie du master	2 jours	1 mois

Dans le protocole II, après l'enrésinement de la résine SU8 3050 sur le substrat en silicium, on remarque une meilleure adhésion de la SU8 3050 sur le silicium. Comme l'indique la figure 6.1, nous observons une couche de résine parfaitement uniforme sur la partie sombre du silicium (Figure 6.1.A) alors que dans le cas de substrat en verre (Figure 6.1.B), nous observons des irrégularités, voire des bulles d'air. Ce résultat indique que l'utilisation de la résine SU8 3050 sur un substrat de silicium a permis l'obtention de masters robustes qui peuvent être utilisés un grand nombre de fois et pour la fabrication des puces en PDMS qui ont été employées tout au long de cette étude.

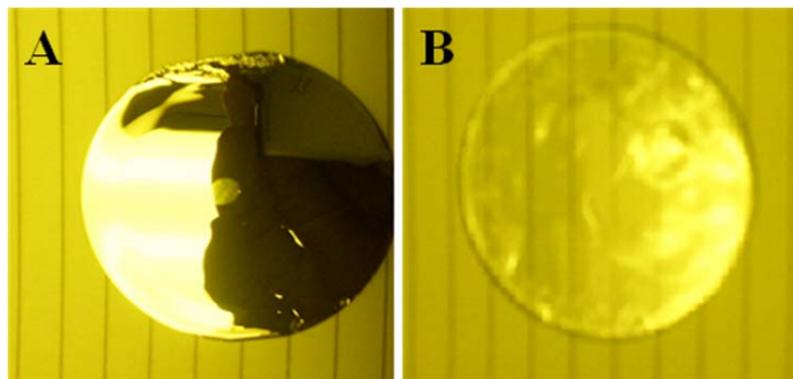


FIGURE 6.1 – Photos de substrat (A) en silicium et (B) en verre recouvert de résine SU8 3050

6.3.2 Mise au point de la fermeture des canaux

Au cours de ce travail, nous avons optimisé le traitement par plasma d'oxygène, et notamment la puissance à utiliser, la pression d'oxygène ainsi que la durée du traitement, nécessaire pour le collage de la puce, afin d'obtenir une fermeture des canaux à la fois étanche à l'écoulement de fluide et réversible. Le but de ce collage réversible était de permettre la caractérisation ultérieure du monolithe polymérisé in-situ dans les canaux formés. L'ensemble des différents tests réalisés est présenté dans le tableau 6.2.

Tableau 6.2 – Différentes conditions de plasma d' O_2 testées pour obtenir une fermeture réversible des canaux en PDMS

Tests	Puissance	Pression (bar)	Temps (sec)
1	80%	0.4	45
2	80%	0.4	30
3	80%	0.4	20
4	80%	0.7	6
5	80%	0.7	12
6	80%	0.7	18
7	80%	0.4	60

Le remplissage des canaux avec une solution colorée de bleu de méthylène, par un pousse seringue, a été utilisé afin de vérifier l'étanchéité des systèmes suite aux différents traitements plasma en utilisant un dispositif présenté à la figure 6.2. On remarque que le système est étanche dans le cas des tests 4, 5, 6 et 7 alors qu'une fuite de la solution colorée est observée avec les puces 1, 2 et 3. Le collage n'est donc pas efficace dans ces conditions de traitement par plasma.

Dans l'étape suivante, on a testé la possibilité d'ouverture des canaux sans difficulté et sans provoquer de débris de PDMS. Cela a été réalisé sur les dispositifs collés avec les tests 4, 5, 6 et 7. On a remarqué alors que les dispositifs préparés selon les tests 6 et 7, étaient difficiles à décoller et provoquaient des débris de PDMS à la surface des canaux ce qui prouve que ce collage est irréversible. Dans le cas des dispositifs préparés selon les tests 4 et 5, on n'a pas eu ce problème de débris de PDMS et le décollage de la puce était relativement simple. Cependant, nous avons décidé d'adopter les conditions du test 5 pour le reste de cette étude afin d'éviter que le collage du test 4, moins drastique, ne soit altéré par l'application de pression pour le remplissage des canaux. A la suite de ces expériences, les meilleures conditions de traitement au plasma d' O_2 pour l'obtention de systèmes de PDMS à fermeture de canaux réversible ont été définies : une pression d'oxygène de 0,7mbar à la puissance de 80W pendant environ 12sec .

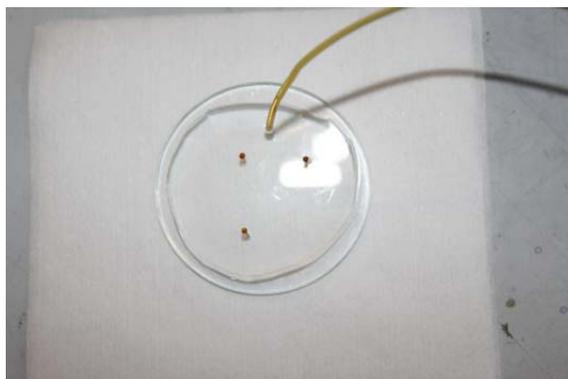


FIGURE 6.2 – Dispositif de remplissage des canaux d’une puce en PDMS collée selon le test 5 avec une solution colorée de bleu de méthylène pour la vérification de l’étanchéité du système

6.3.3 Transposition de la polymérisation du monolithe en micro-systèmes en PDMS

L’analyse d’échantillons biologiques en microsystème nécessite souvent l’intégration d’une étape de traitement de l’échantillon en amont de celle de la séparation. En effet, les composés cibles pouvant se trouver à l’état de trace, cette étape de préconcentration ou d’extraction sélective permet de surmonter le manque de sensibilité dû aux faibles volumes d’échantillon injecté. Après l’étape d’optimisation de la microfabrication des puces en PDMS, notre travail a consisté à tenter de polymériser le monolithe EGMP-co-BAA, présenté dans le chapitre 4, dans le canal d’une puce en PDMS afin de l’utiliser comme support solide de préconcentration de phosphoprotéines.

Le PDMS présente des défauts, principalement, son gonflement par de nombreux solvants. Selon le composé organique utilisé, il sera possible de travailler quelques heures avec un circuit en PDMS (avec des huiles de type alcane ou silicone par exemple), mais dans le cas de solvants plus agressifs (acétone, styrène), le système sera inutilisable en moins d’une minute. Deux autres caractéristiques du PDMS peuvent se révéler importantes dans le cas de la polymérisation in situ d’un monolithe au sein d’un canal en PDMS. Le PDMS est perméable à l’oxygène ce qui inhibe selon Bedair et al. [3] les réactions de polymérisation. C’est également un matériau extrêmement hydrophobe provoquant ainsi l’absorption de plusieurs composés à sa surface. Ainsi, la plupart des monomères et des porogènes utilisés pour la synthèse des monolithes peuvent être absorbés par le PDMS [9].

Afin de faire face à ces problèmes majeurs, il est nécessaire de modifier la surface du PDMS soit pour la rendre plus hydrophile (recouvrement) soit pour la rendre plus réactive (greffage photochimique) afin de permettre la polymérisation du monolithe. En effet, les groupements fonctionnels générés à la surface du PDMS permettent, par réticulation avec le monolithe, d’assurer son ancrage et d’éviter qu’il ne se déplace sous l’effet de la pression.

Plusieurs approches de modification de surface du PDMS ont alors été envisagées dans le but de contrôler sa surface, son hydrophobie ainsi que sa fonctionnalisation. Celles-ci sont discutées dans une revue récente de Zhou et al. [50]. Afin de permettre une polymérisation du monolithe dans des canaux de PDMS, deux approches essentielles ont été proposées dans la littérature.

La première approche consiste principalement en des réactions de silanisation généralement utilisées pour la synthèse de monolithe dans les microsystèmes en verre. [45, 17] En effet, étant donné que le PDMS ne possède pas de groupements silanols actifs, il doit être oxydé au préalable moyennant des irradiations aux UV [47, 48], ou par rinçage intensif à la soude [43]. L'oxydation du PDMS par plasma d'oxygène peut également être utilisée pour la modification de surface du PDMS [6]. Le PDMS oxydé est alors prêt à être silanisé avec des alkoxy-silanes comportant des groupements terminaux réactifs telles que des fonctions vinyliques qui peuvent se réticuler avec le monolithe lors du processus de polymérisation.

La seconde approche est basée sur le greffage photochimique ou photografting. Ce processus a été initialement démontré comme très efficace pour l'ancrage du monolithe dans les microsystèmes en COC [32]. Il a été par la suite développé et adapté à d'autres matériaux de microsystèmes tel que le PDMS [3, 9, 18, 5]. Le photografting se déroule en deux étapes. La première étape est la pré-absorption d'un photoinitiateur dans le PDMS, par exemple la benzophénone, suivie de l'introduction des monomères contenant des fonctions réactives [16, 39]. La seconde étape est l'exposition aux UV à une longueur d'onde de 254 nm à laquelle la benzophénone est à son maximum d'absorption. Le photoinitiateur utilisé peut être également le 2,2-diméthoxy-2-phenyl-acétophénone (DMPAP) et dans ce cas l'irradiation UV s'effectuera à une longueur d'onde de 365nm [5]. Les radicaux libres sont ainsi générés à la surface du PDMS et réagissent localement avec les monomères pour former à la surface du PDMS une couche mince de polymère qui permet, par la présence des groupements réactifs, la réticulation avec le monolithe conduisant ainsi à son ancrage à la surface du PDMS [32].

L'approche de greffage photochimique étant la seule à avoir été évoquée dans la littérature pour réussir la polymérisation de monolithe dans le PDMS, nous avons décidé de ne pas suivre cette voie au cours de ce travail. Nous avons alors décidé de tenter des stratégies, visant à hydrophiliser la surface de PDMS, qui n'ont jamais été utilisées auparavant pour le traitement de surface dans le but de polymériser un monolithe in-situ dans le canal traité. Nous avons alors testé le traitement par plasma d'oxygène, le revêtement au borosilicate synthétisé et la pulvérisation cathodique de silice.

6.3.3.1 Traitement par plasma d'oxygène

Le traitement par plasma moyennant des gaz réactifs est un des moyens utilisés pour la réalisation des interfaces désirées [35]. Le traitement du PDMS par plasma d'oxygène introduit des groupements polaires [15] qui sont principalement des groupements silanols (SiOH) qui modifient les propriétés de surface du PDMS en le

rendant hydrophile. La formation des groupements fonctionnels à la suite du traitement au plasma est limitée à une profondeur de quelques centaines de nanomètres sur la surface du polymère.

Nous avons réalisé des traitements de ce type et la stabilité de ce traitement a été vérifiée par des mesures d'angle de contact (figure 6.3). Nous avons ainsi mesuré les angles de contact sur une même surface ouverte et plane de PDMS avant son traitement au plasma d'oxygène, puis dans le temps, après le traitement de plasma.

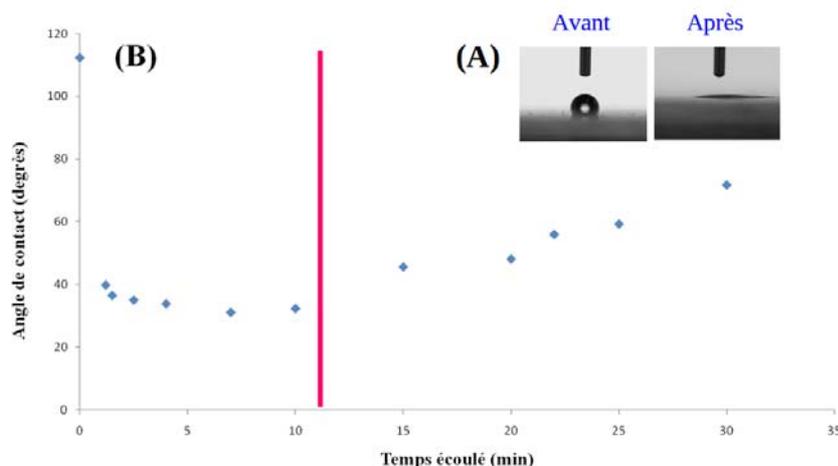


FIGURE 6.3 – Mesures d'angle de contact avant et après traitement au plasma d'oxygène d'une surface ouverte de PDMS : (A) Photos de la goutte d'eau sur une surface de PDMS (B) Evolution de l'angle de contact dans le temps après le traitement par plasma

Les résultats obtenus montrent que les fonctionnalités générées à la surface du PDMS suite au traitement par plasma d' O_2 sont temporaires et sont perdues avec le temps. En effet, l'angle de contact obtenu après le traitement par plasma a baissé de 112° à 40° mais seulement après 10 minutes, le PDMS reprend son caractère hydrophobe (angle de contact ré-augmentant lentement jusqu'à 80° au bout de 30 min). Ce type de traitement ne peut donc pas être envisagé pour la polymérisation du monolithe dans les canaux de PDMS.

6.3.3.2 Revêtement hydrophile au borosilicate synthétisé

Nous avons tenté de silaniser la surface des canaux du PDMS en les revêtant d'une solution de borosilicate synthétisée à partir de triméthoxyboroxine (TMB) et de tetraethyl orthosilicate (TEOS). Ce procédé a été adapté à partir des travaux d'Orhan et ses collaborateurs[22]. Le traitement est principalement composé de deux étapes : la synthèse de la solution de borosilicate réalisée selon le protocole détaillé par la figure 6.4 (1 semaine de préparation) et le revêtement des canaux par cette solution.

