



**Développement d'outils bioanalytiques miniaturisés :  
greffage de biomolécules sur monolithes en capillaire couplés  
à la nanochromatographie pour l'analyse d'échantillons  
complexes**

Fabien Brothier

► **To cite this version:**

Fabien Brothier. Développement d'outils bioanalytiques miniaturisés : greffage de biomolécules sur monolithes en capillaire couplés à la nanochromatographie pour l'analyse d'échantillons complexes. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. <NNT : 2014PA066299>. <tel-01145659>

**HAL Id: tel-01145659**

**<https://theses.hal.science/tel-01145659v1>**

Submitted on 25 Apr 2015

**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.



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE  
ED 388

Spécialité : Chimie Analytique

Présentée par  
**Fabien BROTHIER**

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

**Développement d'outils bioanalytiques miniaturisés :  
greffage de biomolécules sur monolithes en capillaire  
couplés à la nanochromatographie pour l'analyse  
d'échantillons complexes**

Thèse dirigée par Mme Valérie PICHON (Pr)

Soutenance prévue le 24 octobre 2014

Devant le jury composé de :

**M<sup>me</sup> Claire DEMESMAY**, Professeur, Université Claude Bernard Lyon1

**M. Éric PEYRIN**, Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble

**M<sup>me</sup> Gaud DERVILLY-PINEL**, Ingénieur de Recherche, ONIRIS, Nantes

**M<sup>me</sup> Claire ELFAKIR**, Professeur, Université d'Orléans

**M<sup>me</sup> Claire-Marie PRADIER**, Directeur de Recherche CNRS, UPMC, Paris

**M<sup>me</sup> Valérie PICHON**, Professeur, UPMC, Paris

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directrice de Thèse



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce manuscrit et de mon travail.

Je remercie grandement le Professeur Valérie Pichon pour m'avoir donné l'opportunité de mener ce projet de thèse sous sa direction. Valérie, je te remercie pour ton encadrement, ta réactivité, ton soutien dans les moments de doute ainsi que pour m'avoir fait partager ton expérience et tes connaissances pendant ces trois années. Je te suis extrêmement reconnaissant d'avoir pu mener ce projet de recherche dans de si bonnes conditions et de t'être toujours rendue disponible pour répondre à mes questions voire tout simplement pour discuter de sciences ou même d'autres sujets.

Je souhaite aussi remercier le Docteur Audrey Combès pour son implication dans les derniers mois de ce projet. Audrey, je te remercie pour tes conseils précieux en spectrométrie de masse et en protéomique. Je te remercie également d'avoir pris le temps de relire le dernier chapitre de ce manuscrit. Je souhaite également témoigner toute ma reconnaissance à Alizée Lemaire, élève-ingénieur de l'ESPCI ParisTech, qui a effectué, sous ma direction, un stage de deux mois dans le cadre de son projet de troisième année. Alizée, je te remercie pour ta débrouillardise, ton autonomie et ta rigueur scientifique.

Je remercie ensuite le LPEM (Laboratoire de Physique et d'Etude des Matériaux, UMR 8213 UPMC/ESPCI/CNRS) de m'avoir permis de réaliser par moi-même l'ensemble des observations par microscopie électronique à balayage. Je remercie aussi le laboratoire SIMM (Sciences et Ingénierie de la Matière Molle, UMR 7615 UPMC/ESPCI/CNRS) et notamment Mohamed Hanafi de m'avoir permis de réaliser des analyses thermogravimétriques dans leurs locaux. Je remercie enfin le Docteur Annick Méjean (Laboratoire Charles Friedel, UMR CNRS 7223, ENSCP Chimie ParisTech) pour son aide précieuse avec les cultures de cyanobactéries.

Je remercie tous les membres du LSABM (Laboratoire Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation) pour leur bonne humeur et la bonne ambiance qui règne au laboratoire. Merci plus particulièrement au Docteur Jérôme Vial d'avoir toujours pris du temps pour répondre à mes petites questions de statistiques. Enfin, je souhaite remercier tous les doctorants et post-doctorants du laboratoire que j'ai pu croiser au cours de ces trois ans, pour certains d'entre vous, plus que de simples collègues, vous êtes devenus des amis. La liste est longue, mais je remercierai tout particulièrement Lilia, Manel, Wassim, Nathaly, Ludivine, Miriam, Elodie, Joachim et Aurélien.

Une thèse pourrait peut-être ne pas se passer aussi bien sans le soutien de notre entourage. Je veux remercier mes parents et mon frère de m'avoir soutenu après tant d'années d'études et de m'avoir toujours fait confiance dans mes choix. Je souhaite remercier mes amis les plus proches parmi lesquels Morgane pour avoir toujours été là, pour nos japonais, nos discussions et nos plaintes, Marie-Caroline et Anne-Claire pour être restées présentes malgré la distance ou nos emplois du temps chargés, Stéphane pour tes conseils et ton soutien mais aussi mes camarades de la Estupidez qui m'ont permis de m'aérer l'esprit à travers nos formidables aventures théâtrales.

Enfin, après avoir passé sept ans à l'ESPCI ParisTech, c'est avec un léger pincement au cœur que je clos ce chapitre de ma vie. L'école était devenue incontestablement mon deuxième chez-moi. Je souhaite le meilleur à l'ensemble des membres de ma promotion, thésards et non thésards, et à toutes les personnes que j'ai été amené à côtoyer pendant ces sept années.



# TABLE DES MATIÈRES

|                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>                                                | <b>5</b>  |
| <b>Liste des publications et communications .....</b>                          | <b>11</b> |
| <b>Abréviations .....</b>                                                      | <b>14</b> |
| <b>Introduction générale .....</b>                                             | <b>17</b> |
| <b>Chapitre 1 – Analyse de traces dans les matrices complexes.....</b>         | <b>21</b> |
| 1 Introduction .....                                                           | 22        |
| 2 L'extraction sur phase solide .....                                          | 23        |
| 2.1 Principe.....                                                              | 23        |
| 2.2 Paramètres clés de l'extraction sur phase solide .....                     | 24        |
| 2.2.1 Volume de fin de fixation.....                                           | 24        |
| 2.2.2 La capacité .....                                                        | 25        |
| 2.3 Couplage de l'extraction sur phase solide aux techniques séparatives ..... | 25        |
| 2.3.1 Extraction en différé .....                                              | 25        |
| 2.3.2 Extraction en ligne .....                                                | 27        |
| 2.4 Phases utilisées en SPE.....                                               | 28        |
| 2.4.1 Les phases polaires .....                                                | 28        |
| 2.4.2 Les phases apolaires .....                                               | 29        |
| 2.4.3 Les phases à échange d'ions .....                                        | 29        |
| 2.4.4 Les phases à mécanismes mixtes.....                                      | 30        |
| 2.4.4.1 Les phases mixtes .....                                                | 30        |
| 2.4.4.2 Les phases à accès restreint .....                                     | 31        |
| 2.4.4.3 Les supports à particules de grande dimension .....                    | 31        |
| 2.4.5 Limitation des phases conventionnelles.....                              | 32        |
| 3 Les outils sélectifs à reconnaissance moléculaire.....                       | 33        |
| 3.1 Outils biomimétiques : les polymères à empreintes moléculaires .....       | 34        |
| 3.1.1 Synthèse.....                                                            | 34        |
| 3.1.2 Application en SPE .....                                                 | 35        |
| 3.1.3 Avantages.....                                                           | 36        |
| 3.1.4 Inconvénients.....                                                       | 37        |
| 3.2 Outils biologiques pour l'extraction sélective .....                       | 37        |
| 3.2.1 Les immunoabsorbants (IS).....                                           | 38        |
| 3.2.1.1 Les anticorps.....                                                     | 38        |
| a Structure .....                                                              | 38        |
| b Production.....                                                              | 39        |
| 3.2.1.2 Immobilisation des anticorps .....                                     | 41        |
| a Les supports d'immobilisation .....                                          | 41        |
| b Méthodes d'immobilisation.....                                               | 42        |
| 3.2.1.3 Procédures d'immunoextraction.....                                     | 45        |
| a Développement d'une procédure en différé.....                                | 45        |
| a-1 Nature de l'échantillon percolé et étape de lavage.....                    | 45        |
| a-2 Conditions d'élution.....                                                  | 46        |
| b Contrôle de la sélectivité de la procédure d'immunoextraction .....          | 47        |
| c Couplage en ligne.....                                                       | 47        |
| 3.2.1.4 Caractéristiques des immunoabsorbants.....                             | 50        |

|         |                                                              |    |
|---------|--------------------------------------------------------------|----|
| a       | Taux de greffage.....                                        | 50 |
| b       | Capacité.....                                                | 52 |
| c       | Rendements d'extraction.....                                 | 53 |
| d       | Réactivité croisée et spécificité.....                       | 54 |
| 3.2.1.5 | Régénération et réutilisation.....                           | 54 |
| 3.2.1.6 | Apport en sélectivité des immunoadsorbants.....              | 55 |
| a       | Immunoadsorbants appliqués aux petites molécules .....       | 55 |
| b       | Immunoadsorbants appliqués aux protéines .....               | 57 |
| 3.2.2   | Les oligoadsorbants (OS).....                                | 59 |
| 3.2.2.1 | Les aptamères.....                                           | 59 |
| a       | Structure.....                                               | 59 |
| a-1     | Structure primaire .....                                     | 60 |
| a-2     | Structure secondaire .....                                   | 61 |
| a-3     | Structure tertiaire.....                                     | 62 |
| b       | La sélection des aptamères.....                              | 62 |
| b-1     | Principe général de la sélection in vitro .....              | 62 |
| b-2     | Les bibliothèques d'oligonucléotides.....                    | 63 |
| b-3     | Etape de sélection .....                                     | 64 |
| b-4     | Etape d'amplification .....                                  | 66 |
| b-5     | Automatisation et miniaturisation du procédé SELEX.....      | 67 |
| c       | Caractéristiques des aptamères.....                          | 67 |
| 3.2.2.2 | Immobilisation des aptamères .....                           | 68 |
| a       | Immobilisation non-covalente .....                           | 69 |
| b       | Immobilisation covalente.....                                | 69 |
| 3.2.2.3 | Procédure d'oligoextraction .....                            | 70 |
| a       | Nature de l'échantillon percolé .....                        | 73 |
| b       | Conditions d'élution.....                                    | 74 |
| c       | Contrôle de la sélectivité de la procédure d'extraction..... | 74 |
| 3.2.2.4 | Potentiel des Oligoadsorbants.....                           | 75 |
| a       | Capacité et densité d'immobilisation .....                   | 75 |
| b       | Rendements d'extraction.....                                 | 78 |
| c       | Réactivité croisée .....                                     | 79 |
| 3.2.2.5 | Apport en sélectivité des oligoadsorbants .....              | 80 |
| a       | Oligoadsorbants appliqués aux petites molécules.....         | 80 |
| b       | Oligoadsorbants appliqués aux protéines.....                 | 81 |
| 3.2.2.6 | Régénération et réutilisation.....                           | 82 |
| 3.2.3   | Conclusions .....                                            | 83 |
| 4       | Miniaturisation des outils analytiques.....                  | 84 |
| 4.1     | Modes de contrôle de l'écoulement et phases utilisées.....   | 85 |
| 4.1.1   | Contrôle de l'écoulement dans les systèmes miniaturisés..... | 85 |
| 4.1.1.1 | Intérêt de l'approche électrocinétique.....                  | 85 |
| 4.1.1.2 | Intérêt de l'approche hydrodynamique.....                    | 87 |
| 4.1.2   | Les phases utilisées dans les systèmes miniaturisés.....     | 88 |
| 4.1.2.1 | Approches en tube ouvert .....                               | 88 |
| 4.1.2.2 | Phases basées sur des structures microfabriquées .....       | 90 |
| 4.1.2.3 | Phases particulières .....                                   | 91 |
| a       | Conditionnement dans des colonnes capillaires.....           | 91 |
| b       | Conditionnement dans les canaux de microsystèmes.....        | 92 |
| 4.1.2.4 | Phases monolithiques.....                                    | 93 |
| a       | Les monolithes organiques .....                              | 94 |
| b       | Les monolithes inorganiques .....                            | 95 |