Une fois la solution de borosilicate préparée, elle est introduite dans les canaux

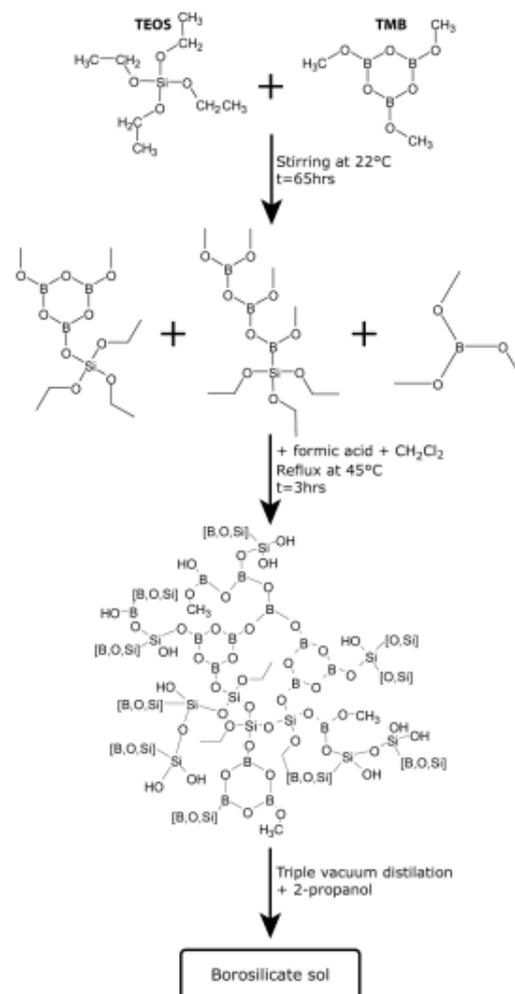


FIGURE 6.4 – Détails de la synthèse de la solution de borosilicate selon le protocole d'Orhan et al. [22]

en PDMS en utilisant le dispositif du nanobaume. Cette étape de revêtement nécessite plusieurs autres étapes de remplissage des canaux et de recuits à différentes températures et dont les détails sont fournis en annexe D.

La figure 6.5 illustre les trois principales étapes du processus conduisant à la formation de la couche de borosilicate à la surface du PDMS. Dans une première étape (Figure 6.5 a), la surface du microcanal est activée par rinçage avec une solution de 2-propanol saturée avec du tetrabutylammoniumfluoride (TBAF). L'ion fluor attaque l'unité Si-O-Si, conduisant à la rupture des ponts siloxane du PDMS et donc à la formation d'une liaison Si-F d'un côté et d'une liaison Si-OH de l'autre. Aucun gonflement du PDMS n'a été remarqué au cours de cette étape d'activation. La deuxième étape de ce processus est le remplissage du canal par la solution de borosilicate (Figure 6.5 b).

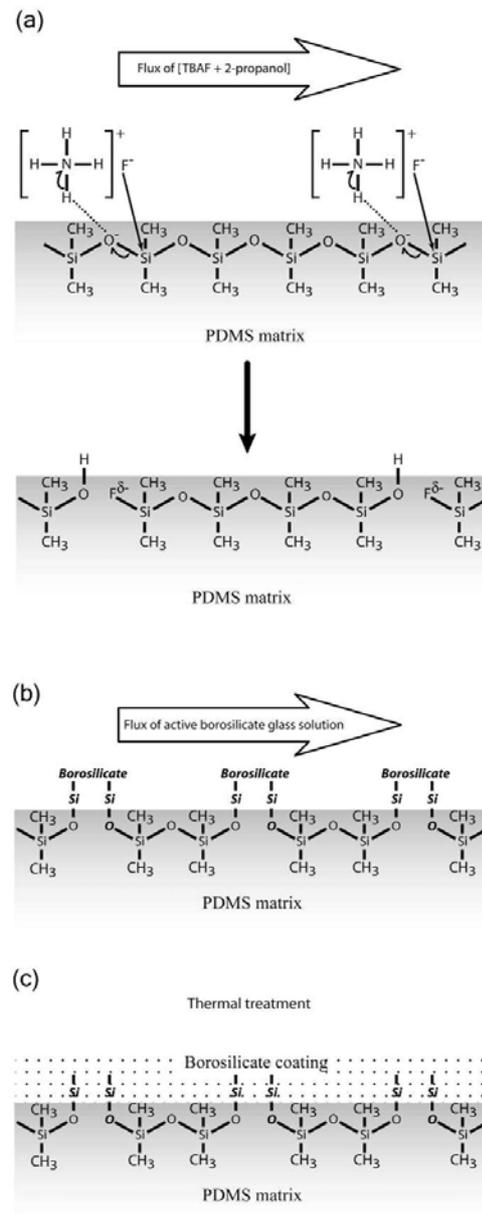


FIGURE 6.5 – Processus de modification du PDMS par le borosilicate : (a) activation de surface par le mélange TBAF/2-propanol, (b) rinçage et revêtement par la solution de borosilicate, (c) revêtement final après traitement thermique [22]

Les groupements hydroxyles et fluorés formés lors de la première étape réagissent avec la solution de borosilicate qui se fixe alors sur le PDMS activé par l'intermédiaire de ses fonctions SiOH. Un traitement thermique à 80°C sous vide est ensuite appliqué. Cette étape (rinçage du canal avec la solution de borosilicate puis le recuit) de la procédure est répétée deux fois. Le dernier traitement thermique est réalisé

à 160°C . Un film de borosilicate est alors obtenu à la surface des microcanaux en PDMS (figure 6.5 c).

Suite à ce traitement de surface, nous avons observé des craquelures au sein des canaux comme le montre la figure 6.6. Il s'agit de la silice qui s'est craquelée suite aux différentes étapes de recuit utilisées.

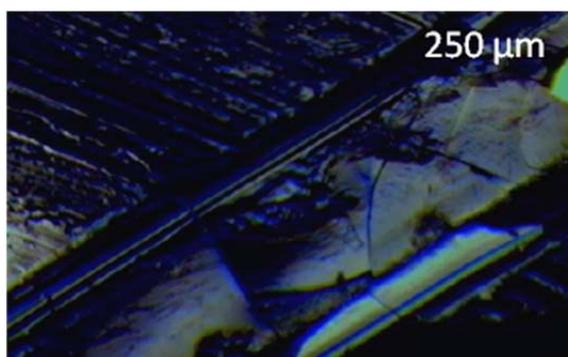


FIGURE 6.6 – Photo du canal en PDMS après revêtement au borosilicate synthétisé (Largeur du canal : $250\mu\text{m}$)

Nous avons tenté d'optimiser le protocole afin d'éviter ces craquelures en procédant à des traitements thermiques différents, notamment en abaissant la température des différents traitements (80°C à 60°C et de 160°C à 120°C), tout en laissant le dispositif refroidir dans l'étuve afin d'éviter tout choc thermique possible.

En effet, selon le protocole initial, les craquelures n'ont été observées qu'après le deuxième traitement à 80°C . Lorsque nous avons baissé la température à 60°C , nous n'avons observé les craquelures qu'à la suite du dernier recuit à 160°C . Nous avons finalement décidé de travailler avec les deux premiers recuits à 60°C et le dernier à 120°C . Les craquelures ont malheureusement persisté suite à ce dernier essai. En parallèle, nous avons pris plusieurs précautions dans le remplissage des canaux en utilisant des débits inférieurs à ceux utilisés dans les travaux d'Orhan et al. Malheureusement, aucun de ces protocoles testés n'a permis d'éviter ces craquelures et nous n'avons donc pas retenu ce type de traitement comme une solution pour hydrophiliser la surface du PDMS afin de polymériser in-situ un monolithe. Cependant, les travaux d'Orhan et al., n'étaient pas gênés par ce problème de craquelure, dans la mesure où leur but était simplement d'étudier l'effet de ce film de borosilicate sur la diffusion de la rhodamine dans les canaux de PDMS.

6.3.3.3 Revêtement par pulvérisation cathodique de silice

Afin de mimer les capillaires de silice fondue dans lesquels le monolithe EGMP-co-BAA a pu être synthétisé, nous avons envisagé de traiter la surface de PDMS par la pulvérisation d'une couche de silice qui est un oxyde hydrophile ayant une certaine affinité pour le PDMS. La pulvérisation cathodique a été choisie car elle permet un dépôt d'épaisseur homogène et, contrairement à la méthode de dépôt

par évaporation, le libre parcours moyen des particules de SiO_2 pulvérisées est plus faible, ce qui permet un dépôt isotrope de la couche de silice.

Une couche de silice d'environ 100 nm d'épaisseur a alors été déposée à l'intérieur des canaux de PDMS par pulvérisation cathodique à une puissance de 230 W et sous une pression d'Argon de $10\mu\text{bar}$ et d'Oxygène de $1,6\mu\text{bar}$. Nous avons choisi de réaliser ce traitement de surface sur des canaux ouverts relativement larges de 1mm, 500 et $250\mu\text{m}$ de diamètre interne afin de faciliter la procédure de pulvérisation. Suite à ce traitement, nous avons observé une surface de canaux extrêmement rugueuse. En effet, pendant l'étape de pulvérisation, les atomes de silicium se déposent sur la couche de PDMS avec une énergie de l'ordre de quelques eV, ce qui provoque une augmentation de la température locale et donc une dilatation du PDMS. Cette dilatation exerce ainsi une contrainte sur la couche de silice déposée, ce qui donne cet aspect rugueux à la surface du PDMS. Nous avons par la suite voulu confirmer la présence de la silice sur la surface de PDMS en réalisant les spectres FTIR en mode réflexion des canaux ouverts après l'étape de pulvérisation. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 6.7. Nous observons nettement la réponse des liaisons Si-O-Si dans un environnement de silice caractérisées par une bande à 1100 cm^{-1} plus intense que celle située à 800 cm^{-1} . Dans le cas du PDMS natif, l'intensité de la bande située à 1100 cm^{-1} est équivalente à celle située à 800 cm^{-1} .

Malgré la présence de la silice, ce traitement n'a pas permis une polymérisation réussie du monolithe. Malheureusement, ce traitement s'est révélé instable et la silice déposée sur la paroi du canal en PDMS n'y adhère pas efficacement et elle est facilement évacuée par rinçage.

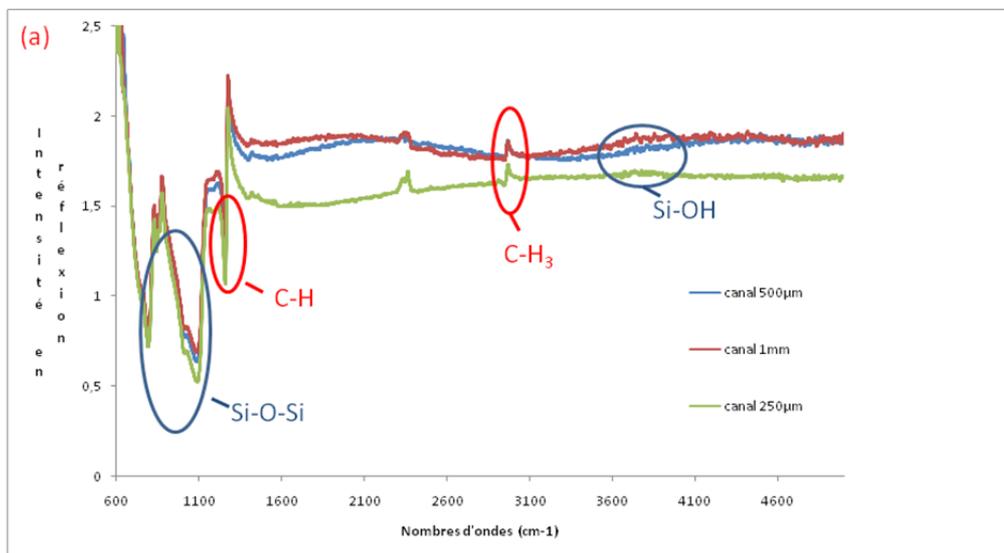


FIGURE 6.7 – Spectres FTIR en mode réflexion réalisés sur des canaux de PDMS ouverts de largeur 1mm, $500\mu\text{m}$ et $250\mu\text{m}$, après pulvérisation cathodique de silice

D'autres types de traitement d'hydrophilisation de la surface du PDMS ont été envisagés tels que l'extraction avec des solvants organiques ou encore le graphing

du PDMS.

En effet, l'extraction avec des solvants organiques s'est avérée très efficace pour augmenter l'hydrophilie du PDMS [37]. En effet, l'hydrophobie extrêmement réversible du PDMS est principalement due à la migration continue des oligomères du PDMS non durcis vers la surface et au réarrangement des chaînes polymères hautement mobiles contenant les liaisons Si-OH à la surface à température ambiante. Cette caractéristique du PDMS est probablement due à sa basse température de transition vitreuse (120°C). Vickers et al. [37] ont alors réussi à surmonter cet inconvénient en modifiant les canaux de PDMS, avant l'oxydation par plasma, par extraction avec trois solvants (triéthylamine, éthyle acétate et acétone) afin d'éliminer tous les oligomères. Ils ont alors montré qu'après stockage pendant 7 jours, l'angle de contact du PDMS modifié puis oxydé a augmenté de 30° à 40° alors que celui oxydé sans modification par extraction a augmenté de 58° à 110° dans la même période. Ceci indique donc que l'extraction par des solvants rend l'hydrophilie du PDMS oxydé par plasma d'oxygène plus stable dans le temps. Une autre approche a été proposée par Ren et al. [25] et consiste à laisser la surface oxydée en contact avec de l'eau. Cela permet de maintenir l'hydrophilie du PDMS pendant plus longtemps. Bien que ces approches se soient révélées efficaces pour des fins analytiques telle que la séparation de biomolécules, elles n'ont jamais été testées pour étudier leur capacité à permettre la polymérisation de monolithe in-situ dans un canal en PDMS et sont donc des stratégies que nous avons envisagées mais que nous n'avons pas eu le temps de réaliser.

Nous avons finalement tenté le greffage photochimique du PDMS par un dérivé de la benzophénone. Le peu d'article existant dans la littérature et portant sur cette stratégie explique la non reproductibilité de ce traitement confirmée par le fait que nous n'avons pas réussi à polymériser le monolithe dans les canaux de PDMS traités par greffage chimique.

Malheureusement, afin de continuer à avancer vers l'objectif de la thèse, nous n'avons pu travailler sur cette partie de modification de surface du PDMS et n'avons donc pas réalisé d'autres stratégies.

6.4 Conclusion

La polymérisation in-situ d'un monolithe au sein d'un canal en PDMS reste un défi à relever. Malgré plusieurs approches envisagées au cours de ce travail, aucune n'a permis une polymérisation réussie du monolithe EGMP-co-BAA.

Le traitement au plasma d'oxygène est une modification réversible et inefficace. Cependant, il serait intéressant de tenter des plasmas d'argon ou d'hélium ou même un mélange des deux pour connaître leur effet sur l'hydrophilisation du PDMS. La pulvérisation de la silice ainsi que le traitement au borosilicate ont montré de bons résultats quant à la présence d'une couche hydrophile à la surface du PDMS mais ces deux approches nécessitent davantage d'optimisation. Ainsi, le graphing du PDMS reste la seule approche à donner des résultats dans la littérature, bien

que peu nombreux. Afin d'avancer dans l'objectif de ma thèse, nous avons décidé d'utiliser des microsystèmes commerciaux en verre pour y polymériser in-situ le monolithe EGMP-co-BAA pour l'utiliser comme module de préconcentration de phosphopeptides.