|                                                                                         |                                                             |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2                                                                                     | Miniaturisation des supports de SPE conventionnels .....    | 96         |
| 4.3                                                                                     | Miniaturisation des outils bioanalytiques .....             | 99         |
| 5                                                                                       | Conclusion.....                                             | 110        |
| <b>Chapitre 2 – Synthèse d'un monolithe organique-inorganique par voie sol-gel.....</b> |                                                             | <b>113</b> |
| 1                                                                                       | Introduction .....                                          | 114        |
| 1.1                                                                                     | Le procédé sol-gel.....                                     | 115        |
| 1.2                                                                                     | Présentation du monolithe hybride choisi .....              | 116        |
| 2                                                                                       | Matériels et méthodes.....                                  | 118        |
| 2.1                                                                                     | Procédé de synthèse <i>in situ</i> en capillaire .....      | 118        |
| 2.1.1                                                                                   | Activation des parois du capillaire .....                   | 118        |
| 2.1.2                                                                                   | Synthèse et remplissage des capillaires.....                | 119        |
| 2.1.3                                                                                   | Etape de vieillissement .....                               | 120        |
| 2.2                                                                                     | Lavage.....                                                 | 120        |
| 2.3                                                                                     | Caractérisation des monolithes.....                         | 121        |
| 2.3.1                                                                                   | Microscopie optique et électronique à balayage .....        | 121        |
| 2.3.2                                                                                   | Mesures de perméabilité .....                               | 121        |
| 2.3.3                                                                                   | Analyses thermiques.....                                    | 122        |
| 3                                                                                       | Optimisation du protocole de synthèse en capillaire .....   | 123        |
| 3.1                                                                                     | Essais préliminaires .....                                  | 124        |
| 3.2                                                                                     | Etude du temps de gel.....                                  | 125        |
| 3.2.1                                                                                   | Effet de la teneur en eau .....                             | 126        |
| 3.2.2                                                                                   | Effet du ratio TEOS/APTES .....                             | 128        |
| 3.3                                                                                     | Optimisation du remplissage des capillaires .....           | 129        |
| 3.4                                                                                     | Vieillissement .....                                        | 130        |
| 3.5                                                                                     | Efficacité de l'élimination du porogène .....               | 132        |
| 3.6                                                                                     | Conclusion .....                                            | 135        |
| 4                                                                                       | Caractérisation du monolithe obtenu.....                    | 135        |
| 4.1                                                                                     | Répétabilité de la synthèse .....                           | 136        |
| 4.2                                                                                     | Paramètres jouant sur la macroporosité.....                 | 137        |
| 4.2.1                                                                                   | Influence de la température du mélange réactionnel.....     | 137        |
| 4.2.2                                                                                   | Influence du tensioactif .....                              | 139        |
| 5                                                                                       | Conclusions .....                                           | 141        |
| <b>Chapitre 3 – Développement d'un immunoabsorbant miniaturisé (mIS) .....</b>          |                                                             | <b>143</b> |
| 1                                                                                       | Introduction .....                                          | 144        |
| 2                                                                                       | Une molécule modèle : la microcystine-LR.....               | 145        |
| 2.1                                                                                     | Origine .....                                               | 145        |
| 2.2                                                                                     | Structure.....                                              | 145        |
| 2.3                                                                                     | Propriétés physico-chimiques .....                          | 146        |
| 2.4                                                                                     | Toxicité .....                                              | 146        |
| 2.5                                                                                     | Extraction et analyse .....                                 | 147        |
| 2.5.1                                                                                   | Extraction et purification des échantillons .....           | 147        |
| 2.5.1.1                                                                                 | Extraction des microcystines du milieu intracellulaire..... | 147        |
| 2.5.1.2                                                                                 | Extraction et purification des échantillons aqueux .....    | 148        |
| 2.5.2                                                                                   | Méthodes séparatives et détection.....                      | 148        |
| 3                                                                                       | Protocole expérimental .....                                | 149        |
| 3.1                                                                                     | Immobilisation des anticorps monoclonaux .....              | 149        |
| 3.2                                                                                     | Méthode d'analyse et étalonnage .....                       | 150        |
| 3.3                                                                                     | Montage expérimental.....                                   | 151        |
| 4                                                                                       | Immunoextraction sélective en eau pure.....                 | 152        |
| 4.1                                                                                     | Essais préliminaires .....                                  | 153        |



|                                                                                                   |                                                                        |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2                                                                                               | Développement d'un protocole d'extraction sélective.....               | 154        |
| 4.3                                                                                               | Evaluation de la répétabilité.....                                     | 156        |
| 4.4                                                                                               | Détermination de la capacité et du taux de greffage.....               | 157        |
| 4.4.1                                                                                             | Capacité des mIS .....                                                 | 157        |
| 4.4.2                                                                                             | Evaluation du taux de greffage .....                                   | 160        |
| 4.5                                                                                               | Réactivité croisée.....                                                | 161        |
| 5                                                                                                 | Application à des échantillons réels.....                              | 163        |
| 5.1                                                                                               | Immunoextraction à partir d'extraits de cyanobactéries.....            | 163        |
| 5.2                                                                                               | Immunoextraction à partir d'eaux environnementales .....               | 167        |
| 6                                                                                                 | Régénération et réutilisation .....                                    | 173        |
| 7                                                                                                 | Transposition à d'autres molécules .....                               | 173        |
| 8                                                                                                 | Conclusions .....                                                      | 175        |
| <b>Chapitre 4 – Développement d'un oligoadsorbant miniaturisé (mOS) .....</b>                     |                                                                        | <b>177</b> |
| 1                                                                                                 | Introduction .....                                                     | 178        |
| 2                                                                                                 | Présentation de la molécule modèle .....                               | 179        |
| 2.1                                                                                               | Origine .....                                                          | 179        |
| 2.2                                                                                               | Structure et propriétés physico-chimiques .....                        | 180        |
| 2.3                                                                                               | Toxicité.....                                                          | 180        |
| 2.4                                                                                               | Méthodes de purification et d'analyses de l'OTA .....                  | 182        |
| 2.4.1                                                                                             | Méthodes d'extraction de l'OTA en amont de l'analyse .....             | 182        |
| 2.4.2                                                                                             | Méthodes d'analyses par chromatographie .....                          | 182        |
| 3                                                                                                 | Protocole expérimental.....                                            | 183        |
| 3.1                                                                                               | Choix de l'aptamère.....                                               | 183        |
| 3.2                                                                                               | Immobilisation des aptamères .....                                     | 184        |
| 3.3                                                                                               | Méthode d'analyse et étalonnage.....                                   | 186        |
| 3.4                                                                                               | Montage expérimental .....                                             | 187        |
| 4                                                                                                 | Oligoextraction sélective en milieu pur .....                          | 188        |
| 4.1                                                                                               | Essais préliminaires.....                                              | 188        |
| 4.2                                                                                               | Développement d'un protocole d'extraction sélective.....               | 189        |
| 4.3                                                                                               | Evaluation de la répétabilité.....                                     | 191        |
| 4.4                                                                                               | Evaluation de la réactivité croisée de l'aptamère .....                | 192        |
| 4.5                                                                                               | Détermination de la capacité et du taux de greffage.....               | 194        |
| 4.5.1                                                                                             | Evaluation du taux de greffage .....                                   | 194        |
| 4.5.1.1                                                                                           | Méthode de dosage .....                                                | 194        |
| 4.5.1.2                                                                                           | Résultats .....                                                        | 196        |
| 4.5.2                                                                                             | Capacité.....                                                          | 198        |
| 5                                                                                                 | Application à des échantillons réels.....                              | 200        |
| 6                                                                                                 | Régénération et réutilisation .....                                    | 204        |
| 7                                                                                                 | Conclusions .....                                                      | 204        |
| <b>Chapitre 5 – Développement de microréacteurs enzymatiques pour l'analyse de protéines.....</b> |                                                                        | <b>207</b> |
| 1                                                                                                 | Introduction .....                                                     | 208        |
| 2                                                                                                 | Une protéine modèle : le cytochrome C .....                            | 211        |
| 2.1                                                                                               | Origine et fonctions .....                                             | 211        |
| 2.2                                                                                               | Structure et propriétés physico-chimiques .....                        | 212        |
| 3                                                                                                 | Développement d'un IMER à base de pepsine .....                        | 213        |
| 3.1                                                                                               | Mise au point de l'analyse par nanoLC-MS/MS.....                       | 213        |
| 3.1.1                                                                                             | Présentation de la source nanoESI et du spectromètre de masse .....    | 213        |
| 3.1.2                                                                                             | Analyse d'un mélange peptidique et identification du cytochrome C..... | 217        |
| 3.1.3                                                                                             | Optimisation de la fragmentation de peptides cibles.....               | 221        |

|         |                                                                           |            |
|---------|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.1.4   | Optimisation du <i>skimmer offset</i> .....                               | 224        |
| 3.1.5   | Répétabilité des analyses.....                                            | 225        |
| 3.1.6   | Linéarité de la méthode de quantification développée .....                | 226        |
| 3.2     | Caractérisation de la précolonne de piégeage.....                         | 227        |
| 3.2.1   | Présentation du montage .....                                             | 228        |
| 3.2.2   | Optimisation d'un protocole de piégeage des peptides.....                 | 229        |
| 3.3     | Immobilisation de pepsine .....                                           | 231        |
| 3.4     | Caractérisation des IMER de pepsine.....                                  | 233        |
| 3.4.1   | Détermination du taux de greffage .....                                   | 233        |
| 3.4.1.1 | Rappel du principe.....                                                   | 233        |
| 3.4.1.2 | Cas d'une immobilisation en présence de réducteur.....                    | 234        |
| 3.4.1.3 | Cas d'une immobilisation avec étape de réduction ultérieure .....         | 235        |
| 3.4.2   | Présentation du montage .....                                             | 236        |
| 3.4.3   | Digestions en ligne sur IMER de pepsine à pH 2,0.....                     | 237        |
| 3.4.3.1 | Optimisation de la durée du <i>stop flow</i> .....                        | 237        |
| 3.4.3.2 | Comparaison des digestions en ligne et des digestions en solution ...     | 238        |
| a       | Digestions en solution à pH 2,0 à quantité de pepsine fixée.....          | 238        |
| b       | Digestions sur IMER à pH 2,0 .....                                        | 239        |
| 3.4.3.3 | Stabilité du support .....                                                | 241        |
| 3.4.4   | Digestions en ligne sur IMER de pepsine à pH 3,0.....                     | 244        |
| 3.4.5   | Conclusions .....                                                         | 245        |
| 4       | Caractérisation d'un IMER de trypsine .....                               | 246        |
| 4.1     | Mise au point de l'analyse par nanoLC-MS <sup>2</sup> .....               | 246        |
| 4.2     | Analyse d'un digestat tryptique après digestion en solution.....          | 248        |
| 4.3     | Caractérisation de l'IMER de trypsine .....                               | 249        |
| 5       | Conclusions et perspectives.....                                          | 251        |
|         | <b>Conclusion générale et perspectives .....</b>                          | <b>253</b> |
|         | <b>Références bibliographiques .....</b>                                  | <b>255</b> |
|         | <b>Annexe 1 : Microscopie électronique à balayage.....</b>                | <b>277</b> |
|         | <b>Annexe 2 : Matériel analytique utilisé.....</b>                        | <b>278</b> |
|         | <b>Annexe 3 : Procédure d'immobilisation de biomolécules.....</b>         | <b>281</b> |
|         | <b>Annexe 4 : Méthodes d'analyse chromatographique.....</b>               | <b>286</b> |
|         | <b>Annexe 5 : Méthode de dosage des protéines au BCA .....</b>            | <b>289</b> |
|         | <b>Annexe 6 : Méthode d'analyse chromatographique des aptamères .....</b> | <b>291</b> |
|         | <b>Annexe 7 : Préparation des échantillons réels .....</b>                | <b>292</b> |
|         | <b>Annexe 8 : Protocoles de digestion en solution .....</b>               | <b>294</b> |
|         | <b>Annexe 9 : Rapports MASCOT.....</b>                                    | <b>296</b> |
|         | <b>Liste des figures et des tableaux .....</b>                            | <b>299</b> |



# Liste des publications et communications

## PUBLICATIONS

### Publications dans des revues internationales

**“Immobilized antibody on a hybrid organic-inorganic monolith: capillary immunoextraction coupled on-line to nanoLC-UV for the analysis of microcystin-LR”**, F. Brothier, V. Pichon, *Analytica Chimica Acta*, Volume 792, 20 Août 2013, Pages 52-58

**“Miniaturized DNA aptamer-based monolithic sorbent for selective extraction of a target analyte coupled on-line to nanoLC”**, F. Brothier, V. Pichon, *Article soumis*

**“Aptamer-based sorbents in sample treatment: A Review”**, V. Pichon, F. Brothier, A. Combès, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *Article accepté*

### Publications dans des revues nationales

**“Miniaturisation de supports à base d’anticorps et d’aptamères pour l’analyse de traces”**, F. Brothier, V. Pichon, *L’Actualité Chimique*, *Article accepté*

**“Nouvelles tendances pour la préparation de l’échantillon : apport des phases sélectives et de la miniaturisation”**, F. Brothier, A. Combès, V. Pichon, *Revue de la SECF (Société des Experts Chimiques de France)*, *Article accepté*

## COMMUNICATIONS ORALES

### Conférences présentées

#### *Symposiums internationaux*

**F. Brothier**, V. Pichon. « *Miniaturization of selective sorbents : antibody- and aptamer-modified monoliths coupled on-line with nanoLC* », HTC-13, 13<sup>th</sup> International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology, Jan 28 - 31, 2014. Bruges, Belgique

**F. Brothier**, W. Hadj Ali, V. Pichon. “*Potential of aptamers for the development of selective SPE sorbents : synthesis, characterization and applications to biological fluids and food samples*”, ISC 2012, International Symposium on Chromatography, 9-13 septembre 2012. Torun, Pologne

### *Symposiums nationaux*

**F. Brothier**, A. Combès, V. Pichon. *“Outils bioanalytiques miniaturisés pour l’analyse d’échantillons complexes en nanochromatographie”*, Afsep-Club Jeune, 7-8 juillet 2014. Paris, France

**F. Brothier**, V. Pichon. *“Miniaturization of bioanalytical tools for trace analysis in nano chromatography”*, Club Microfluidique, IPGG (Institut Pierre-Gilles de Gennes de microfluidique), 15 mai 2014. Paris, France

**F. Brothier**, W. Hadj Ali, V. Pichon. *“Miniaturisation de supports sélectifs: couplage en ligne d’immuno- et oligoadsorbants avec la nanoLC”*, SEP’13 (10<sup>ème</sup> Congrès francophone sur les sciences séparatives), 4-7 juin 2013. Paris, France

**F. Brothier**, W. Hadj Ali, V. Pichon. *“Approche miniaturisée de l’analyse de traces: couplage en ligne d’immunoabsorbants à la nanoLC”*, Afsep-Club Ile de France, 29 novembre 2012. Paris, France

### Autres conférences

V. Pichon, **F. Brothier**, A Combès. *“Miniaturized and selective sample pretreatment devices for the trace analysis of target analytes in complex samples”*, ISC 2014, International Symposium on Chromatography, 14-18 septembre 2014. Salsburg, Autriche

V. Pichon, A. Combès, **F. Brothier**, W Hadj Ali. *“Development of selective extraction sorbents from the macro- to the micro-scale for the trace analysis in complex media”*, Drug analysis, 22-25 juin 2014. Liège, Belgique

V. Pichon, A Combes, **F. Brothier**. *“Biological and biomimetic approach for selective sample pretreatment : development and application to trace analysis in real samples and hyphenation with miniaturized analytical devices”*, HTC-13, 13<sup>th</sup> International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology, Jan 28 - 31, 2014. Bruges, Belgique

V. Pichon, **F. Brothier**, W. Hadj Ali. *“Miniaturization of selective extraction sorbents for their on-line coupling with capillary chromatography or their introduction on chip”*, HPLC, International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and related techniques, 16-20 juin 2013. Amsterdam, Pays-Bas

V. Pichon, **F. Brothier**, W. Hadj Ali. *“Miniaturization of selective extraction devices for their on-line coupling with capillary chromatography”*, Extech 2012, 24-26 septembre 2012. Messine, Sicile, Italie

V. Pichon, **F. Brothier**, W. Hadj Ali. *“Potential of MIP for the selective extraction of compounds from real samples: synthesis, characterization, applications and comparison with immunosorbents and aptamer-based sorbents”*, MIP 2012, International Symposium on Molecularly Imprinted Polymers, 25-29 août 2012. Paris, France

### **COMMUNICATIONS PAR AFFICHE**

**F. Brothier, V. Pichon.** *“Miniaturized oligosorbents coupled on-line with nanoLC: synthesis, characterization and applications to complex matrices”*, ISC 2014, International Symposium on Chromatography, 14-18 septembre 2014. Salsburg, Autriche

**F. Brothier, A. Combès, V. Pichon.** *“Total on-line analysis of a target protein by miniaturized immunoextraction and digestion coupled on-line to nanoLC-MS/MS”*, ISC 2014, International Symposium on Chromatography, 14-18 septembre 2014. Salsburg, Autriche

**F. Brothier, V. Pichon.** *“Miniaturization of bioanalytical tools coupled on-line with nanoLC for the analysis of pollutants in the environment”*, 4<sup>ème</sup> colloque de la Fédération Gay-Lussac, 4-6 décembre 2013. Paris, France

**F. Brothier, V. Pichon.** *“Miniaturized immunosorbents coupled on-line with nanoLC: synthesis, characterization and applications to environmental samples”*, HPLC, International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and related techniques, 16-20 juin 2013. Amsterdam, Pays-Bas

**F. Brothier, V. Pichon.** *“Development of a hybrid organic-inorganic monolithic capillary precolumn grafted with antibodies for the total on-line analysis of microcystins by immunoextraction and nano-liquid chromatography”*, ISC 2012, International Symposium on Chromatography, 9-13 septembre 2012. Torun, Pologne