Bibliographie

- [1] Catherine L. Arthur and Janusz Pawliszyn. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 62(19) :2145–2148, 1990. (Cité en pages 117 et 118.)
- [2] Violaine Augustin, Gaelle Proczek, Jose Dugay, Stephanie Descroix, and Marie-Claire Hennion. Novel monolithic poly(p-methylstyrene-co-bis(p-vinylbenzyl)dimethylsilane) capillary columns for biopolymer separation. *Journal of Separation Science*, 1191(17) :2858–2865, November 2007. PMID : 17973277. (Cité en page 117.)
- [3] Mohamed F. Bedair and Richard D. Oleschuk. Fabrication of porous polymer monoliths in polymeric microfluidic chips as an electrospray emitter for direct coupling to mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 78(4) :1130–1138, 2006. (Cité en pages 73, 75, 118, 124 et 125.)
- [4] Michael C. Breadmore, Kelley A. Wolfe, Imee G. Arcibal, Wayne K. Leung, Dana Dickson, Braden C. Giordano, Mary E. Power, Jerome P. Ferrance, Sanford H. Feldman, Pamela M. Norris, and James P. Landers. Microchip-Based purification of DNA from biological samples. *Anal. Chem.*, 75(8) :1880–1886, 2003. (Cité en page 117.)
- [5] Jeffrey M Burke and Elisabeth Smela. A novel surface modification technique for forming porous polymer monoliths in poly(dimethylsiloxane). *Biomicrofluidics*, 6(1) :016506–016506–10, March 2012. (Cité en pages 118 et 125.)
- [6] Manoj K. Chaudhury and George M. Whitesides. Direct measurement of interfacial interactions between semispherical lenses and flat sheets of poly(dimethylsiloxane) and their chemical derivatives. *Langmuir*, 7(5) :1013–1025, 1991. (Cité en page 125.)
- [7] Michal Chudy, Ilona Grabowska, Patrycja Ciosek, Alicja Filipowicz-Szymanska, Dorota Stadnik, Iwona Wyzkiewicz, Elzbieta Jedrych, Marcin Juchniewicz, Maciej Skolimowski, Karina Ziolkowska, and Radoslaw Kwapiszewski. Miniaturized tools and devices for bioanalytical applications : an overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 :647–668, 2009. 10.1007/s00216-009-2979-2. (Cité en page 121.)
- [8] Ralf Eisert and Janusz Pawliszyn. Automated In-Tube Solid-Phase microextraction coupled to High-Performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 69(16) :3140–3147, 1997. (Cité en page 117.)
- [9] Karine Faure, Maximilien Blas, Omar Yassine, Nathalie Delaunay, Gérard Crétier, Monique Albert, and Jean-Louis Rocca. Electrochromatography in poly(dimethyl)siloxane microchips using organic monolithic stationary phases. *ELECTROPHORESIS*, 28(11) :1668–1673, 2007. (Cité en pages 118, 124 et 125.)
- [10] Laurent Geiser, Sebastiaan Eeltink, Frantisek Svec, and Jean M.J. Fréchet. In-line system containing porous polymer monoliths for protein digestion with

- immobilized pepsin, peptide preconcentration and nano-liquid chromatography separation coupled to electrospray ionization mass spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, 1188(2) :88–96, April 2008. (Cité en page 117.)
- [11] O. Geschke, H. Klank, and P. Telleman. *Microsystem Engineering of Lab-On-A-Chip Devices*. John Wiley & Sons, 2006. (Cité en page 121.)
- [12] Makiko Goto, Kiichi Sato, Atsushi Murakami, Manabu Tokeshi, and Takehiko Kitamori. Development of a Microchip-Based bioassay system using cultured cells. *Anal. Chem.*, 77(7) :2125–2131, 2005. (Cité en page 117.)
- [13] D. Jed Harrison, Karl Fluri, Kurt Seiler, Zhonghui Fan, Carlo S. Effenhauser, and Andreas Manz. Micromachining a miniaturized capillary Electrophoresis-Based chemical analysis system on a chip. *Science*, 261(5123) :895–897, August 1993. (Cité en page 117.)
- [14] Emily F. Hilder, Frantisek Svec, and Jean M. J. Fréchet. Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1044(1-2) :3–22, 2004. (Cité en page 117.)
- [15] H. Hillborg, J.F. Ankner, U.W. Gedde, G.D. Smith, H.K. Yasuda, and K. Wikström. Crosslinked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other surface specific techniques. *Polymer*, 41(18) :6851–6863, August 2000. (Cité en page 125.)
- [16] Shuwen Hu, Xueqin Ren, Mark Bachman, Christopher E. Sims, G. P. Li, and Nancy L. Allbritton. Surface-Directed, graft polymerization within microfluidic channels. *Analytical Chemistry*, 76(7) :1865–1870, 2004. (Cité en page 125.)
- [17] Alois Jungbauer and Rainer Hahn. Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology. *Journal of Separation Science*, 27(10-11) :767–778, 2004. (Cité en page 125.)
- [18] Qin-Shu Kang, Yun Li, Jun-Qing Xu, Li-Jin Su, Yu-Tao Li, and Wei-Hua Huang. Polymer monolith-integrated multilayer poly(dimethylsiloxane) microchip for online microextraction and capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 31(18) :3028–3034, 2010. (Cité en pages 118 et 125.)
- [19] Zhicheng Long, Dayu Liu, Nannan Ye, Jianhua Qin, and Bingcheng Lin. Integration of nanoporous membranes for sample filtration/preconcentration in microchip electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 27(24) :4927–4934, 2006. (Cité en page 117.)
- [20] A. Manz, N. Graber, and H.M. Widmer. Miniaturized total chemical analysis systems : A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 1(1-6) :244–248, January 1990. (Cité en pages 67 et 117.)
- [21] J. Cooper McDonald, David C. Duffy, Janelle R. Anderson, Daniel T. Chiu, Hongkai Wu, Olivier J. A. Schueller, and George M. Whitesides. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *ELECTROPHORESIS*, 21(1) :27–40, 2000. (Cité en page 121.)

- [22] J.-B. Orhan, V. K. Parashar, J. Flueckiger, and M. A. M. Gijs. Internal modification of poly(dimethylsiloxane) microchannels with a borosilicate glass coating. *Langmuir*, 24(16) :9154–9161, 2008. (Cité en pages 126, 127 et 128.)
- [23] Lianbing Ren, Zhen Liu, Mingming Dong, Mingliang Ye, and Hanfa Zou. Synthesis and characterization of a new boronate affinity monolithic capillary for specific capture of cis-diol-containing compounds. *Journal of Chromatography A*, 1216(23) :4768–4774, June 2009. (Cité en page 117.)
- [24] Lianbing Ren, Zhen Liu, Yunchun Liu, Peng Dou, and Hong-Yuan Chen. Ring-Opening polymerization with synergistic co-monomers : Access to a Boronate-Functionalized polymeric monolith for the specific capture of cis-Diol-Containing biomolecules under neutral conditions. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(36) :6704–6707, 2009. (Cité en page 117.)
- [25] Xueqin Ren, Mark Bachman, Christopher Sims, G.P Li, and Nancy Allbritton. Electroosmotic properties of microfluidic channels composed of poly(dimethylsiloxane). *Journal of Chromatography B : Biomedical Sciences and Applications*, 762(2) :117 – 125, 2001. (Cité en page 131.)
- [26] Sanja Risticovic, Vadoud Niri, Dajana Vuckovic, and Janusz Pawliszyn. Recent developments in solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(3) :781–795, 2009. (Cité en pages 117 et 118.)
- [27] Elizabeth S. Roddy, Mitch Price, and Andrew G. Ewing. Continuous monitoring of a restriction enzyme digest of DNA on a microchip with automated capillary sample introduction. *Anal. Chem.*, 75(15) :3704–3711, 2003. (Cité en page 117.)
- [28] Brent C. Satterfield, Seth Stern, Michael R. Caplan, Kyle W. Hukari, and Jay A. A. West. Microfluidic purification and preconcentration of mRNA by Flow-Through polymeric monolith. *Anal. Chem.*, 79(16) :6230–6235, 2007. (Cité en page 117.)
- [29] Samuel K. Sia and George M. Whitesides. Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *ELECTROPHORESIS*, 24(21) :3563–3576, 2003. (Cité en page 121.)
- [30] Tiina Sikanen, Sami Franssila, Tiina J. Kauppila, Risto Kostianen, Tapio Kotiaho, and Raimo A. Ketola. Microchip technology in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 29(3) :351–391, 2010. (Cité en page 121.)
- [31] Elodie Sollier, Coleman Murray, Pietro Maoddi, and Dino Di Carlo. Rapid prototyping polymers for microfluidic devices and high pressure injections. *Lab Chip*, 11 :3752–3765, 2011. (Cité en page 121.)
- [32] Timothy B. Stachowiak, Thomas Rohr, Emily F. Hilder, Dominic S. Peterson, Mingqiang Yi, Frantisek Svec, and Jean M. J. Fréchet. Fabrication of porous polymer monoliths covalently attached to the walls of channels in plastic micro-devices. *ELECTROPHORESIS*, 24(21) :3689–3693, 2003. (Cité en page 125.)

- [33] Frantisek Svec. Porous polymer monoliths : Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. *Journal of Chromatography A*, 1217(6) :902–924, 2010. (Cité en pages 117 et 118.)
- [34] P. Tabeling. *Introduction   la microfluidique*.  chelles (Paris). Belin, 2003. (Cité en page 121.)
- [35] Say Hwa Tan, Nam-Trung Nguyen, Yong Chin Chua, and Tae Goo Kang. Oxygen plasma treatment for reducing hydrophobicity of a sealed polydimethylsiloxane microchannel. *Biomicrofluidics*, 4(3), September 2010. (Cité en page 125.)
- [36] Jiri Urban, Frantisek Svec, and Jean M. J. Frechet. Efficient separation of small molecules using a large surface area hypercrosslinked monolithic polymer capillary column. *Anal. Chem.*, 82(5) :1621–1623, 2010. (Cité en page 117.)
- [37] Jonathan A. Vickers, Meghan M. Caulum, and Charles S. Henry. Generation of hydrophilic poly(dimethylsiloxane) for High-Performance microchip electrophoresis. *Anal. Chem.*, 78(21) :7446–7452, 2006. (Cité en page 131.)
- [38] Jianhua Wang and Elo Harald Hansen. Sequential injection on-line matrix removal and trace metal preconcentration using a PTFE beads packed column as demonstrated for the determination of cadmium by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17(3) :248–252, March 2002. (Cité en page 117.)
- [39] Yuli Wang, Hsuan-Hong Lai, Mark Bachman, Christopher E. Sims, G. P. Li, and Nancy L. Allbritton. Covalent micropatterning of poly(dimethylsiloxane) by photografting through a mask. *Anal. Chem.*, 77(23) :7539–7546, 2005. (Cité en page 125.)
- [40] Jian Wen, Christelle Guillo, Jerome P. Ferrance, and James P. Landers. Microfluidic-Based DNA purification in a Two-Stage, Dual-Phase microchip containing a Reversed-Phase and a photopolymerized monolith. *Anal. Chem.*, 79(16) :6135–6142, 2007. (Cité en page 117.)
- [41] Minghuo Wu, Renan Wu, Fangjun Wang, Lianbing Ren, Jing Dong, Zhen Liu, and Hanfa Zou. "One-Pot" process for fabrication of Organic-Silica hybrid monolithic capillary columns using organic monomer and alkoxy silane. *Analytical Chemistry*, 81(9) :3529–3536, May 2009. (Cité en page 117.)
- [42] Younan Xia and George M. Whitesides. Soft lithography. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(5) :550–575, 1998. (Cité en page 119.)
- [43] Yi Xu, Wenpin Zhang, Ping Zeng, and Qiang Cao. A butyl methacrylate monolithic column prepared In-Situ on a microfluidic chip and its applications. *Sensors*, 9(5) :3437–3446, May 2009. (Cité en page 125.)
- [44] Weichun Yang, Xiuhua Sun, Hsiang-Yu Wang, and Adam T. Woolley. Integrated microfluidic device for serum biomarker quantitation using either standard addition or a calibration curve. *Anal. Chem.*, 81(19) :8230–8235, 2009. (Cité en pages 117 et 118.)

- [45] Cong Yu, Mark H. Davey, Frantisek Svec, and Jean M. J. Fréchet. Monolithic porous polymer for On-Chip Solid-Phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device. *Anal. Chem.*, 73(21) :5088–5096, 2001. (Cité en pages 70, 71, 72, 73, 117 et 125.)
- [46] Carlo Zambonin. Coupling solid-phase microextraction to liquid chromatography. a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(1) :73–80, 2003. (Cité en pages 117 et 118.)
- [47] Hu-Lie Zeng, Hai-Fang Li, and Jin-Ming Lin. Chiral separation of dansyl amino acids by PDMS microchip gel monolithic column electrochromatography with γ -cyclodextrin bonded in polyacrylamide. *Analytica Chimica Acta*, 551(1-2) :1–8, October 2005. (Cité en page 125.)
- [48] Hu-Lie Zeng, Hai-Fang Li, Xu Wang, and Jin-Ming Lin. Development of a gel monolithic column polydimethylsiloxane microfluidic device for rapid electrophoresis separation. *Talanta*, 69(1) :226–231, March 2006. (Cité en page 125.)
- [49] Ming-Ming Zheng, Ge-Deng Ruan, and Yu-Qi Feng. Evaluating polymer monolith in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of quinolone antibacterials in edible animal food. *Journal of Chromatography A*, 1216(44) :7510–7519, October 2009. (Cité en pages 117 et 118.)
- [50] Jinwen Zhou, Amanda Vera Ellis, and Nicolas Hans Voelcker. Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. *ELECTROPHORESIS*, 31(1) :2–16, January 2010. (Cité en pages 118 et 125.)