## Abréviations

|                                                               |                                                                              |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ACE</b> : antigène carcino-embryonnaire                    | <b>DTG</b> : derivative thermogravimetry                                     |
| <b>ACN</b> : acétonitrile                                     | <b>DVB</b> : divinylbenzène                                                  |
| <b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique                        | <b>EDMA</b> : éthylènediméthacrylate                                         |
| <b>ADECA</b> : amino density estimation by colorimetric assay | <b>EDTA</b> : éthylène diamine tétra acétique                                |
| <b>AFB1</b> : aflatoxine B1                                   | <b>EG</b> : éthoxyglycol                                                     |
| <b>AGP</b> : alpha-1 glycoprotéine acide                      | <b>EGDMA</b> : éthylène glycol diméthacrylate                                |
| <b>AMP</b> : Adénosine monophosphate                          | <b>ESI</b> : ionisation par électrospray                                     |
| <b>APTES</b> : aminopropyltriéthoxysilane                     | <b>FID</b> : détecteur à ionisation de flammes                               |
| <b>ARN</b> : acide ribonucléique                              | <b>FITC</b> : isothiocyanate de fluorescéine                                 |
| <b>ATD</b> : analyse thermodifférentielle                     | <b>Fluo</b> : fluorescence                                                   |
| <b>ATG</b> : analyse thermogravimétrique                      | <b>FSH</b> : hormone folliculostimulante                                     |
| <b>ATP</b> : adénosine triphosphate                           | <b>GC</b> : chromatographie en phase gazeuse                                 |
| <b>BB</b> : binding buffer (tampon de liaison)                | <b>GFP</b> : green fluorescent protein                                       |
| <b>BCA</b> : Bicinchoninic Acid Assay                         | <b>GMA</b> : glycidyl méthacrylate                                           |
| <b>BPA</b> : bisphénol A                                      | <b>GnRH</b> : hormone de libération des gonadotropines                       |
| <b>BSA</b> : bovine serum albumin                             | <b>HCV</b> : virus de l'hépatite C                                           |
| <b>C12</b> : dodecyl                                          | <b>HEMA</b> : 2-hydroxyéthyl méthacrylate                                    |
| <b>C18</b> : octadecyl                                        | <b>HESI</b> : heated electrospray ionization                                 |
| <b>C6</b> : hexyl                                             | <b>HILIC</b> : hydrophilic interaction chromatography                        |
| <b>C8</b> : octyl                                             | <b>His-tag</b> : polyhistidine-tag                                           |
| <b>CAP</b> : chloramphénicol                                  | <b>HIV-1 RT</b> : human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase       |
| <b>CE</b> : capillary electrophoresis                         | <b>HPLC</b> : chromatographie en phase liquide à haute performance           |
| <b>CEA</b> : carcinoembryonic antigen                         | <b>HRP</b> : peroxydase de raifort                                           |
| <b>CEC</b> : capillary electrochromatography                  | <b>HSA</b> : sérum albumine humaine                                          |
| <b>CHO</b> : cellule ovarienne de hamster chinois             | <b>Ialp</b> : protéine inter-alpha inhibiteur                                |
| <b>CIM®</b> : Convective Interaction Media                    | <b>ICP</b> : inductively coupled plasma                                      |
| <b>CMC</b> : concentration micellaire critique                | <b>IMER</b> : immobilized enzyme reactor                                     |
| <b>CNBr</b> : bromure de cyanogène                            | <b>IMS</b> : ionisation par électrospray – spectrométrie de mobilité ionique |
| <b>COMOSS</b> : collocated monolith support structures        | <b>Ig</b> : immunoglobuline                                                  |
| <b>CRP</b> : protéine C-réactive                              | <b>IgE</b> : immunoglobuline de classe E                                     |
| <b>CTAB</b> : bromure de cetyltriméthylammonium               | <b>IgG</b> : immunoglobuline de classe G                                     |
| <b>cTn1</b> : troponine cardiaque 1                           | <b>IgM</b> : immunoglobuline de classe M                                     |
| <b>C.V.</b> : coefficient de variation                        | <b>IPr.</b> : Isopropanol                                                    |
| <b>CYC</b> : cytochrome C                                     | <b>IS</b> : immunoabsorbant                                                  |
| <b>DADPA</b> : diaminodipropylamine                           |                                                                              |
| <b>d.i.</b> : diamètre interne                                |                                                                              |
| <b>DoOH</b> : dodécanol                                       |                                                                              |

|                                                                                                                                            |                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>LC</b> : chromatographie en phase liquide                                                                                               | <b>PP</b> : précipitation de protéines                                         |
| <b>LH</b> : hormone lutéinisante                                                                                                           | <b>PS</b> : polystyrène                                                        |
| <b>LIF</b> : fluorescence induite par laser                                                                                                | <b>PTFE</b> : polytétrafluoroéthylène                                          |
| <b>LLE</b> : extraction liquide-liquide                                                                                                    | <b>RAM</b> : restricted access material                                        |
| <b>LOD</b> : limite de détection                                                                                                           | <b>RMN</b> : résonance magnétique nucléaire                                    |
| <b>LOQ</b> : limite de quantification                                                                                                      | <b>SDS-PAGE</b> : sodium dodecyl sulfate<br>polyacrylamide gel electrophoresis |
| <b>LPS</b> : large particle support                                                                                                        | <b>SELEX</b> : systematic evolution of ligands by<br>exponential enrichment    |
| <b>LSABM</b> : Laboratoire Sciences Analytiques,<br>Bioanalytiques et Miniaturisation (laboratoire<br>où ce projet de thèse a été réalisé) | <b>SH</b> : Thiol                                                              |
| <b>MALDI</b> : matrix-assisted laser<br>desorption/ionisation                                                                              | <b>S/N</b> : rapport signal sur bruit                                          |
| <b>MC-LR</b> : microcystine-LR                                                                                                             | <b>SPE</b> : extraction sur phase solide                                       |
| <b>MC-RR</b> : microcystine-RR                                                                                                             | <b>SPME</b> : microextraction sur phase solide                                 |
| <b>MEB</b> : microscopie électronique à balayage                                                                                           | <b>SR454</b> : Ethoxylated trimethylolpropane<br>triacylate                    |
| <b>MEKC</b> : chromatographie micellaire<br>électrocinétique                                                                               | <b>TEOS</b> : tétraéthoxysilane                                                |
| <b>mNP</b> : nanoparticules magnétiques                                                                                                    | <b>TFA</b> : acide trifluoroacétique                                           |
| <b>MNS</b> : nanosphère magnétique                                                                                                         | <b>TMOS</b> : tetraméthoxysilane                                               |
| <b>MeOH</b> : méthanol                                                                                                                     | <b>TOF</b> : time-of-flight mass spectrometry                                  |
| <b>MIP</b> : polymère à empreintes moléculaires                                                                                            | <b>TRF</b> : fluorescence résolue en temps                                     |
| <b>mIS</b> : immunoabsorbant miniaturisé                                                                                                   | <b>TRIM</b> : triméthylolpropane triméthacrylate                               |
| <b>mOS</b> : oligoabsorbant miniaturisé                                                                                                    | <b>Tris</b> : tris(hydroxyméthyl)aminométhane                                  |
| <b>MS</b> : spectrométrie de masse                                                                                                         | <b>TSH</b> : hormone de stimulation de la thyroïde                             |
| <b>MW</b> : poids moléculaire                                                                                                              | <b>TTF1</b> : Thyroid transcription factor-1                                   |
| <b>nanoLC</b> : nanochromatographie liquide                                                                                                | <b>UV</b> : ultraviolet                                                        |
| <b>NCS</b> : billes de silice-isothiocyanate                                                                                               | <b>VDA</b> : 2-vinyl-4,4-diméthylazlactone                                     |
| <b>NHS</b> : N-Hydroxysuccinimide                                                                                                          | <b>V<sub>f</sub></b> : volume de fin de fixation                               |
| <b>NIP</b> : polymère non-imprimé                                                                                                          | <b>V<sub>r</sub></b> : volume de rétention                                     |
| <b>NP</b> : nanoparticules                                                                                                                 |                                                                                |
| <b>NT-proBNP</b> : peptide pro-natriurétique N-<br>terminal                                                                                |                                                                                |
| <b>OS</b> : oligoabsorbant                                                                                                                 |                                                                                |
| <b>OTA</b> : ochratoxine A                                                                                                                 |                                                                                |
| <b>OTB</b> : ochratoxine B                                                                                                                 |                                                                                |
| <b>PBS</b> : phosphate buffered saline                                                                                                     |                                                                                |
| <b>PCR</b> : polymerase chain reaction                                                                                                     |                                                                                |
| <b>PDMS</b> : polydiméthylsiloxane                                                                                                         |                                                                                |
| <b>PEG</b> : polyéthylèneglycol                                                                                                            |                                                                                |
| <b>PEGDA</b> : polyéthylèneglycoldiacrylate                                                                                                |                                                                                |
| <b>PGC</b> : porous graphitic carbon                                                                                                       |                                                                                |
| <b>PGDMA</b> : polyglycidyl diméthacrylate                                                                                                 |                                                                                |
| <b>PMMA</b> : poly(méthylméthacrylate)                                                                                                     |                                                                                |





# Introduction générale

Le chimiste analyste est confronté à de nombreux défis dans divers domaines d'applications (environnemental, agroalimentaire, biomédical, toxicologique, etc) du fait du très grand nombre de composés à analyser qui sont le plus souvent présents à l'état de traces dans des matrices extrêmement complexes. Cette demande sociétale a ainsi conduit à l'amélioration des techniques de séparation chromatographique et électrophorétique existantes ainsi que le développement de détecteurs de plus en plus sensibles et sélectifs tels que les spectromètres de masse. Le couplage des techniques séparatives sus-citées avec la spectrométrie de masse a notamment permis l'accomplissement de progrès considérables pour l'analyse de composés à l'état de traces. Toutefois, l'analyse de traces dans des échantillons complexes nécessite encore le plus souvent une étape de traitement de l'échantillon. Cette étape est cependant souvent négligée, alors qu'elle est une source d'erreurs importante et peut représenter plus de 60 % du temps de l'analyse. Elle permet pourtant d'augmenter grandement les performances des méthodes analytiques car elle induit une forte préconcentration des analytes tout en permettant de purifier l'échantillon de manière à s'affranchir des nombreux effets de matrice pouvant survenir, y compris en spectrométrie de masse.

Parmi les techniques de traitement de l'échantillon disponibles, l'extraction sur phase solide (SPE, *Solid Phase Extraction*) est apparue comme un outil puissant pour le développement de méthodes d'analyse de composés à l'état de traces. De nombreux types de supports tels que des silices greffées ou des phases polymériques ont été développés de manière à extraire et préconcentrer les analytes par interactions hydrophobes et/ou électrostatiques. Cependant ces supports se révèlent être peu sélectifs et de nombreux composés interférents peuvent être co-extraits par ceux-ci pouvant engendrer des erreurs dues à des co-élutions lors de l'étape de séparation ou à des effets de matrices affectant la détection. Ce problème d'interférences concerne tous les types de matrices, qu'elles soient environnementales, alimentaires ou biologiques. Pour pallier ce manque de sélectivité, des supports d'extraction sélective basés sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire ont été récemment développés.

Une première approche peut consister à utiliser des polymères à empreintes moléculaires (MIP, *Molecularly Imprinted Polymer*) possédant à leur surface des cavités présentant une complémentarité stérique et fonctionnelle à l'analyte cible qui permettent ainsi de ne retenir que cet analyte ou des analogues structuraux. La synthèse des MIP s'avère relativement facile et rapide. Cependant, le coût de synthèse peut se révéler élevé pour des molécules onéreuses et des problèmes de relargage de la molécule empreinte peuvent survenir pouvant être source d'erreurs. Les procédures d'extraction associées à ces supports peuvent également être longues et fastidieuses à développer.

La deuxième approche peut consister à utiliser des supports basés sur l'immobilisation de biomolécules : les immunoadsorbants (IS) et les oligoadsorbants (OS). Un IS est un support d'extraction constitué d'anticorps immobilisés sur un support solide et dirigés contre un antigène, l'analyte cible. La très forte affinité de l'interaction antigène-anticorps fondée sur une reconnaissance stérique et fonctionnelle confère aux IS une sélectivité très élevée. Toutefois, le coût des anticorps, leur durée de synthèse (de 6 mois à un an) et leur durée de régénération élevée (24h-48h) peut représenter un facteur très limitant. Un OS, quant à lui, est basé sur l'immobilisation d'aptamères qui sont des oligonucléotides de longueur comprise entre 20 et 60 bases dont certaines séquences peuvent présenter une très forte affinité pour un analyte cible. Les aptamères ont pour principal avantage de pouvoir être synthétisés par voie chimique *via* une méthode combinatoire de sélection *in vitro* appelée SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) et de pouvoir être rapidement régénérés contrairement aux anticorps. Ces deux outils bioanalytiques constituent donc encore à l'heure actuelle des approches d'extraction complémentaires.

La miniaturisation de l'ensemble des étapes nécessaires à l'analyse (traitement de l'échantillon, séparation et détection) suscite aujourd'hui un grand intérêt car elle doit permettre le développement de systèmes portatifs permettant de mener des analyses de terrain ou de répondre à la demande des laboratoires en termes de réduction des coûts et de volumes d'échantillons requis. La miniaturisation des systèmes séparatifs a déjà fait l'objet de nombreuses études, notamment par le développement de microsystèmes associés à des séparations en mode électrocinétique. Cependant, ces microsystèmes sont le plus souvent appliqués à des molécules marquées dans des échantillons purs avec des modes de détection simples tels que l'UV ou la fluorescence. Les faibles volumes injectés dans des systèmes de si faible dimension peut également réduire leur sensibilité. De manière à améliorer les performances de ces systèmes, la miniaturisation des outils d'extraction sélective est donc d'un très grand intérêt notamment pour aborder leur applicabilité à des échantillons complexes. La miniaturisation des outils bioanalytiques basés sur l'immobilisation d'anticorps ou d'aptamères n'a été à ce jour que peu décrite. Les formats utilisés ainsi que les supports d'immobilisation sont divers. Parmi ces supports, les monolithes présentent un intérêt majeur puisqu'ils peuvent être synthétisés *in situ* dans des capillaires et microcanaux et permettent de s'affranchir des contraintes liées à l'utilisation de particules qui nécessite un remplissage homogène des capillaires. Ils présentent de plus une surface spécifique élevée et une grande perméabilité qui facilite le transfert des analytes. Cependant, une caractérisation complète des supports miniaturisés en termes d'efficacité d'immobilisation, de capacités, de rendements d'extraction et de répétabilité de préparation ne sont que rarement disponibles.

L'objectif de ce projet de recherche a donc été de développer et de caractériser des outils bioanalytiques basés sur le greffage de biomolécules sur monolithes synthétisés *in situ* en capillaire pour l'extraction de molécules dans des matrices complexes et de les coupler en ligne à la nanochromatographie liquide.

Le premier chapitre consiste en une étude bibliographique traitant des méthodes pouvant être utilisées pour l'analyse de composés à l'état de traces dans des matrices complexes. Une première partie est centrée sur la description des mécanismes mis en jeu dans les phases de SPE conventionnelles et des limites associées à de tels supports. Une deuxième partie illustre les atouts des outils d'extraction sélective basés sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire dans un format conventionnel. Enfin, une troisième partie permet de présenter l'ensemble des approches recensées dans la littérature pour intégrer les systèmes d'extraction sur phase solide dans des systèmes miniaturisés. Une étude bibliographique la plus exhaustive possible des récents développements traitant de l'immobilisation d'anticorps et d'aptamères au sein de systèmes de format conventionnel ou miniaturisé a été menée.

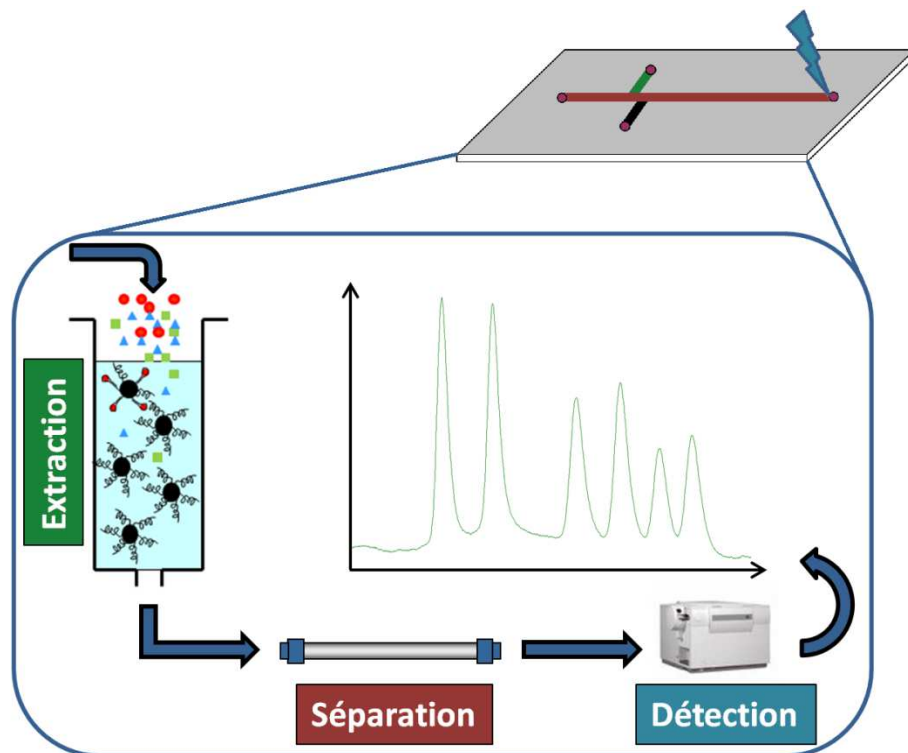
Ensuite, afin d'envisager l'immobilisation de biomolécules, la synthèse d'un monolithe hybride à base de silice a été optimisée et caractérisée dans le deuxième chapitre de manière à obtenir un support de greffage dont la synthèse s'avère répétable. Un descriptif du procédé sol-gel employé pour la synthèse des monolithes, de l'ensemble des paramètres influant sur la synthèse ainsi que des méthodes de caractérisation de ces phases y est présenté.

L'immobilisation covalente des anticorps et aptamères a pu ensuite être considérée sur des monolithes en capillaire dans les chapitres 3 et 4 respectivement. Jusqu'à maintenant, le greffage covalent de biomolécules sur ce type de monolithes n'a été que très peu décrit. Dans un premier temps, des analytes cibles modèles de faible poids moléculaire ont été choisis de manière à faciliter la caractérisation et le couplage en ligne des outils sélectifs miniaturisés avec la nanochromatographie par l'utilisation de modes de détection simples (UV et fluorescence induite par laser). Des immunoadsorbants et oligoadsorbants miniaturisés ont ainsi été obtenus puis caractérisés. La répétabilité de la préparation des supports a été évaluée en termes de taux de greffage, de capacités mais aussi de rendements d'extraction et de sélectivité. L'extraction des molécules modèles de matrices environnementales pour les anticorps et alimentaires pour les aptamères a également été étudiée.

Enfin, après avoir développé des supports miniaturisés pour l'analyse de molécules de faible poids moléculaire, la préparation d'outils sélectifs dirigés contre des protéines a été envisagée dans le chapitre 5. Une étape de digestion des protéines par une enzyme protéolytique en amont de la séparation chromatographique ainsi qu'un couplage avec la spectrométrie de masse sont alors indispensables. L'immobilisation d'enzymes sur monolithes en capillaire a donc fait l'objet d'une partie de ce projet pour le développement de microréacteurs enzymatiques. Ces supports ont été caractérisés en termes de taux de greffage et d'efficacité de digestion et appliqués à la digestion d'une protéine modèle en milieu pur.



# Chapitre 1 – Analyse de traces dans les matrices complexes



# 1 Introduction

Ces dernières années, les techniques d'analyse et d'instrumentation se sont grandement améliorées en termes de quantités d'échantillons nécessaires ainsi que de durée de séparation et de sensibilité de détection. Des progrès considérables ont en effet été réalisés du point de vue des phases stationnaires utilisées en chromatographie pour permettre l'utilisation de hauts débits de phase mobile mais aussi du point de vue de la détection avec, entre autres, le couplage des techniques séparatives et électrophorétiques avec la spectrométrie de masse. De nombreuses méthodes peuvent de ce fait être utilisées pour analyser des composés souvent à l'état de traces dans les matrices biologiques, environnementales ou alimentaires. Cependant, malgré ces avancées, la présence de composés interférents dans les matrices complexes ainsi que les faibles niveaux de concentrations recherchées dans ces dites matrices rendent souvent l'analyse du ou des composés cibles difficile. Il est donc indispensable de procéder à une étape préalable dite de préparation (ou traitement) de l'échantillon permettant de purifier la matrice et de préconcentrer le ou les analytes d'intérêt afin d'améliorer les performances globales de l'analyse.

L'extraction liquide-liquide a été l'une des premières méthodes de préparation de l'échantillon à être utilisée. Cette technique est basée sur le partage des analytes entre deux phases liquides non miscibles qui consistent généralement en une phase aqueuse (eau environnementale, sang, urine, etc) et une phase organique. Cependant, les nombreux inconvénients de cette technique tels que son caractère chronophage, le risque d'émulsion et l'utilisation de grandes quantités de solvants, nocifs pour l'environnement et dangereux pour l'expérimentateur, ont conduit à l'émergence d'autres techniques, dont l'extraction sur phase solide. Cette méthode constitue un outil puissant pour la purification et la préconcentration d'analytes contenus dans des matrices environnementales, biologiques ou alimentaires.

Ce chapitre présente les outils conventionnels d'extraction sur phase solide permettant de relever les défis analytiques liés à la préconcentration d'analytes souvent présents à l'état de traces dans des matrices complexes. Nous verrons que, malgré la diversité des supports disponibles, la majorité met en jeu des interactions hydrophobes, polaires et/ou électrostatiques, non sélectives, conduisant à la co-extraction de nombreux composés interférents présentant des propriétés physico-chimiques proches du ou des composés recherchés. La demande pour des supports beaucoup plus sélectifs est donc forte. En conséquence, des supports à reconnaissance moléculaire ont été développés et parmi ceux-ci des supports basés sur l'immobilisation de biomolécules qui seront tout particulièrement décrits dans ce chapitre.

## 2 L'extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide (SPE : *Solid Phase Extraction*) est une méthode de traitement de l'échantillon basée sur un principe similaire à la chromatographie liquide. Elle est basée sur le partage de composés entre une phase liquide, l'échantillon, et une phase solide, l'adsorbant. Le format le plus conventionnel consiste à conditionner l'adsorbant dans une cartouche entre deux frittés et à percoler les différentes solutions à travers la cartouche par gravité, par pression positive à l'entrée de la cartouche, par application d'un vide en sortie de la cartouche ou par centrifugation.

### 2.1 Principe

Le protocole d'extraction par SPE comprend 4 étapes, qui sont résumées en Figure 1.