Conception du module miniaturisé de préconcentration de phosphoprotéines

7.1 Introduction

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle impliquée dans plusieurs processus cellulaires et la plus simple dérégulation peut engendrer diverses pathologies humaines. Il est donc nécessaire d'analyser la phosphorylation de protéines dans les liquides physiologiques afin de permettre un diagnostic précoce de certaines maladies. Plusieurs techniques d'analyse de protéines phosphorylées ont été utilisées dont certaines reposent sur les microsystèmes analytiques. Ces derniers, sont considérés comme des outils d'analyse performants en raison de leurs nombreux avantages notamment la possibilité d'intégration de plusieurs modules dans un même dispositif.

Les phosphoprotéines sont souvent peu abondantes et les degrés de phosphorylation sont relativement faibles, ce qui nécessite une méthode d'enrichissement afin de diminuer la complexité des échantillons et d'augmenter la sensibilité de détection des phosphoprotéines. Plusieurs techniques d'enrichissement ont été développées. La plupart des stratégies utilisées sont principalement basées sur l'immunoprécipitation, les modifications chimiques ou encore la chromatographie d'affinité. L'IMAC, qui fait partie de la troisième catégorie, est l'une des techniques d'enrichissement de phosphoprotéines et de phosphopeptides largement utilisée. Elle est principalement basée sur l'emploi d'une matrice composée de résines à laquelle sont associés des ions métalliques. Ces ions métalliques peuvent se lier moyennant des liaisons de coordination aux groupements phosphates des phosphoprotéines et les retenir.

Le but de cette partie du travail est de combiner l'efficacité de l'IMAC aux nombreux avantages des microsystèmes analytiques pour concevoir un système miniaturisé intégrant un module de préconcentration par IMAC de phosphoprotéines en amont d'un module de séparation par électrophorèse de zone. Ce système devrait être appliqué par la suite au diagnostic de plusieurs maladies humaines dans lesquelles la phosphorylation est impliquée dans un processus physiopathologique. Il doit donc permettre de réaliser des analyses de liquides physiologiques tel que le sang ou l'urine.

La préconcentration de phosphopeptides et phosphoprotéines sur microsystèmes analytiques est encore peu étudiée. A ce jour, seules deux publications ont porté sur

ce sujet. En 2006, Yue et ses collaborateurs ont développé un dispositif microfluidique en verre intégrant un module de préconcentration de phosphopeptides. [10] Ce dernier est constitué de billes d'agarose sur lesquelles des ions Fe^{3+} ont été immobilisés et servent à la capture de produits de digestion en ligne de la β -caséine. Les phosphopeptides ont été chargés sur la matrice d'IMAC dans de l'acide acétique puis ont été élués dans des conditions basiques en utilisant une solution de 50 mM NH_4HCO_3 (pH 8,8-9,0).

Récemment, au cours de ma troisième année de thèse, Wang et ses collaborateurs ont développé, dans un microsystème en verre, un module de préconcentration basé sur un monolithe organique, le poly(HEMA-co-EDMA) synthétisé in-situ[8]. Dans cette approche, le monolithe a ensuite été fonctionnalisé par un monomère phosphaté afin de créer une affinité entre ce monolithe et les ions Zr^{4+} . Contrairement à l'approche de Wang, nous avons choisi dans notre travail de synthétiser un monolithe directement à base d'EGMP, un monomère préalablement phosphaté, afin d'éviter les étapes supplémentaires de fonctionnalisation et de simplifier la préparation du module final de préconcentration. Les ions Fe^{3+} ont été les plus utilisés en IMAC dans la littérature. Cependant, une étude comparant l'efficacité d'enrichissement de phosphopeptides en utilisant une matrice Fe^{3+} -IMAC et Zr^{4+} -IMAC a montré que cette dernière est largement plus sélective et que la capacité d'enrichissement en utilisant les ions Zr^{4+} est plus élevée [2]. L'utilisation des ions Zr^{4+} a été par la suite étudiée par plusieurs auteurs [11, 8, 9, 12, 14, 13, 4]. Nous avons ainsi choisi d'utiliser le zirconium comme ion métallique pour notre application d'IMAC.

Dans ce chapitre, nous présentons l'optimisation du module de l'IMAC réalisée à partir du monolithe EGMP-co-BAA dont la synthèse a été optimisée dans le chapitre 5 de ce manuscrit. Nous avons réalisé dans un premier temps ce module de préconcentration en format capillaire. Ce choix est dû au coût faible des capillaires par rapport à celui des puces, ce qui nous a permis de réaliser un bon nombre d'expériences. Par ailleurs, la manipulation des capillaires est simple et la caractérisation des monolithes polymérisés in-situ est plus aisée. Dans un deuxième temps, nous avons tenté de transposer le module d'IMAC à des microsystèmes analytiques en verre puisque les tentatives effectuées sur le PDMS n'ont pas été concluantes.

7.2 Matériels et méthodes

7.2.1 Polymérisation du monolithe EGMP-co-BAA

A/ Dans des capillaires en silice : cette étape est identique à celle décrite dans le chapitre 5. Brièvement, le capillaire en silice (TSP, Polymicro Technologies) est traité avec un agent de silanisation γ -MAPS puis le mélange de la solution de polymérisation y est introduit. La polymérisation est réalisée localement sur 2 cm (longueur totale du capillaire est de 31 cm) par voie photochimique à 365 nm. On introduit les deux extrémités du capillaire dans deux extrémités d'un tube PEEK (polyétheréthercétone) opaque, de diamètre et de longueur supérieurs à ceux du capillaire en silice, puis on fait glisser le capillaire dans le tube en PEEK jusqu'à la

zone de 2 cm qui, elle, reste visible.

La figure 7.1 présente un schéma du capillaire en silice en présence du monolithe de préconcentration.



FIGURE 7.1 – Schéma du module de préconcentration (2cm du monolithe EGMP-co-BAA) réalisé dans un capillaire en silice

B/ Dans une puce en verre : La synthèse du monolithe EGMP-co-BAA a été réalisée sur un microsystème commercial en verre de type simple croix (PC-SC, Micalyne). La puce a les dimensions suivantes : 16mm x 95mm x 2.2mm, la longueur du canal de séparation est de 81mm et celle des autres canaux est égale à 9.5mm (figure 7.2).

Cependant, il est nécessaire de conserver une portion du canal de séparation pour la séparation elle-même, aussi il a fallu développer un mode de synthèse localisée. Notre but était de placer un monolithe de 5mm de longueur tout au début du canal de séparation ce qui ne perturbe pas l'étape d'injection qui doit être réalisée en amont.

Après traitement des canaux du microsystème avec du γ -MAPS, on y introduit le mélange réactionnel à polymériser. Afin de limiter la polymérisation du monolithe dans les portions désirées du microsystème, des masques opaques en silicium sont disposés sur ce dernier au niveau des zones où la polymérisation n'est pas souhaitée (figure 7.2). Le traitement de surface du canal par le γ -MAPS permet, comme en capillaire, l'ancrage du monolithe aux parois du canal. Le détail de ce traitement adapté de Proczek et al. [7] et comporte les étapes suivantes :

- Rinçage du canal à la soude 1M pendant 5 min
- Chauffage dans l'étuve pendant 30min
- Rinçage du canal à l'eau pendant 5min
- Rinçage du canal avec une solution de HCl à 0,1M pendant 5 min
- Chauffage dans l'étuve pendant 30min
- Rinçage du canal à l'eau pendant 5min
- Remplissage du canal avec une solution de γ -MAPS/DMF (50/50)
- Chauffage dans l'étuve pendant 90min

Finalement, le microsystème est placé sous irradiation UV à 365nm. L'énergie appliquée est de l'ordre de 8J. Après polymérisation, le monolithe est rincé au méthanol pendant 2h afin d'éliminer l'excès de solvant et d'entités qui n'ont pas réagi.

7.2.2 Méthode d'immobilisation du zirconium, de préconcentration et d'élution

Immobilisation au Zr :

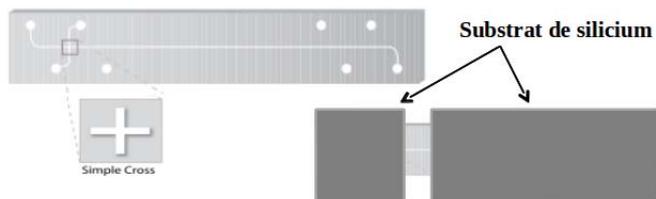


FIGURE 7.2 – Schéma du dispositif utilisé pour la photopolymérisation localisée du monolithe EGMP-co-BAA dans un microsystème en verre

- Rinçage à l'eau pendant 10 min à 20psi
- Rinçage avec une solution aqueuse de $ZrOCl_2$ (100mM) pendant 1h à 30 psi
- Rinçage à l'eau pendant 30 min à 30 psi

Pré-concentration du phospho-kemptide et élution :

- Rinçage à l'eau à 20 psi pendant 5 min
- Rinçage avec le tampon d'équilibration pendant 30 min à 20 psi
- Chargement avec l'échantillon pendant 30 minutes à 0.5psi
- Rinçage avec le tampon de lavage pendant 30 minutes à 20 psi
- Rinçage avec le tampon d'élution pendant 1h à (0.5, 20 et 40 psi)
- Rinçage avec de l'eau pendant 15 min à 20 psi

7.2.3 Étude du module de préconcentration de phosphopeptides en capillaire

L'étude et l'optimisation de la rétention des phosphopeptides ont été menées par EC. Les analyses en EC ont été réalisées à l'aide soit d'un instrument P/ACE MDQ Beckmann Coulter équipé d'un détecteur UV soit d'un PA800 (Beckmann Coulter) couplé à une détection LIF (laser $\lambda_{ex}=488$ nm)

7.2.4 Caractérisation du monolithe dans la puce en verre

Afin de pouvoir caractériser le monolithe polymérisé in-situ dans une puce en verre, celle-ci est découpée en plusieurs morceaux de 2mm à l'aide d'une lame de diamant au niveau de l'emplacement du monolithe. Les morceaux sont par la suite visualisés par MEB.

7.3 Résultats et discussions

Une fois la synthèse du monolithe EGMP-co-BAA optimisée, l'objectif était d'évaluer ce support en tant que matrice pour la préconcentration de phosphopeptide par IMAC. Comme précédemment décrite, l'IMAC repose essentiellement sur des affinités entre un ion métallique et les groupements phosphates des phosphopeptides. Qu'elle soit réalisée en capillaire ou en puce, c'est une méthode d'enrichissement qui comporte plusieurs étapes.

La première étape consiste à immobiliser l'ion métallique, du Zr^{4+} dans notre cas, sur le support monolithique choisi en tant que matrice d'IMAC comme présenté sur la figure 7.3. Cette étape a été réalisée par rinçage du monolithe avec une solution de $ZrOCl_2$. La seconde étape consiste à charger la matrice monolithe-Zr avec un mélange de phospho et non phosphopeptides par percolation de la solution d'échantillon pendant un temps déterminé. Ainsi, seuls les peptides phosphorylés peuvent être retenus par interaction avec les ions zirconium. Les peptides non phosphorylés seront tout simplement élués de la matrice après un rinçage qui a pour rôle d'éviter toute interaction non spécifique pouvant avoir lieu entre le monolithe et certaines espèces présentes dans l'échantillon. L'étape finale de l'IMAC consiste à éluer les peptides phosphorylés préconcentrés sur la matrice par rinçage de cette dernière avec un volume d'un solvant d'élution approprié. Ainsi, une préconcentration de phosphopeptides passe par l'optimisation de chacune des étapes de l'IMAC. Pour cela, nous avons choisi au cours de ce travail de réaliser toutes les optimisations sur un module d'enrichissement préparé en format capillaire étant donné que l'optimisation de ces étapes directement en microsysteme est plus complexe. Les différentes étapes de l'IMAC sont représentées par la figure 7.3.

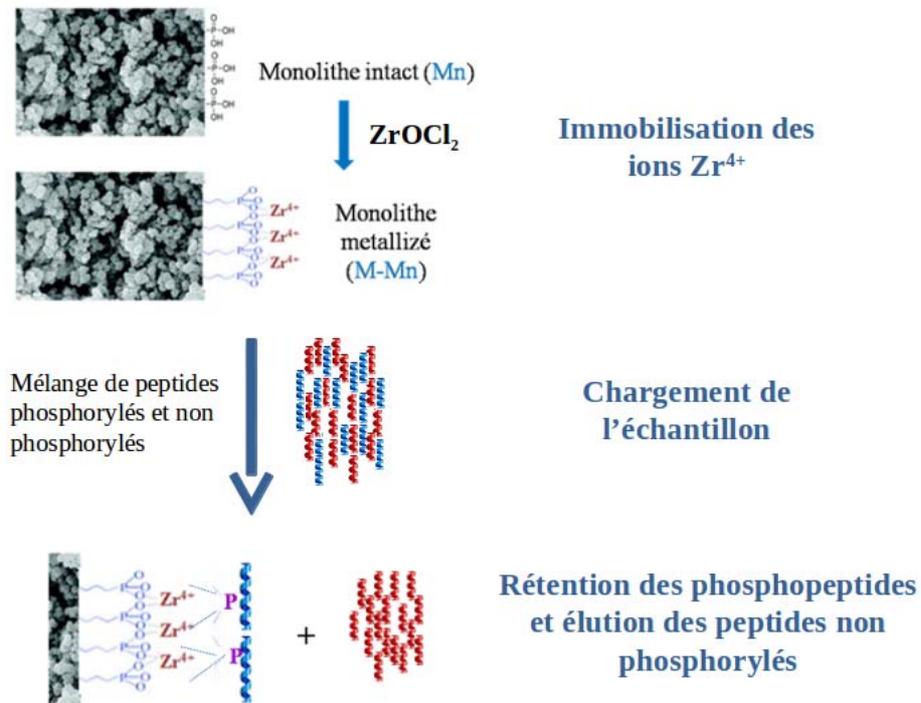


FIGURE 7.3 – Différentes étapes de la préconcentration par IMAC sur le monolithe poly(EGMP-co-BAA)

7.3.1 Optimisation des étapes de l'IMAC en format capillaire

Les différentes étapes de l'IMAC ont été réalisées et optimisées une par une en format capillaire en vue d'une ultérieure transposition sur les microsystèmes en verre. Nous nous sommes ainsi intéressés dans un premier temps aux conditions d'immobilisation du métal sur la surface du support monolithique, puis aux conditions de chargement et de rétention de l'échantillon et enfin à l'étape d'éluion des phosphopeptides capturés.