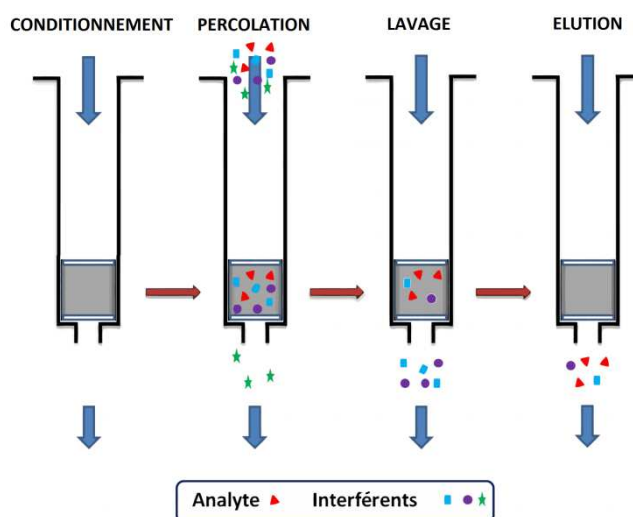


Figure 1 : Principe de l'extraction sur phase solide. Adapté de [1]

La première étape est une étape de conditionnement consistant à mouiller l'adsorbant de manière à activer les sites de rétention. A la fin de cette étape, le dernier solvant utilisé doit avoir des propriétés similaires à celles de l'échantillon en termes de pH et de polarité de manière à avoir une force éluante proche de celle de l'échantillon et éviter ainsi l'élution prématurée des analytes. La deuxième étape est l'étape de percolation de l'échantillon sur l'adsorbant. Lors de cette étape, les analytes cibles sont retenus sur le support et certains interférents sont, quant à eux, éliminés. Cependant une grande partie des molécules interférentes peut présenter une forte affinité pour le support et être retenue sur celui-ci. Dans le but d'éliminer ces interférents, il est nécessaire de procéder à une troisième étape dite de lavage. Cette étape consiste à percoler, au travers de la cartouche, un ou plusieurs solvants de faible force éluante vis-a-vis des analytes cibles de façon à éluer un maximum de composés interférents sans éluer les composés recherchés. Une fois cette



étape réalisée, on procède à la quatrième et dernière étape du protocole, l'élution. Lors de cette étape les analytes cibles sont élués grâce à un solvant ayant cette fois une force éluante suffisante pour rompre les interactions entre les analytes cibles et l'adsorbant.

## 2.2 Paramètres clés de l'extraction sur phase solide

### 2.2.1 Volume de fin de fixation

Le rendement d'extraction dépend du volume percolé notamment si celui-ci est supérieur au volume de fin de fixation, noté  $V_f$ . Ce volume correspond au volume d'échantillon percolé au-delà duquel les analytes ne sont plus retenus quantitativement sur un support et dépend de l'affinité des solutés pour ce dernier en présence du solvant constituant l'échantillon [2]. Pour obtenir de bons rendements d'extraction, il est donc essentiel de ne pas percoler un volume d'échantillon supérieur à ce volume de fin de fixation

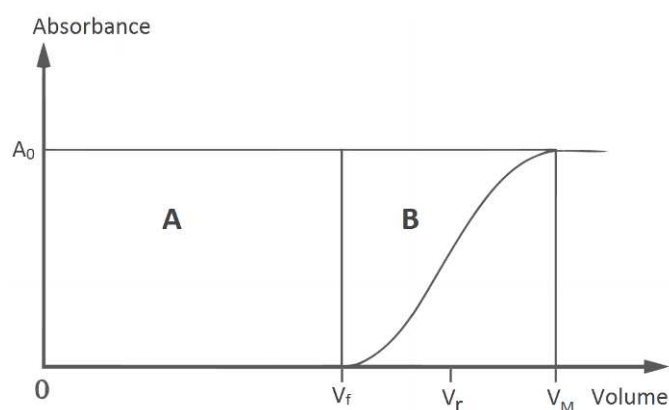


*Figure 2 : Courbe théorique permettant de déterminer le volume de fin de fixation en analyse frontale par percolation en continu d'un échantillon d'eau dopée par un soluté S sur un adsorbant et suivi de l'élution par détection UV. Adapté de [3].*

Ce volume peut être déterminé expérimentalement. En supposant qu'une solution contenant un soluté S à une concentration  $C_0$  est percolée à travers une cartouche de SPE et qu'un détecteur (par exemple UV) est placé en sortie de la cartouche, on peut tracer une courbe telle que celle présentée en Figure 2 et représentant le signal en sortie du support en fonction du volume d'échantillon percolé [2]. Pour des faibles volumes d'échantillons, l'effluent ne contient pas le composé S et le signal en sortie reste nul (zone A). Lorsque le volume  $V_f$  est atteint, la concentration en soluté commence à augmenter marquant le début de l'élution du soluté de la cartouche de SPE (zone B). La concentration dans l'effluent correspondant à  $V_f$  est généralement définie comme étant égale à 1% de la concentration initiale  $C_0$  de l'échantillon [2]. Le signal augmente ensuite jusqu'à atteindre un palier,  $A_0$ . La concentration en sortie du support est alors égale à la concentration initiale  $C_0$  dans l'échantillon. Le volume d'éluant collecté lorsque la concentration atteint 99% de  $C_0$  est noté  $V_M$ . Dans des conditions idéales, le front d'élution a une allure bi-logarithmique présentant

un point d'inflexion au niveau d'un volume noté  $V_r$ . Ce volume  $V_r$  correspond au volume de rétention que l'on obtiendrait en chromatographie d'élution au maximum du pic en injectant un volume fini de S sur le même adsorbant avec une phase mobile de même composition que l'échantillon.

### 2.2.2 La capacité

Un autre paramètre important en SPE est la capacité du support [2]. Elle est directement liée au nombre de sites actifs à la surface de l'adsorbant. Lorsque la quantité d'analyte percolée est supérieure à la capacité du support, une élution anticipée de l'analyte survient même si le volume  $V_r$  de fin de fixation n'a pas été dépassé. Cependant, dans le cas de phases conventionnelles, le dépassement de capacité reste peu fréquent du fait principalement des faibles concentrations d'analytes cibles dans les échantillons en analyse de traces. La capacité d'une cartouche de SPE conventionnelle est généralement comprise entre 1 et 5 % de la masse de l'adsorbant [2, 4]. Après optimisation de la procédure d'extraction, la capacité correspond à la quantité d'analytes maximale à partir de laquelle une chute des rendements d'extraction est observée, signe de la saturation du support.

## 2.3 Couplage de l'extraction sur phase solide aux techniques séparatives

L'extraction sur phase solide peut être réalisée de deux manières différentes : soit en différé, soit en ligne. Ces deux approches seront décrites successivement dans cette partie.

### 2.3.1 Extraction en différé

Dans le cas d'une extraction en différé, la fraction d'élution obtenue en appliquant la procédure décrite en Figure 1 est collectée et injectée ensuite partiellement dans le système analytique après une éventuelle étape d'évaporation et/ou de dilution. Cette approche permet de modifier et d'optimiser facilement de nombreux paramètres, notamment la quantité d'adsorbant conditionné. De plus, il n'existe pas de contraintes de compatibilité entre la nature de l'adsorbant et le système analytique utilisé. Seule la nature du solvant de redissolution de l'extrait doit être compatible avec le système chromatographique [2]. Il s'agit également d'une approche peu onéreuse du fait de la simplicité de l'équipement nécessaire à sa réalisation. Cependant, le gros désavantage lié à cette méthode reste les risques de pollution et l'augmentation de l'incertitude sur le résultat final pouvant résulter des nombreuses étapes réalisées manuellement par un opérateur. Celles-ci comprennent des étapes telles que l'évaporation, la reprise, la dilution ou encore l'injection des diverses fractions collectées en sortie du dispositif. L'automatisation peut malgré tout limiter ces

désavantages mais ne résout pas le problème de l'injection partielle de l'échantillon et les risques de pertes par évaporation.

Différents formats peuvent être utilisés pour une application en différé. Ces différents formats sont présentés sur la Figure 3.

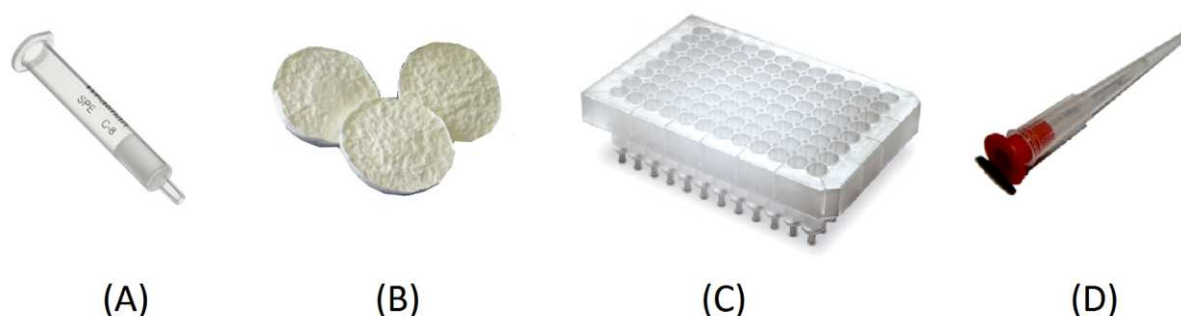


*Figure 3 : Formats d'extraction sur phase solide disponibles. (A) Cartouche, (B) Disque, (C) Plaque 96-puits, (D) Embout de pipette.*

Le format le plus utilisé consiste à conditionner un adsorbant constitué de particules de 40 à 60  $\mu\text{m}$  de diamètre dans une cartouche en polypropylène ou en verre (Figure 3-A). Les particules sont maintenues au sein de la cartouche grâce à deux frittés en polyéthylène. La taille des cartouches varient beaucoup en fonction des échantillons à analyser, de 1 mL à plusieurs dizaines de millilitres avec des quantités d'adsorbants conditionnées variant de 50 mg à 10 g.

Le deuxième type de format consiste en l'utilisation de disques constitués de particules solides contenues dans une matrice de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou de verre (Figure 3-B). Du fait de leur diamètre plus important (de 4 à 90 mm) des débits plus élevés peuvent être appliqués. Ce format est donc bien adapté à la percolation de grands volumes d'échantillons.

Le troisième format consiste en des plaques 96-puits (Figure 3-C). Ce format est équivalent à 96 cartouches ou disques individuels contenant une faible quantité d'adsorbant (5 à 60 mg), réunis en une plaque unique, compacte et adaptée à l'utilisation de robots et à de faibles volumes d'échantillon.

Enfin, le dernier format disponible consiste à introduire l'adsorbant dans un cône de pipette (Figure 3-D). L'extraction est alors réalisée par aspiration au travers de ce cône. Cette méthode s'avère simple de mise en œuvre, est adaptée à de faibles volumes d'échantillons et est rapide et peu coûteuse [5]. Elle permet l'obtention d'extractions rapides et efficaces tout en limitant la quantité d'adsorbant et les volumes d'élution nécessaire à l'extraction [5].

Comme nous venons de le voir, bien que très utilisées, les méthodes d'extraction en différé présentent deux désavantages principaux : elles peuvent entraîner des pertes pendant les étapes d'évaporation et conduisent à une sensibilité globalement limitée car seule une fraction de chaque

solution est injectée dans le système chromatographique. De ce fait, l'extraction en ligne a été considérée.

### 2.3.2 Extraction en ligne

La SPE peut également être couplée directement en ligne avec l'analyse chromatographique. Le principe d'un couplage en ligne est schématisé en Figure 4.

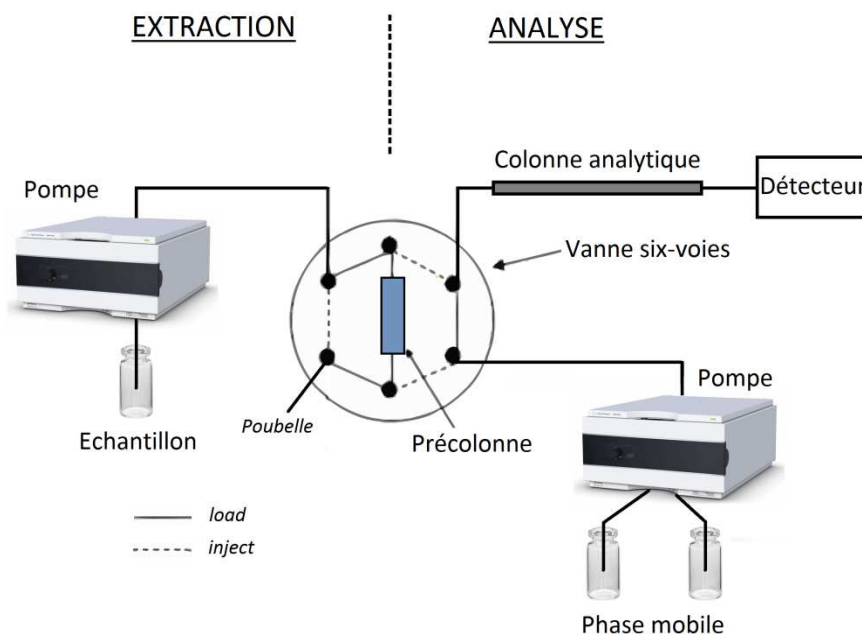


Figure 4 : Couplage en ligne de l'extraction sur phase solide avec la chromatographie en phase liquide. Adapté de [2].

La SPE en ligne est basée sur le couplage de colonnes d'enrichissement (appelées alors précolonnes) et d'analyse par l'intermédiaire de vannes de commutations [1, 2]. L'adsorbant est ainsi conditionné dans une précolonne introduite en lieu et place d'une boucle d'injection sur une vanne six-voies. Dans un premier temps, la vanne est en position de chargement (ou *load*) et l'échantillon est percolé à travers la précolonne au moyen d'une pompe de préconcentration. Les analytes cibles sont alors piégés sur l'adsorbant contenu dans la précolonne. Dans un deuxième temps, la vanne est basculée en position d'injection (ou *inject*). Ceci permet à la phase mobile, délivrée par une deuxième pompe, d'être dirigée vers la précolonne d'enrichissement et ainsi d'éluer les analytes cibles et de les entraîner ensuite vers la colonne analytique où ils sont séparés avant d'être détectés. De manière générale, le sens d'élution est opposé à celui de la percolation, on parle de *rétrobalayage* (« *back flush* »). Ce mode d'élution permet de reconcentrer la bande de solutés avant son transfert vers la colonne analytique et ainsi de réduire l'élargissement des pics.

Avec l'approche par couplage en ligne, l'ensemble des composés retenus dans la précolonne est transféré vers la colonne analytique et donc analysé, ce qui n'est pas le cas en mode différé. Ce gain en sensibilité permet de diminuer les volumes d'échantillon nécessaires et représente un

avantage notable lorsque les volumes disponibles sont faibles [2]. D'autre part, cette approche s'avère être plus précise dans la mesure où elle limite le nombre d'interventions de l'opérateur réduisant, par la même occasion, le risque d'erreurs ou de contamination lors de la collecte des différentes fractions [2]. Elle présente également l'avantage de limiter la consommation en solvants organiques puisque l'élution est réalisée grâce à la phase mobile utilisée pour l'analyse. Enfin, elle permet d'envisager une automatisation complète de l'extraction sur phase solide ce qui améliore considérablement la répétabilité des extractions et de l'analyse qui s'en suit.

Malgré tout, l'approche en ligne présente certains désavantages. En effet, l'adsorbant doit résister à la pression induite par la présence du système chromatographique placée à sa sortie ce qui limite le choix des adsorbants à des supports résistants à la pression. Ensuite, le couplage avec la colonne analytique limite la quantité d'adsorbant pouvant être utilisée de façon à ne pas réduire l'efficacité de la méthode de séparation [1, 2]. Elle nécessite également une bonne compatibilité des phases stationnaires. En effet, la phase mobile utilisée doit permettre à la fois l'élution des composés retenus sur l'adsorbant tout en assurant une séparation efficace dans la colonne analytique. Idéalement, la phase stationnaire contenue dans la colonne analytique doit être plus rétensive que celle contenue dans la précolonne de manière à concentrer les analytes cibles en tête de colonne et ainsi limiter les élargissements de pics [1, 2].

## 2.4 Phases utilisées en SPE

La première étape de l'élaboration d'un protocole d'extraction est le choix du support à utiliser. Le potentiel de rétention de l'adsorbant dépend des forces d'interactions entre les analytes et les groupements fonctionnels présents à sa surface soumis à la présence du solvant constituant l'échantillon. De ce fait, le choix du support est orienté suivant le type de matrices à analyser et la nature des analytes à extraire. Une grande diversité de phases est disponible. L'adsorbant peut interagir avec les analytes par des interactions hydrophobes (apolaire-apolaire), hydrophiles (polaire-polaire, liaison H, dipôle-dipôle, dipôle-dipôle induit) ou électrostatiques. On peut ainsi classer les différents types de supports selon la nature et l'intensité de ces interactions.

### 2.4.1 Les phases polaires

Les adsorbants polaires sont appropriés pour la rétention de composés à partir de matrices apolaires telles que les huiles. En effet, les solvants hydrophobes présentent une faible force éluante pour ce type de phases conférant aux analytes une forte rétention.

Ce type de phases est utilisé dans les conditions qui s'apparentent à la chromatographie en phase normale. Ces adsorbants incluent des phases telles que la silice vierge, le Florisil (silicate de magnésium), l'alumine et la silice fonctionnalisée avec des groupements polaires [1, 2]. Le mécanisme de rétention d'un analyte avec ce type de phases repose sur les interactions entre les

groupements polaires de l'analyte et les groupements polaires à la surface de l'adsorbant (liaisons H, les interactions dipôle-dipôle et les interactions dipôle-dipôle induit, etc). Un composé retenu grâce à ce type d'interactions sera élué en percolant un solvant plus polaire que la matrice d'origine [1].

#### 2.4.2 Les phases apolaires

Les adsorbants apolaires sont utilisés en mode de partage inverse. Ils sont couramment utilisés pour l'analyse des échantillons aqueux (eaux, fluides biologiques...) puisque l'eau présente sur ce type de support une très faible force éluante. Ils peuvent consister en des phases à base de silice greffée avec des groupements alkyle/aryle ou en des phases polymériques. La rétention des composés est le résultat d'interactions apolaires-apolaires entre l'analyte et le support. L'élution, quant à elle, est généralement réalisée en utilisant un solvant apolaire de façon à rompre les interactions entre l'analyte et le support.

Les phases à base de silice sont adaptées à l'extraction d'analytes organiques apolaires ou modérément polaires contenus dans des matrices aqueuses [1, 2]. Pour des composés plus polaires, des phases polymériques à base de copolymères de styrène-divinylbenzène (PS-DVB) ont été développées [1, 2]. Ces phases sont résistantes à des pH extrêmes (pH de 0 à 14) contrairement à la silice dont la gamme de stabilité restreinte (pH 2-8) empêche de réaliser des extractions à pH trop élevé ou trop faible. Le PS-DVB est une résine hydrophobe permettant une rétention plus importante des analytes, notamment les analytes polaires, puisqu'il présente à sa surface un nombre élevé de sites aromatiques actifs permettant le développement d'interactions  $\pi$ - $\pi$  de type donneur-accepteur avec les analytes non saturés [1, 2]. De plus, la performance de ces phases a été améliorée par l'ajout de groupements polaires au niveau du noyau aromatique du DVB (*i.e.* N-vinylpyrrolidone) ou en changeant la composition du copolymère pour atteindre des surfaces spécifiques élevées [1, 2, 6]. Malgré tout, le PS-DVB conduit aussi à un volume de fin de fixation faible pour les composés extrêmement polaires, ce qui ne permet pas leur extraction complète dans des matrices aqueuses à partir de grands volumes [1].

Des phases à base de carbone graphite poreux (PGC, *Porous Graphitic Carbon*) ont également été développées. Le choix du pH de travail n'est dans ce cas pas limité puisque le PGC se trouve être stable sur une très large gamme de pH. Il permet également l'utilisation de fortes teneurs en solvant organique tout en étant capable de retenir des analytes très polaires [2, 7].

#### 2.4.3 Les phases à échange d'ions

Les phases à échange d'ions sont appropriées pour l'extraction de composés ionisables, tels que des composés basiques ou acides, à partir d'échantillons aqueux. Ces phases consistent en de la silice ou en une résine polymérique greffée avec des groupements chargés positivement (ammonium quaternaire) ou négativement (acide sulfonique aliphatique, acide carboxylique aliphatique) pour

jouer respectivement le rôle d'échangeur d'anions ou d'échangeur de cations [1, 2]. Le mécanisme de rétention est principalement basé sur des interactions électrostatiques entre les groupements chargés des analytes et les groupements chargés greffés à la surface du support. Dans le but de retenir un composé par échange d'ions à partir d'une matrice aqueuse, le pH de la matrice doit être ajusté de telle façon que les composés d'intérêt et les groupements fonctionnels greffés soient chargés [1, 2]. Il est aussi nécessaire de faire en sorte qu'à ce pH peu de composés interférents soient sous forme ionisée de manière à ne pas interférer avec les composés d'intérêt [1]. L'élution peut ensuite être réalisée en utilisant une solution à un pH neutralisant à la fois les groupements fonctionnels du composé d'intérêt et les groupements greffés à la surface du support. Lorsque l'un ou l'autre de ces groupements est neutralisé, les forces électrostatiques liant le composé au support sont rompues et le composé est élué. Dans le cas où il est impossible de se placer dans une zone où le composé est neutre, une solution présentant une grande force ionique, ou contenant des espèces ioniques déplaçant le composé adsorbé, peut être utilisée pour l'étape d'élution.