7.3.1.1 Immobilisation des ions zirconium

Nous avons choisi de travailler avec une solution de $ZrOCl_2$ de pureté élevée (99%) afin d'éviter d'éventuels problèmes d'interactions non spécifiques. En effet, il a été prouvé que la spécificité de l'IMAC est fortement influencée par la pureté des ions utilisés [9]. Au cours de ces travaux, Ye et ses collaborateurs ont utilisé des ions Fe^{3+} provenant de deux fournisseurs différents. Les résultats obtenus ont montré une meilleure sélectivité dans le cas du Fe^{3+} de Merck par rapport à celui de Sigma Aldrich. Ceci a été expliqué par la différence de pureté des lots de $FeCl_3$ (97% pour Sigma-Aldrich contre 99% pour Merck), car les liaisons non spécifiques ont été plus prononcées lors de l'enrichissement IMAC menée avec le réactif le moins pur. J'ai par la suite optimisé la concentration en ions zirconium de la solution d'immobilisation ainsi que le temps de rinçage nécessaire pour leur immobilisation. L'immobilisation des ions Zr^{4+} sur le monolithe a finalement été réalisée par rinçage avec une solution de $ZrOCl_2$ à 100mM pendant 1h à 30 psi.

L'efficacité de l'immobilisation des ions métalliques a été évaluée par des mesures de flux électroosmotiques (FEO). Après immobilisation du métal, le monolithe est préconditionné par rinçage avec le tampon borate pH 9 à 40mM. Les mesures de FEO ont été réalisées par injection de la thiourée à 0,1mg/mL et reportées dans l'histogramme de la figure 7.4, qui traduit non seulement l'état de charge de surface du capillaire en présence de 2cm de monolithe métallisé mais également ceux d'un capillaire en silice vierge, d'un capillaire recouvert avec du γ -MAPS et d'un capillaire intégrant 2cm du monolithe poly(EGMP-co-BAA). On remarque que la mobilité électroosmotique m_{eo} du capillaire traité au γ -MAPS (Si-MAPS) a diminué de 34% en comparaison à un capillaire en silice vierge (Si Vierge). Le γ -MAPS est un polymère neutre et donc une fois attaché de façon covalente à la surface de la silice, il masque les charges de surface de ce dernier ce qui explique cette baisse de la m_{eo} .

En présence de 2 cm de monolithe dans un capillaire préalablement traité au γ -MAPS(Si-2cm Mn), la m_{eo} a légèrement augmenté de 22%. Des calculs statistiques ont permis de conclure que cette augmentation de 22% est significative. Des simulations mathématiques ont montré que, compte tenu de la mobilité électroosmotique globale mesurée ($4,44 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), la m_{eo} , générée par uniquement les 2cm de monolithe, est relativement importante. Ceci s'explique par l'apport en charges négatives du monolithe dû à la présence de groupements phosphate à la surface de la matrice du poly(EGMP-co-BAA). Lorsque l'on a immobilisé des ions

Zr^{4+} (*Si - Mn - Zr*), la m_{eo} a diminué de 10% par rapport à celle d'un capillaire non métallisé. Cette baisse est significative compte tenu du CV 0,4% et est tout à fait prévisible en raison des charges positives des ions zirconium. Deux explications peuvent être évoquées ; soit une liaison effective des ions zirconium sur le monolithe via des liaisons de coordination avec les groupements phosphates du monolithe, soit une fixation des ions Zr^{4+} sur le γ -MAPS. Afin de confirmer une immobilisation effective des ions Zr^{4+} sur le monolithe, nous avons ensuite étudié la rétention d'un peptide phosphorylé modèle sur la colonne (*Si-Mn-Zr*). Si le phosphopeptide est retenu, cela prouve qu'il a été capturé par les ions Zr^{4+} et que ces derniers ont bien été immobilisés sur le monolithe.

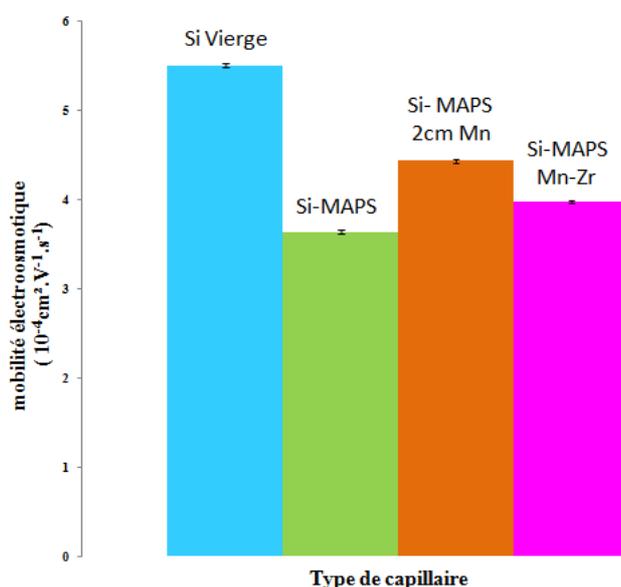


FIGURE 7.4 – Mobilité électroosmotique dans différents capillaires : en silice vierge, traité par le γ -MAPS, traité par le γ -MAPS incluant un Mn, traité par le γ -MAPS incluant un Mn métallisé par le Zr (Conditions électrophoretiques : Tampon borate pH 9 at 40 mM, champ électrique 387 V/cm, Injection à 0.5psi/ 5sec, Capillaire 31,2cm longueur totale et 75 μm DI)

Nous avons alors choisi de travailler avec deux peptides modèles dont la séquence en acides aminés est identique. Leur poids moléculaire ainsi que leur point isoélectrique sont présentés dans le tableau 7.1. **K** (Kemptide-HiLyte 488) est un peptide non phosphorylé et marqué par le HiLyte 488 pour le rendre fluorescent et détectable en LIF. **pK** (pSerKemptide-HiLyte 488) est son homologue phosphorylé au niveau de la sérine 5 dans la séquence d'acides aminés. Ainsi, le peptide K est extrêmement basique (pI 12) alors que le peptide pK a un pI de 7,3. Cette diminution du point isoélectrique est due à la présence du groupement phosphate négatif. Ces points isoélectriques ont été calculés à partir du site ExPASy (<http://scansite.mit.edu>). Le phosphopeptide a été utilisé pour évaluer la capacité du monolithe en présence du

zirconium à retenir les peptides phosphorylés alors que la forme non phosphorylée K jouera le rôle de témoin.

Tableau 7.1 – Caractéristiques des deux peptides modèles utilisés pour évaluer la capacité de rétention du monolithe poly(EGMP-co-BAA)-Zr

Peptides	Séquence d'AA	Poids moléculaire	Point Isoélectrique
K : Kemptide-HiLyte 488	LRRASLG	1129.0	12
pK : pSerKemptide-HiLyte 488	LRRApSLG	1209.0	7.3

Il a fallu tout d'abord déterminer les conditions optimales de séparation des deux peptides K et pK sur un capillaire traité au γ -MAPS. Après avoir testé différents tampons, nous avons réussi à séparer les deux peptides dans un tampon légèrement acide (tampon phosphate de sodium à pH 6) comme le montre la figure 7.5. Dans ces conditions de pH, K doit migrer en premier avant la Thiourée parce qu'il est fortement chargé positivement ce qui est confirmé par l'électrophérogramme obtenu. Ensuite, pK qui est moins chargé positivement doit migrer en deuxième également avant la thiourée. Cependant, l'ordre de migration est différent de ce qui est attendu et pK se comporte comme une espèce chargée négativement dans ces conditions. Le groupement phosphate présent est probablement très exposé, mais il est également probable que les deux peptides interagissent par adsorption sur le MAPS, entraînant ainsi la diminution de leur mobilité apparente par cette interaction. Cependant, un résultat similaire a été obtenu sur un capillaire en silice. Il est donc peu probable que l'adsorption des peptides soit responsable de ce retard de migration.

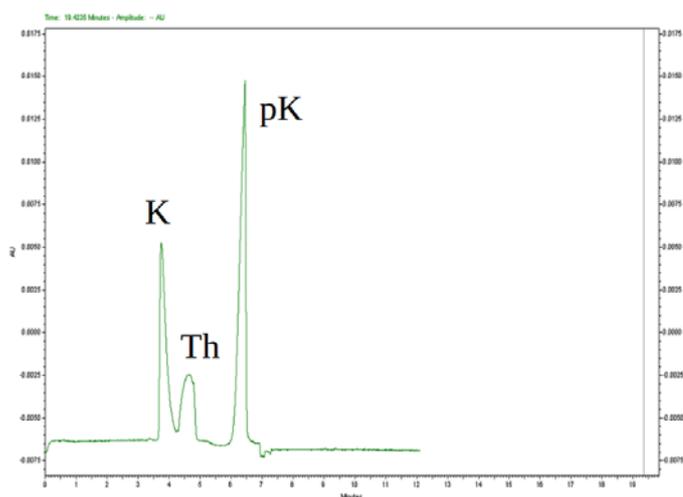


FIGURE 7.5 – Séparation par ECZ des peptides K et pK (Conditions électrophorétiques : Tampon phosphate pH 6 à 50 mM, champ électrique 387 V/cm, Injection à 0.5psi/ 5sec, Capillaire MAPS 31.2cm LT et 75 μ m DI, concentration de K et pK =0,1mg/ml et concentration de la thiourée =0,05mg/mL), détection à 214nm

Pour évaluer la capacité du monolithe poly(EGMP-co-BAA)- Zr^{4+} à retenir la forme phosphorylée pK, nous avons injecté dans les conditions optimisées le mélange K et pK dans trois types de capillaires ; le premier est un capillaire en silice vierge, le deuxième est un capillaire intégrant 2cm de monolithe et le troisième est un capillaire intégrant les 2cm de monolithe sur lesquels des ions zirconium ont été immobilisés. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 7.6.

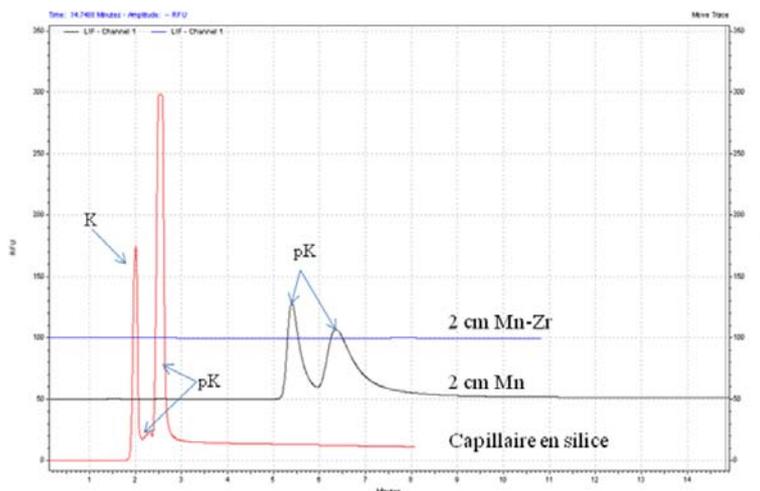


FIGURE 7.6 – Analyses par ECZ des peptides K et pK sur 3 types de capillaires pour évaluer la capacité du monolithe poly(EGMP-co-BAA) à retenir le phosphopeptide pK (Conditions : Tampon phosphate de sodium à pH=6 et de Force ionique=50mM, Tension appliquée=12KV, injection hydrodynamique 0.5psi pendant 5 secondes, Détection à 488nm)

Selon, les électrophérogrammes obtenus, les deux peptides K et pK sont détectés dans un capillaire en silice vierge. Cependant, en présence de 2 cm du monolithe, seuls les deux pics correspondant au peptide phosphorylé pK sont détectés. Les deux pics correspondant au pK s'expliquent par la présence de deux isomères de dérivation par le fluorophore. Le résultat obtenu signifie que K a été retenu sur la matrice poly(EGMP-co-BAA). Cette rétention peut s'expliquer par le caractère très basique de K ($pI = 12$). En effet, le monolithe poly(EGMP-co-BAA) peut aussi jouer le rôle d'une matrice échangeuse de cations et retenir le peptide K. En revanche, lorsque l'on a immobilisé du Zr^{4+} sur le monolithe, le peptide phosphorylé pK n'est pas détecté. Il a été certainement retenu selon un mécanisme IMAC très probable.

On peut conclure ainsi que notre module de préconcentration fonctionne correctement et que l'immobilisation des ions zirconium a été efficace à pH 6, ce qui permet la rétention du peptide phosphorylé sur le monolithe via des interactions d'affinité avec le métal. Cependant, la présence des groupements phosphate à la surface du monolithe est également responsable d'un comportement d'échangeur de cations en présence d'analyte fortement basique dans les conditions d'analyse. Il se peut alors que l'ajout de sel lors du chargement de l'échantillon puisse diminuer cet

effet secondaire et non souhaité et éviter que les analytes non phosphorylés restent accrochés au monolithe.

7.3.1.2 Optimisation des conditions de chargement et de rétention du phosphopeptide

Afin d'aboutir à un enrichissement satisfaisant par IMAC de phosphoprotéines et de phosphopeptides, il est crucial d'optimiser le tampon de chargement de l'échantillon sur le monolithe. Pour enrichir efficacement les phosphopeptides, il est préférable d'utiliser un tampon de chargement à des pH 2 à 2,5 et d'y ajouter un acide, tel que l'acide acétique [6] ou le TFA [3]. Dans cette gamme de pH, l'IMAC présente une meilleure spécificité due à la différence des constantes de dissociation acide (pKa) entre les acides aminés acides et les groupements phosphate. Le résidu phosphate du monolithe a un pKa voisin de 2,1, alors que la fonction carboxylique de l'acide glutamique et aspartique sont de 3,65 et 4,25, respectivement [3]. Si le pH du tampon de chargement est situé entre 2 et 4, la majorité des groupements carboxyliques des acides aminés acides sont protonés et ne se lient donc pas aux ions zirconium. Inversement, dans ces conditions, la plupart des groupements phosphate sont ionisés et présentent une charge négative qui permet la liaison aux ions métalliques.

Ainsi, nous avons optimisé les conditions de chargement des échantillons, puis de lavage du monolithe. Nous avons testé des milieux acides en présence d'acétonitrile en employant surtout des solutions de TFA à différentes concentrations, et de l'ACN comme solvant organique. Ainsi, nous avons fait varier la concentration de TFA entre 5% et 0,1% puis celle de l'ACN entre 80% et 50% dans le mélange ACN/TFA. Nous avons également testé l'acide acétique à 0,1% en présence et en absence de 100mM de NaCl dans la solution de chargement de l'échantillon et celle du lavage. La figure 7.7 présente une des procédures testées au cours de laquelle un rinçage du monolithe a été réalisé avec la solution de chargement de l'échantillon (ACN/TFA : 80/5) pour l'équilibrage du système, puis le peptide phosphorylé (5mg/mL dissout dans le solvant de chargement) est percolé sur le monolithe pendant 60min à 0,5psi. Ensuite, la matrice est rincée avec une solution de lavage (ACN/TFA : 50/0,1) pendant 30 min à 20 psi afin d'éliminer toute interaction non spécifique. Le phosphopeptide, supposé être retenu par le monolithe métallisé, est finalement élué dans des conditions acides (0,1% TFA).

On remarque sur le profil (A) un "pic" lors du lavage du monolithe alors qu'il est absent sur le profil (B). On suppose qu'il s'agit du phospho-kemptide mais il aurait pu provenir aussi bien de son élution après avoir été retenu de manière non spécifique ou spécifique (IMAC) sur le monolithe puisque le tampon de lavage possède déjà des propriétés éluantes puisqu'il contient 0.1% TFA qui sera utilisé aussi dans le tampon de l'élution. On peut également supposer que la rétention du phospho-kemptide est effective puisque l'on n'observe pas d'augmentation de l'absorbance lors du chargement de l'échantillon. Ainsi, on peut conclure que le lavage du monolithe avec une solution contenant 0.1% TFA est problématique puisque c'est une condition

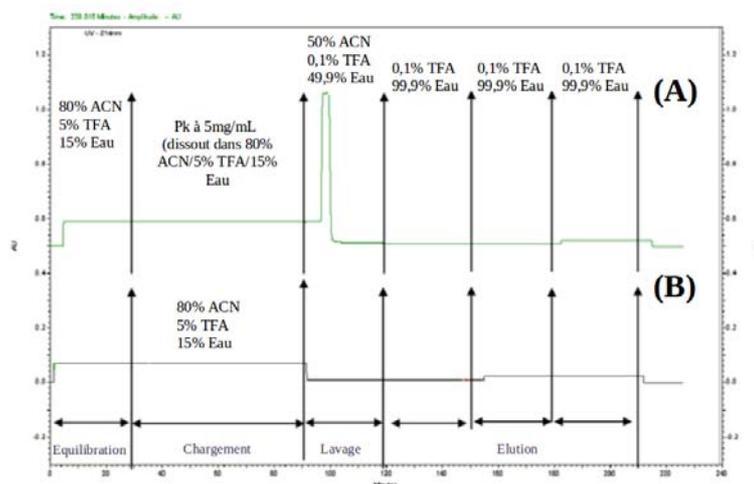


FIGURE 7.7 – Suivi par UV des différentes étapes de préconcentration du phosphopeptide (A) échantillon : pK à 5mg/mL et (B) échantillon : tampon de chargement

proche de celle de l'élué. Il est ainsi nécessaire de continuer l'optimisation des conditions d'élué du phosphopeptide.

7.3.1.3 Optimisation des conditions d'élué du phosphopeptide

Une fois les phosphopeptides ou phosphoprotéines liés à la matrice IMAC, leur élué est une étape importante qui permet de les relarguer de façon idéale. Il est ainsi indispensable d'optimiser les conditions d'élué. Ces conditions sont très dépendantes de la nature du solvant d'élué utilisé, de son pH et de sa force ionique. Dans la littérature, les phosphoprotéines ont été éluées à différents pH, allant des pH acides (pH 6,8 ; [1]) aux pH alcalins (pH 8,0 ; [5]).

Au cours de notre travail, nous avons testé l'élué du phosphopeptide dans deux conditions : l'une acide en présence de TFA et l'autre basique avec une solution d'hydroxyde d'ammonium à des pH compris entre 9 et 11. Les résultats obtenus par simple suivi en UV des élués montrent que les changements d'absorbance restent peu importants, ce qui indique soit que le lavage a éliminé le phosphopeptide, soit que les conditions d'élué ne sont pas satisfaisantes. Un équilibre doit être trouvé entre les conditions de lavage et d'élué, et ceci reste encore à déterminer et à optimiser davantage.

7.3.2 Optimisation du module de préconcentration sur une puce en verre

La polymérisation du monolithe en puce en PDMS ayant échoué, même à l'issue de plusieurs stratégies envisagées afin d'hydrophiliser ou de modifier la surface des canaux de PDMS, nous avons ensuite décidé, afin d'obtenir un module de préconcentration, de travailler sur des puces en verre dont les propriétés physico-chimiques

sont beaucoup plus proches de celles des capillaires en silice.

Le protocole de synthèse du monolithe en microsysteme en verre est semblable à celui en format capillaire détaillé dans le chapitre 5. Il comporte essentiellement deux étapes : la première consiste à modifier la surface du canal par γ -MAPS et la seconde étape est la polymérisation in-situ du monolithe. Ce processus a cependant nécessité quelques adaptations afin de réussir une polymérisation localisée du monolithe dans le canal de séparation du microsysteme. La figure 7.8 présente une photo de microscope optique d'une section du monolithe polymérisé alors que la figure 7.9 présente deux clichés MEB du monolithe synthétisé au sein du canal en verre.

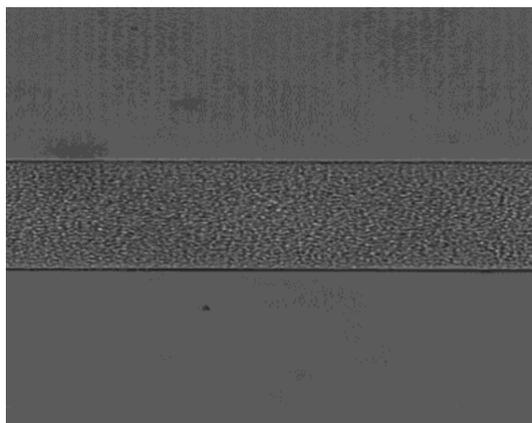


FIGURE 7.8 – Photographie optique de la phase monolithique obtenue dans un canal de microsysteme en verre (Diamètre du canal : $50\mu\text{m}$)

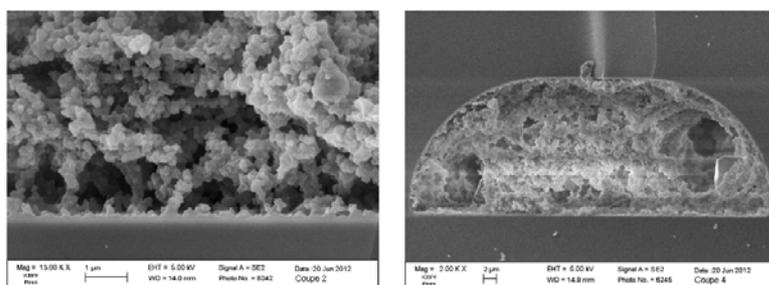


FIGURE 7.9 – Clichés MEB du monolithe EGMP-co-BAA au sein du canal en verre

La répétabilité de ce processus de polymérisation en microsysteme a été évaluée. Nous avons polymérisé le monolithe au sein de canaux de six microsystemes différents et avons déterminé à chaque fois la longueur de la phase monolithique polymérisée à l'aide des graduations au $1/10$ de cm présentes tout le long du canal de séparation de la puce. Les résultats de cette étude sont présentés dans la figure 7.10.

Pour une longueur de monolithe théorique désirée de 5mm, la longueur moyenne obtenue avec 6 essais est de 5,3 mm avec une bonne répétabilité ($CV=8\%$). Cette

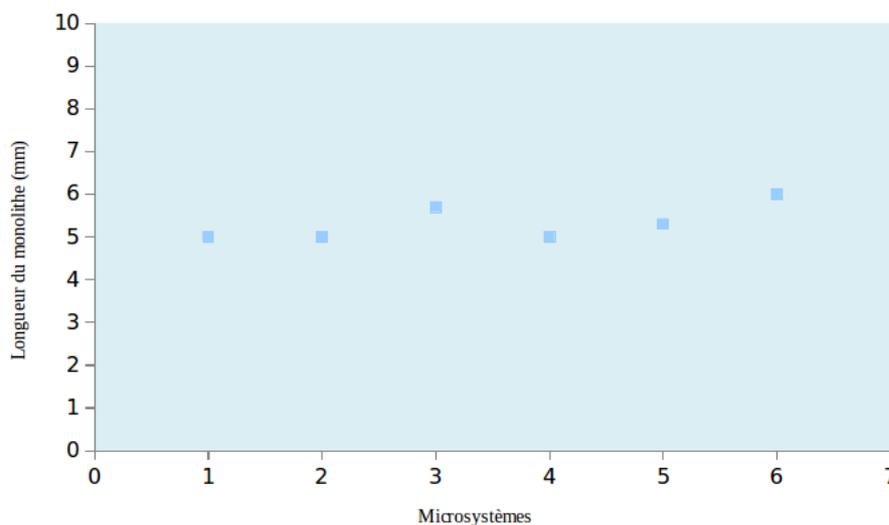


FIGURE 7.10 – Répétabilité des longueurs du monolithe obtenues lors de la polymérisation localisée du poly(EGMP-co-BAA) dans six microsystèmes en verre

légère variation peut être expliquée par le fait que les masques utilisés sont placés sur le microsystème de manière manuelle, en l'absence d'alignement automatique. Mais elle reste cependant compatible avec la poursuite de l'étude. Les clichés MEB des phases monolithiques synthétisées dans les différents microsystèmes ont montré un bon accrochage du monolithe aux parois des canaux, une bonne localisation de ce dernier dans le canal de séparation ainsi qu'une bonne homogénéité du monolithe. Ainsi, des phases monolithiques à base d'EGMP et de BAA ont pu être synthétisées de façon répétable et homogène au sein d'un canal en verre. Le système a été ultérieurement exploité pour la préconcentration de phosphopeptides.

Afin de caractériser la capacité de ce monolithe à préconcentrer des phosphopeptides au sein des microsystèmes, nous avons préparé un microsystème intégrant une phase monolithique avec des ions zirconium immobilisés, par remplissage des canaux avec la solution de $ZrOCl_2$ à 100mM, et fait percoler une solution de peptide phosphorylé à 1mg/mL. La différence de fluorescence obtenue entre un monolithe non métallisé en présence soit de K soit de pK et un monolithe métallisé dans les mêmes conditions, nous a permis d'évaluer la rétention de chacun des peptides.

En effet, dans un canal intégrant 5 mm de monolithe, on observe une fluorescence importante qui persiste après lavage du monolithe dans le cas de percolation du peptide non phosphorylé K ce qui confirme le résultat obtenu en capillaire traduisant un comportement d'échange d'ions important du monolithe (figure 7.11). Cependant, dans le cas de la percolation du phosphopeptide pK, la fluorescence est considérablement atténuée après l'étape de lavage, ce qui indique que le peptide phosphorylé se lie de manière non spécifique sur ce monolithe non métallisé (figure 7.11).

Lorsque l'on immobilise du zirconium sur le monolithe et qu'on le percole ensuite avec une solution de pK, on remarque après lavage du monolithe une persistance

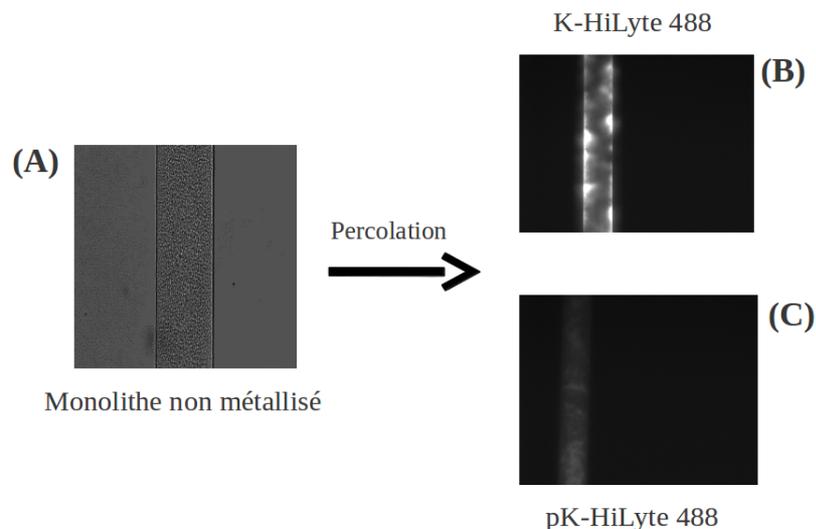


FIGURE 7.11 – Evaluation de la rétention de K (B) et pK (C) marqués au HiLyte 488 sur un monolithe poly(EGMP-co-BAA) non métallisé (A)

de la fluorescence qui confirme la rétention du peptide phosphorylé sur la matrice monolithique via des interactions d'affinité avec les ions métalliques immobilisés en surface (figure 7.12).

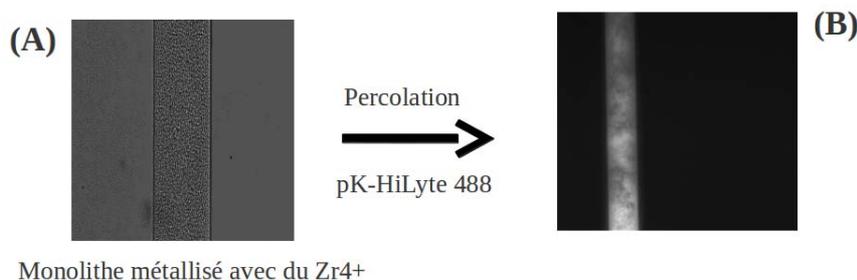


FIGURE 7.12 – Evaluation de la rétention de pK (B) marqué au HiLyte 488 sur un monolithe poly(EGMP-co-BAA) métallisé avec des ions Zr^{4+} (A)

Ces observations par microscopie optique permettent de confirmer que le module de préconcentration de phosphopeptides à base d'EGMP et de BAA fonctionne en microsystème et que l'on peut l'utiliser pour l'enrichissement de peptides et protéines phosphorylés. Cependant, nous n'avons pas réussi à coupler cette étape de préconcentration en ligne en amont de l'étape de séparation par électrophorèse de zone en microsystème. Cette étape nécessite encore plus de temps et d'optimisation.

7.4 Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons montré que le monolithe EGMP-co-BAA est une matrice efficace pour l'enrichissement par IMAC étant donné sa capacité à retenir les peptides phosphorylés. Cependant, ce monolithe se caractérise par un comportement d'échange de cations dû à la présence de groupements phosphate à sa surface. Ceci indique donc que tous les peptides et protéines, non phosphorylés et basiques y seront retenus dans les conditions d'analyse. Cette rétention peut tout de même être évitée, ou au moins minimisée, par l'ajout de sel dans la solution de chargement de l'échantillon, ce qui serait intéressant à étudier. De même, l'ajout de sel permettra un chargement plus spécifique. Il faut donc étudier davantage les différentes conditions de chargement et d'élution afin de permettre un enrichissement plus spécifique et une élution efficace.

Il serait également intéressant d'étudier la compatibilité entre les tampons d'élution et de séparation dans la mesure où un couplage en ligne des étapes de préconcentration et de séparation des échantillons doit être réalisé. En effet, idéalement, les conditions de chargement doivent être plutôt acides et en présence de concentration élevée en sel tandis que celles de séparation plutôt basiques (pour une séparation efficace de K et pK) et avec une force ionique raisonnable pour éviter l'effet joule.

Bibliographie

- [1] Anna Dubrovskaya and Serhiy Souchelnytskyi. Efficient enrichment of intact phosphorylated proteins by modified immobilized metal-affinity chromatography. *PROTEOMICS*, 5(18) :4678–4683, 2005. (Cité en page 149.)
- [2] Shun Feng, Mingliang Ye, Houjiang Zhou, Xiaogang Jiang, Xingning Jiang, Hanfa Zou, and Bolin Gong. Immobilized zirconium ion affinity chromatography for specific enrichment of phosphopeptides in phosphoproteome analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(9) :1656–1665, September 2007. (Cité en page 140.)
- [3] Makiko Kokubu, Yasushi Ishihama, Toshitaka Sato, Takeshi Nagasu, and Yoshiya Oda. Specificity of immobilized metal Affinity-Based IMAC/C18 tip enrichment of phosphopeptides for protein phosphorylation analysis. *Analytical Chemistry*, 77(16) :5144–5154, 2005. (Cité en page 148.)
- [4] Xiao-Shui Li, Li-Dan Xu, Gang-Tian Zhu, Bi-Feng Yuan, and Yu-Qi Feng. Zirconium arsenate-modified magnetic nanoparticles : preparation, characterization and application to the enrichment of phosphopeptides. *Analyst*, 137 :959–967, 2012. (Cité en page 140.)
- [5] Mitsuyo Machida, Hidetaka Kosako, Kyoko Shirakabe, Michimoto Kobayashi, Masato Ushiyama, Junichi Inagawa, Joe Hirano, Tomoyo Nakano, Yasuhiko Bando, Eisuke Nishida, and Seisuke Hattori. Purification of phosphoproteins by immobilized metal affinity chromatography and its application to phosphoproteome analysis. *FEBS Journal*, 274(6) :1576–1587, 2007. (Cité en page 149.)
- [6] Matthew C. Posewitz and Paul Tempst. Immobilized Gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Analytical Chemistry*, 71(14) :2883–2892, 1999. (Cité en pages 90 et 148.)
- [7] Gaelle Proczek, Violaine Augustin, Stephanie Descroix, and Marie-Claire Henion. Integrated microdevice for preconcentration and separation of a wide variety of compounds by electrochromatography. *Electrophoresis*, 30(3) :515–524, 2009. PMID : 19156759. (Cité en page 141.)
- [8] Hui Wang, Jicheng Duan, Hongjiu Xu, Liang Zhao, Yu Liang, Yichu Shan, Lihua Zhang, Zhen Liang, and Yukui Zhang. Monoliths with immobilized zirconium ions for selective enrichment of phosphopeptides. *Journal of Separation Science*, 34(16-17) :2113–2121, 2011. (Cité en pages 73, 109 et 140.)
- [9] Juanying Ye, Xumin Zhang, Clifford Young, Xiaolu Zhao, Qin Hao, Lei Cheng, and Ole Norregaard Jensen. Optimized imac-imac protocol for phosphopeptide recovery from complex biological samples. *Journal of Proteome Research*, 9(7) :3561–3573, 2010. (Cité en pages 140 et 144.)
- [10] Guihua Eileen Yue, Michael G Roper, Catherine Balchunas, Abigail Pulsipher, Joshua J Coon, Jeffery Shabanowitz, Donald F Hunt, James P Landers, and Jerome P Ferrance. Protein digestion and phosphopeptide enrichment on a

- glass microchip. *Analytica Chimica Acta*, 564(1) :116–122, March 2006. PMID : 17723369. (Cité en pages 73, 78 et 140.)
- [11] Liyuan Zhang, Hui Wang, Zhen Liang, Kaiguang Yang, Lihua Zhang, and Yukui Zhang. Facile preparation of monolithic immobilized metal affinity chromatography capillary columns for selective enrichment of phosphopeptides. *Journal of Separation Science*, 34(16-17) :2122–2130, 2011. (Cité en pages 109 et 140.)
- [12] L Zhao, R Wu, G Han, H Zhou, L Ren, R Tian, and H Zou. The highly selective capture of phosphopeptides by zirconium Phosphonate-Modified magnetic nanoparticles for phosphoproteome analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(8) :1176–1186, August 2008. (Cité en page 140.)
- [13] Houjiang Zhou, Songyun Xu, Mingliang Ye, Shun Feng, Chensong Pan, Xiaogang Jiang, Xin Li, Guanghui Han, Yu Fu, and Hanfa Zou. Zirconium phosphonate-modified porous silicon for highly specific capture of phosphopeptides and maldi-tof ms analysis. *Journal of Proteome Research*, 5(9) :2431–2437, 2006. (Cité en page 140.)
- [14] Houjiang Zhou, Mingliang Ye, Jing Dong, Guanghui Han, Xinning Jiang, Renan Wu, and Hanfa Zou. Specific phosphopeptide enrichment with immobilized titanium ion affinity chromatography adsorbent for phosphoproteome analysis. *Journal of Proteome Research*, 7(9) :3957–3967, 2008. (Cité en pages 90, 106, 109 et 140.)

Conclusion générale et perspectives

Exploiter le potentiel des dispositifs microfluidiques en termes d'intégration et d'analyse, notamment dans le cas de l'analyse de phosphoprotéines, a constitué la motivation initiale de ce travail de thèse. L'idée de départ était de concevoir un microsystème analytique intégrant deux modules : le premier est un module de préconcentration de phosphoprotéines par IMAC et constitué d'une phase monolithique et le deuxième est un module de séparation par électrophorèse de zone des phosphoprotéines soit entre elles soit selon le degré de phosphorylation de l'une d'elles.

Au cours de ce travail, trois objectifs principaux ont guidé l'orientation scientifique. Le premier enjeu consistait à concevoir un monolithe capable de servir comme module de préconcentration. Il a fallu non seulement optimiser sa synthèse, ce que nous avons réalisé dans un premier temps au sein de capillaire en silice mais aussi de le caractériser en termes de composition, de morphologie, de perméabilité, de surface spécifique et de stabilité mécanique. La transposition de cette polymérisation in-situ au sein d'un microsystème a constitué le deuxième enjeu de ce travail, en tentant tout d'abord de l'effectuer dans des puces en PDMS, ce qui a été rarement décrit dans la littérature, puis dans des puces en verre. Le troisième objectif était principalement centré sur l'optimisation des différentes étapes de préconcentration afin de réaliser une préconcentration par IMAC de phosphopeptides. Ce module de préconcentration doit être compatible, avec un couplage en ligne au sein d'un même dispositif, avec d'autres modules comme celui de la séparation.

Dans un premier temps, nous avons mis au point la synthèse du monolithe organique à base d'EGMP et de BAA dans des capillaires en silice fondu de faible diamètre interne ($75\mu\text{m}$) par polymérisation par voie photochimique en présence d'un porogène tertiaire (P). L'influence des différents rapports monomère/agent réticulant (EGMP/BAA) et monomère/porogène (EGMP/P) et énergie d'irradiation ont été étudiés afin d'optimiser la morphologie ainsi que les caractéristiques physiques (perméabilité, stabilité mécanique, surface spécifique) du monolithe en vue de son utilisation en tant que matrice pour l'IMAC. Les résultats obtenus au cours de cette partie de travail, ont montré que nous avons obtenu à l'issue de cette optimisation des conditions de polymérisation permettant d'obtenir une morphologie satisfaisante du monolithe et un ancrage efficace de ce dernier aux parois du capillaire en silice. Nous avons également montré que ce monolithe présentait des propriétés adéquates pour son utilisation en tant que support solide de préconcentration. Il possède, en particulier, une perméabilité relativement modérée, permettant un bon écoulement de fluide. Sa surface spécifique, de l'ordre de $34,085\text{ m}^2/\text{g}$, est considérée comme favorable aux interactions monolithe/analyte. Il a également été démontré que ce monolithe possédait une bonne stabilité mécanique ce qui lui confère une bonne résistance lors de l'application d'une pression ou de champs électrique qui font partie

des étapes à réaliser pour le prétraitement de l'échantillon ou la séparation qui devra suivre.

Dans un deuxième temps, nous avons choisi de transposer la polymérisation du monolithe EGMP-co-BAA au sein d'un dispositif microfluidique en PDMS. En effet, même si peu d'articles de la littérature faisait état de polymérisation d'un monolithe organique dans des puces en PDMS, il nous a semblé que polymériser un monolithe dans ce matériau restait compliqué. Nous avons commencé par optimiser la microfabrication du dispositif. Ainsi, la préparation d'un master ayant une bonne résistance et réutilisable dans le temps a constitué la première étape. Nous avons ainsi, à partir d'un protocole expérimental adopté par d'autres groupes, apporté quelques améliorations, en modifiant par exemple la nature de la résine utilisée, du substrat aussi bien que certaines étapes afin de réduire le temps de préparation. La deuxième amélioration a porté sur le collage du microsystème réalisé. En effet, au cours de notre travail, nous avons souhaité réaliser un collage réversible mais étanche des canaux en PDMS afin de permettre la caractérisation ultérieure du monolithe une fois polymérisé.

Une fois le microsystème réalisé, la synthèse in-situ du monolithe organique poly(EGMP-co-BAA) au sein du canal en PDMS a constitué l'étape suivante de ce travail. Comme nous l'avons expliqué, la polymérisation d'un monolithe dans le PDMS reste difficile et peu reportée. Le PDMS, étant un matériau très hydrophobe et ayant une forte perméabilité à l'oxygène, ne favorise pas la polymérisation in-situ des monolithes organiques. Nous avons alors essayé de faire face à ces inconvénients en tentant un certain nombre de solutions passant principalement par des traitements de surface des canaux en PDMS.

Nous avons donc essayé le traitement de la surface du PDMS par plasma d'oxygène. Ce traitement étant réversible sur une courte période, il n'a pas pu être exploité. Il serait donc intéressant de l'utiliser, par exemple, après avoir réalisé une extraction du PDMS par des solvants organiques¹. Nous avons également testé le revêtement avec une solution de borosilicate synthétisée mais ce dernier ne peut pas être adopté compte tenu des craquelures provoquées par ce traitement. Cependant, la présence de silice sur les canaux en PDMS suite à ce traitement semble être un élément important et justifie de poursuivre cette approche en optimisant ce traitement. Enfin, la pulvérisation cathodique de silice s'est montrée elle aussi intéressante comme stratégie mais nécessite davantage d'optimisation.

Malheureusement, bien que certains résultats soient encourageants, aucun de ces traitements n'a permis une polymérisation réussie du monolithe poly(EGMP-co-BAA) au sein du dispositif en PDMS, et ces approches de modification de surface nécessitent probablement d'être approfondies notamment celle de la pulvérisation cathodique de silice ou encore du revêtement avec la solution de borosilicate qui ont été les plus encourageantes compte tenue de la présence de silice confirmée, après ces deux traitements, dans les canaux en PDMS. La polymérisation reproductible

1. Jonathan A. Vickers, Meghan M. Caulum, and Charles S. Henry. Generation of hydrophilic poly(dimethylsiloxane) for High-Performance microchip electrophoresis. *Anal. Chem.*, 78(21) :7446-7452, 2006.

de monolithe organique dans le PDMS reste donc un défi à relever et beaucoup d'efforts sont à fournir en matière de traitement de surface du PDMS.

Nous avons, dans une troisième partie, essayé d'optimiser les différentes étapes de la préconcentration de phosphoprotéines par IMAC en format capillaire. L'immobilisation effective des ions zirconium sur le support monolithique a été démontrée par une étude de la rétention d'un phosphopeptide modèle. Nous avons ainsi montré que le monolithe EGMP-co-BAA se comporte comme une matrice échangeuse de cations parce qu'il a retenu un peptide non phosphorylé basique. En outre, il est également considéré comme une matrice efficace pour l'IMAC parce qu'il a retenu spécifiquement le peptide phosphorylé modèle, utilisé comme échantillon. Nous avons étudié différentes conditions de chargement de l'échantillon ainsi que d'élution des cibles, mais ces résultats préliminaires nécessitent davantage d'optimisation.

La polymérisation dans les canaux en PDMS ayant échoué, nous avons opté finalement pour la polymérisation de notre monolithe au sein d'un microsystème en verre et avons évalué la capacité du module de préconcentration à retenir des peptides phosphorylés et non phosphorylés. Nous avons alors démontré que notre module d'enrichissement fonctionnait correctement dans le dispositif en verre par simple visualisation de fluorescence provenant du phosphopeptide dérivé.

Après ces résultats encourageants, portant sur la conception d'un module de préconcentration au sein d'un microsystème analytique qui a pour but ultime de fournir une des étapes d'un microsystemes dédié au diagnostic de certaines maladies impliquant des biomarqueurs phosphorylés. De nombreux efforts restent néanmoins à accomplir, d'une part pour améliorer les étapes de l'IMAC ainsi que sa spécificité vis-à-vis des phosphopeptides. En effet, le monolithe synthétisé possède également un caractère d'échangeur de cations qui peut être responsable de la rétention des peptides ou protéines non phosphorylés mais basiques. Ceci pourrait être réalisé en ajoutant au solvant de chargement de l'échantillon une quantité adéquate de sel. Enfin le couplage de la préconcentration à la séparation est une étape importante à étudier notamment car elle permet des analyses plus rapides et à haut débit avec un volume mort nul.

Le traitement de l'échantillon et notamment la préconcentration en microsystemes est encore peu explorée, elle constitue cependant un maillon indispensable de la chaîne analytique surtout lorsque l'on souhaite analyser des échantillons biologiques. Les microsystemes analytiques offrent pourtant beaucoup de possibilité en la matière. Ces outils permettent d'intégrer au sein du même dispositif d'autres modes de préconcentration, tels que ceux basés sur des phénomènes électrocinétiques et de les coupler à des séparations en ligne. Les modes de séparation utilisés peuvent eux aussi être variés tels que l'électrochromatographie ou encore ceux basés sur des phénomènes de focalisation. Il est également possible d'intégrer d'autres modules comme la détection ou la digestion.

La conception d'un dispositif microfluidique dédié à la préconcentration et l'analyse en ligne de phosphoprotéines reste un sujet qui a encore beaucoup d'avenir et qui nécessite davantage de recherche, notamment en termes de design du dispositif permettant de gérer l'ensemble des solvants et tampons utilisés aux différentes

étapes soit en garantissant une certaine compatibilité entre eux soit au contraire pour s'affranchir des problèmes d'incompatibilité. En effet, ces dispositifs sont peu développés dans la littérature et très peu sont dédiés aux protéines.

Le dispositif étudié au cours de ce travail, pourrait être utilisé, non seulement pour la préconcentration de phosphoprotéines mais également être adapté à l'enrichissement d'autres molécules biologiques. En effet, le monolithe à base d'EGMP peut être substitué au sein du microsystème par un autre monolithe pour la préconcentration des glycoprotéines, par exemple, par immobilisation de lectines.

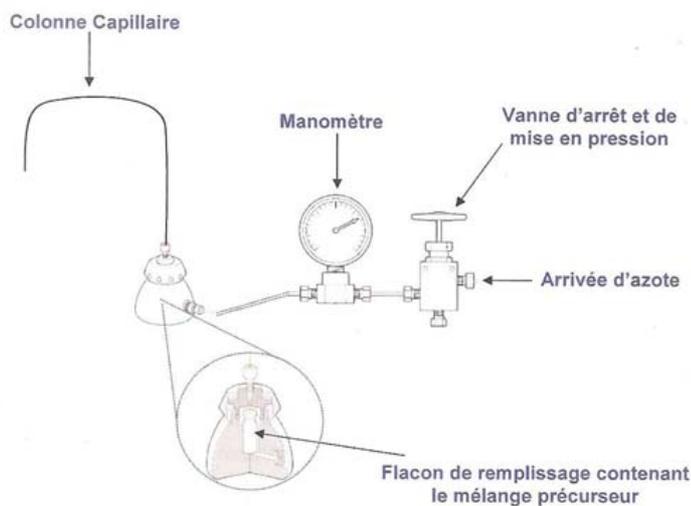
Traitement des capillaires de silice par du γ -MAPS

Le capillaire en silice de 2m de longueur est d'abord rincé par une solution de NaOH (1M) pendant 60min en utilisant le montage détaillé en annexe X à 3 bars. Il est ensuite bouché par des embouts en caoutchouc et placé à l'étuve pendant 2h à 100°C afin de créer des groupements silanols libres (Si-OH). Ces derniers vont plus tard réagir avec le γ -MAPS. Ensuite, le capillaire est rincé avec une solution d'acide chlorhydrique 0.1M, de l'eau distillée puis de l'acétone successivement pendant 15 chacun. Ces différentes étapes de rinçage permettent de libérer le capillaire d'éventuels traces de métaux. Il est par la suite, séché à l'azote pendant 10 min puis placé à l'étuve pendant 3h à 100°C. Après 30 min de rinçage avec une solution de 50% γ -MAPS dans l'acétone, le capillaire est à nouveau bouché à ses extrémités et placé à l'étuve pendant une nuit à 100°C. Enfin, il est rincé pendant 15min avec de l'acétone puis séché par un courant d'azote à 3 bars pendant 10min et placé une dernière fois à l'étuve pendant une heure à 100°C. Le capillaire est ainsi conservé à l'abri de la lumière à 8°C et est prêt à être utilisé.

Synthèse du monolithe

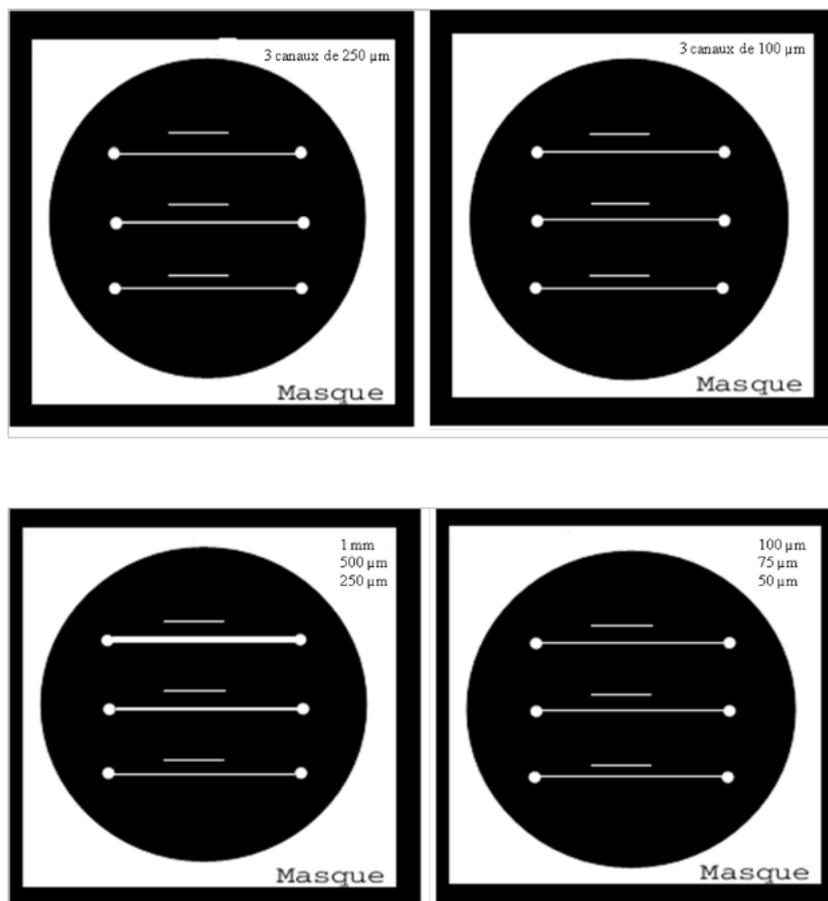
La synthèse du monolithe commence par la préparation du mélange de polymérisation. Celui-ci est réalisé en mélangeant des quantités précises du monomère (EGMP), de l'agent réticulant (BAA) et du porogène tertiaire formé de dodécanol, de DMSO et de DMF ainsi que du photoinitiateur (AIBN). Ce mélange est ensuite placé sous ultrasons pendant 20 min puis l'air est chassé par un courant d'azote pendant 10min à très faible pression.

La solution de monolithe est alors introduite dans le capillaire prétraité par l'agent de silanisation γ -MAPS en utilisant le nanobaume à une pression fixe de 3 bars en utilisant le montage détaillé à la figure ci-dessous. Le capillaire est par la suite placé dans un four UV, muni de 6 tubes à 365 nm de 15Watt chacun, puis irradié sous l'énergie d'irradiation désirée en Joules. Finalement le monolithe polymérisé est rincé par une solution de méthanol afin d'éliminer les entités qui n'ont pas réagi pendant 2h en utilisant le même montage.



Détails des masques utilisés pour la fabrication des puces en PDMS

Les photos présentées ci-dessous sont les masques utilisés lors de la microfabrication des puces en PDMS. Il s'agit de puces de type monocanal dont le diamètre interne varie entre 1 mm et 50 μm . La longueur du canal ainsi que les diamètres des réservoirs sont les mêmes pour tous les masques et sont égaux à 4 cm et 2mm respectivement.



Revêtement des canaux de PDMS avec une solution synthétisé de borosilicate

Le traitement de surface des canaux de PDMS par revêtement avec une solution synthétisée de borosilicate comporte les étapes suivantes :

1. Rinçage du canal avec une solution de Tetra Butyl Ammonium Fluoride (TBAF) saturée dans une solution de 2-propanole à un débit de 0.06 mL/min pendant 2 min. Cette première étape permet de rompre les ponts Si-O-Si du PDMS.
2. Remplissage du canal avec la solution de borosilicate à un débit de 0.04 mL/min pendant 2 min. Au cours de cette étape, les groupements hydroxyles et fluorés formés lors de la première étape réagissent pour permettre la réaction de borosilicate à la surface du PDMS.
3. Premier traitement thermique sous vide (16 mBar) à 80°C
4. Remplissage du canal avec la solution de borosilicate à un débit de 0.04 mL/min pendant 10 min.
5. Deuxième traitement thermique sous vide (16 mBar) à 80°C
6. Remplissage du canal avec la solution de borosilicate à un débit de 0.04 mL/min pendant 10 min
7. Dernier traitement thermique sous vide (16 mBar) à 160°C

Un film de borosilicate est ainsi formé, suite à ce traitement, à la surface du canal en PDMS.

Résumé

La phosphorylation de protéines est un régulateur clé de voies de signalisation cellulaire. Elle est impliquée dans la plupart des événements cellulaires et contrôle les processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation et l'expression des gènes. Une phosphorylation anormale de protéines peut être observée dans diverses maladies comme certains cancers ou maladies neurodégénératives. Ces protéines constituent donc des biomarqueurs potentiels pour le développement d'outils de diagnostic. Cependant les phosphoprotéines peuvent être présentes à faibles concentrations dans les liquides biologiques et des techniques d'enrichissement sélectif des protéines phosphorylées doivent être développées en amont des analyses. L'une des approches les plus courantes est basée sur la chromatographie d'affinité de type IMAC. Le but de ce travail de thèse était de développer un microsystème contenant un monolithe en tant que support solide d'extraction pour réaliser une préconcentration sélective de phosphopeptides par IMAC. La polymérisation par UV et la caractérisation (perméabilité, porosité et surface spécifique) d'un monolithe à base de phosphate de méthacrylate d'éthylène glycol dans des capillaires de silice ont été d'abord réalisées. Puis, nous avons tenté d'optimiser les différentes étapes de l'IMAC (immobilisation du métal, chargement de l'échantillon, lavage et élution). Une immobilisation efficace de zirconium sur le monolithe phosphaté a été démontrée par des mesures de FEO dans un capillaire et a été par la suite confirmée par la rétention d'un phosphopeptide modèle. Nous avons démontré que le monolithe phosphaté était également un support d'échange de cations vis-à-vis de peptides fortement basiques. Les protocoles de chargement et d'élution ont également été étudiés, mais nécessitent encore d'être améliorés. La transposition de l'enrichissement de phosphopeptides par IMAC sur un système miniaturisé a ensuite été envisagée. Nous avons choisi deux matériaux pour la puce : le PDMS, qui est un polymère attractif pour son faible coût, sa facilité de microfabrication, ses excellentes propriétés en termes de biocompatibilité ainsi que ses nombreuses possibilités d'intégration (enrichissement, séparation, détection) et le verre plus communément employé pour développer des microsystèmes analytiques et possédant une bonne transparence aux UV. Toutefois, le PDMS présente deux inconvénients majeurs : son absorption élevée et sa perméabilité importante à l'oxygène qui inhibe la polymérisation radicalaire. A l'exception de quelques tentatives, ce matériau n'a jamais été employé avec succès comme support pour la polymérisation d'un monolithe. Afin de pouvoir surmonter ces problèmes, nous avons étudié plusieurs stratégies de traitement de surface du PDMS tels que le traitement par plasma d'oxygène ou encore le revêtement au borosilicate. Enfin, nous avons démontré que notre module d'IMAC fonctionnait correctement dans un microsystème en verre. Ce module miniaturisé devrait à l'avenir s'intégrer dans un microsystème d'analyse dédié au diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

Mots clé : Microsystème d'analyse, préconcentration, monolithe, IMAC, phosphorylation, PDMS, verre, EC, photopolymérisation

Summary

Protein phosphorylation is a key regulator of cellular signaling pathways. It is involved in most cellular events and strictly controls biological processes such as proliferation, differentiation and gene expression. An abnormal phosphorylation can be observed in various diseases such as some cancers or neurodegenerative diseases. Therefore, these proteins are potential biomarkers for the development of diagnostic tools. However, phosphoproteins can be present at low abundance in biological samples and selective enrichment techniques have to be developed prior to the analysis process. One of the most common approaches is based on Immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The goal of this work was to develop a microsystem which contains a porous polymer monolith (PPM) as a solid phase extraction for a selective preconcentration of phosphopeptides by IMAC. UV-polymerization and characterization (permeability, porosity and specific area) of a monolith based on ethylene glycol methacrylate phosphate in silica capillaries was first performed. Then, we tried to optimize the different IMAC steps (metal immobilization, sample loading, washing and elution). An efficient immobilization of zirconium on the phosphated PPM was demonstrated by EOF measurements in capillary and confirmed by retention of a model phosphopeptide. We demonstrated that the phosphated monolith was also a strong cation exchanger of highly basic peptides. Protocols of loading and elution were also studied but need to be further optimized. Transposition of phosphopeptides enrichment by IMAC on a miniaturized system was then considered. We selected two microchip materials : PDMS is an attractive polymer for its low cost, its ease of microfabrication, its excellent working properties (biocompatibility, UV transparent with low autofluorescence) and many integration possibilities (enrichment, separation and detection) and glass microchip more common and having a good UV transparency. However, PDMS presents two major disadvantages : high absorption property, and oxygen permeability which quench free radical polymerization. Except a few attempts, this material has not been employed successfully as mould for monolith polymerization. To overcome these problems, we investigated several strategies for PDMS surface treatments such as plasma treatment and borosilicate coating. Finally, we demonstrated that our IMAC module performed well on glass microchip. This miniaturized module should be integrated in the future into a microsystem dedicated to the diagnosis of Alzheimer disease.

Key words : Microsystems, preconcentration, monoliths, IMAC, phosphorylation, PDMS, glass, CE, UV-polymerization