Cependant, le mécanisme de rétention par échange d'ions est rarement mis en œuvre pour l'analyse directe de traces dans des échantillons complexes car ces derniers contiennent de trop fortes teneurs en ions inorganiques qui saturent la capacité de l'échangeur [2].

#### 2.4.4 Les phases à mécanismes mixtes

Les phases décrites dans la partie précédente retiennent les analytes d'intérêt uniquement via un type d'interactions. Cette approche peut malheureusement conduire à l'extraction d'un grand nombre de composés interférents présentant des propriétés proches de celles des analytes cibles et pouvant ainsi développer les mêmes interactions avec la phase solide. Pour améliorer la purification et augmenter la sélectivité, des phases permettant de combiner plusieurs mécanismes de rétention ont été mises au point.

##### 2.4.4.1 Les phases mixtes

Ces phases associent le plus souvent des interactions de nature hydrophobe via une matrice polymérique ou une silice greffée C18 ou C8 et des interactions de type électrostatique grâce à des fonctions acides ( $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{COO}^-$  par exemple) ou basiques ( $\text{NH}_3^+$  par exemple) [1, 2]. Plusieurs lavages de nature différente peuvent permettre d'éliminer un plus grand nombre d'interférents en jouant sur ces deux types d'interactions : un lavage favorisant une interaction tout en rompant l'autre. Au cours de la percolation, le composé est retenu par interactions hydrophobes alors que les composés polaires non chargés, ou portant une charge identique à celle de l'échangeur d'ions greffé, ne sont pas retenus. Dans un second temps, le pH est modifié pour ioniser le composé cible qui développe alors des interactions électrostatiques avec l'échangeur d'ions [2]. Une fois cette étape réalisée, un lavage avec un solvant organique permet de rompre les interactions hydrophobes de manière à

éliminer les interférents hydrophobes non chargés qui ne peuvent développer d'interactions électrostatiques [2]. Enfin, l'analyte cible est élué par passage de ce solvant organique dans lequel a été ajouté un acide ou une base, dans le but de rompre les interactions électrostatiques. Ce type de support est très utilisé pour l'extraction de composés pharmaceutiques basiques à partir de fluides biologiques, tels que l'urine ou le plasma [1].

#### 2.4.4.2 Les phases à accès restreint

Les phases à accès restreint (RAM, de l'anglais Restricted Access Material) permettent une extraction basée sur deux mécanismes de rétention distincts de manière à améliorer la sélectivité de l'extraction [5, 8]. Le plus souvent ceux-ci consistent en un mécanisme d'exclusion stérique associé à un mécanisme de partage permettant la rétention de petites molécules par interactions hydrophobes ou électrostatiques [5, 8]. Ce mode particulier d'extraction est le fait des propriétés particulières des RAM. Ces derniers consistent en effet en un matériau poreux avec une surface externe hydrophile et restrictive empêchant la rétention en milieu aqueux de macromolécules, telles que les protéines et phospholipides, combiné à des pores de faible dimension dont la surface est greffée avec des groupements alkyles ou ioniques et que seuls les composés de faible poids moléculaire peuvent atteindre. Ainsi les petites molécules peuvent être retenues à l'intérieur des pores tandis que les plus grosses molécules en sont exclues [5, 8].

Ce type de phases est donc de manière générale principalement utilisé pour le traitement de fluides biologiques en vue de l'élimination des protéines et est obligatoirement couplé en ligne avec la chromatographie en phase liquide et est réutilisé compte-tenu de son coût [5, 7]. L'échantillon peut ainsi être directement injecté sur le RAM et, après passage d'un tampon permettant d'éliminer les macromolécules, les composés sont transférés en ligne vers le système de chromatographie en phase liquide.

#### 2.4.4.3 Les supports à particules de grande dimension

Dans le but d'éliminer des macromolécules interférentes pouvant gêner l'analyse et la quantification d'analytes de faible poids moléculaire, *i.e.* avec un objectif similaire aux RAMs, des supports constitués de particules de grande dimension (LPS : *Large Particle Supports*) ont été développés. Cette technique a d'abord été nommée chromatographie à flux turbulent par Quinn et Takarewsl en 1997 [8]. Elle repose sur l'utilisation de hauts débits de percolation, permis par l'utilisation de particules de diamètre élevé, compris entre 30 et 50  $\mu\text{m}$ , ne développant qu'une perte de charge limitée.

Le principe de cette technique est que pour un débit appliqué très élevé (flux quasi turbulent), les forces d'Eddy générées permettent d'exclure les macromolécules qui diffusent mieux



dans le milieu intraparticulaire sans obturer la colonne et ne sont pas retenus par les particules de la phase [9]. Ainsi, au même titre que les RAM, les LPS peuvent être utilisés théoriquement pour l'injection directe d'échantillons biologiques tels que le sang ou le plasma ce qui permet de supprimer une étape de traitement de l'échantillon. Ils sont donc obligatoirement couplés en ligne avec la chromatographie en phase liquide pour appliquer des débits élevés et bien contrôlés sur la précolonne de LPS. Généralement des débits de l'ordre de 3 à 5 mL/min sont appliqués sur ce type de support conditionnés dans des colonnes de diamètre interne 1 mm [8].

Les phases stationnaires généralement utilisées pour ces supports consistent en des particules de silices greffées par des chaînes alkyles (C2, C18 ou C18), des groupements phényles ou bien en des particules polymériques (PS-DVB notamment). Le choix des phases dépend alors, comme pour les approches conventionnelles de la nature des composés à extraire.

#### 2.4.5 Limitation des phases conventionnelles

Bien qu'améliorant la purification des échantillons, les supports décrits dans la partie précédente ne présentent pas toujours une sélectivité suffisante pour éliminer tous les composés interférents qui se retrouvent co-extraits avec l'analyte cible. En fonction du type de détection utilisé, plusieurs problèmes peuvent survenir.

Il peut tout d'abord résulter de cette co-extraction, une co-élution d'un ou plusieurs interférents avec l'analyte cible. Cette co-élution, caractérisé par des pics chromatographiques impurs, peut fausser la quantification des analytes cibles.

Pour tenter de surmonter ces problèmes de co-élution, des détecteurs plus spécifiques, telle que des spectromètres de masse, peuvent être utilisés. Cependant, une purification efficace reste nécessaire avec ce type de détecteur. En effet, bien que très sensible et spécifique, un spectromètre de masse peut être sujet à un effet de matrice connu sous le nom de suppression d'ions. Ce phénomène résulte en une diminution de l'intensité du signal et, en conséquence, en une baisse de la sensibilité, de la précision et de l'exactitude. Ceci résulte du changement des propriétés des gouttelettes de solution produites par le spray lors de l'ionisation du fait de la présence de composés interférents non-volatils ou moins volatils. Un exemple de manifestation de ce phénomène est présenté en Figure 5.

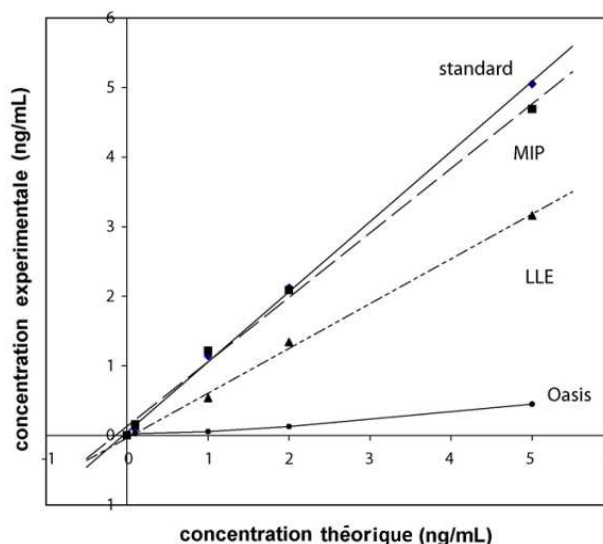


*Figure 5 : Exemple d'effet de matrice en LC/MS<sup>2</sup>. Comparaison du phénomène de suppression d'ion à partir d'échantillons de miel après application de protocoles d'extraction liquide-liquide (LLE), de SPE sur un support polymérique (Oasis) et sur un support d'extraction sélectif (MIP). L'éluat est dopé avec du chloramphénicol (CAP) et un étalon interne juste avant analyse par LC-MS<sup>2</sup>. Le « standard » correspond au solvant d'élution pur dopé avec le CAP. Adapté de [10].*

Des procédures d'extraction liquide-liquide et d'extraction sur phase solide ont été appliquées à des échantillons de miel non dopés. Les extraits finaux ont ensuite été dopés avec des quantités identiques de chloramphénicol (CAP) et un étalon interne puis comparés avec un échantillon de solvant d'extraction pur dopé avec le CAP. Il est visible sur la Figure 5 que les concentrations théoriques obtenues pour les matrices obtenues après SPE sur un polymère (support « Oasis ») et après extraction liquide-liquide sont beaucoup plus faibles que celles attendues du fait d'une plus grande co-extraction avec des composés interférents entraînant une suppression d'ions malgré la purification induite par ces méthodes de traitement de l'échantillon. Cependant, il est visible que l'utilisation d'une méthode d'extraction sur phase solide plus sélective (consistant en l'utilisation d'un polymère à empreintes moléculaires, MIP, dont le principe sera explicité dans la partie suivante) permet de diminuer grandement le phénomène de suppression d'ions, le MIP n'ayant retenus presque aucun composé interférent.

L'extraction sélective, qui consiste à n'extraire que le ou les analytes d'intérêt de l'échantillon complexe, permet une purification beaucoup plus importante que les supports conventionnels améliorant d'autant plus la fiabilité de l'analyse. Pour procéder à ce type d'extraction, des supports basés sur des mécanismes hautement sélectifs de reconnaissance moléculaire ont été développés.

### 3 Les outils sélectifs à reconnaissance moléculaire

Il existe à l'heure actuelle trois types de supports induisant un mécanisme de rétention basé sur la reconnaissance moléculaire : les polymères à empreintes moléculaires (MIP), les

immunoabsorbants (IS) et les oligoabsorbants (OS). Cette partie est entièrement consacrée à leur description. Les MIP n'étant pas basés sur l'immobilisation de biomolécules, sujet principal de ce travail de thèse, ils ne seront décrits que brièvement. Ces outils sélectifs sont généralement conditionnés entre deux frittes dans des cartouches ou colonnes de manière à pouvoir appliquer une procédure de SPE en différé ou en ligne très similaire à celle déjà décrite en Figure 1 suivi de méthodes séparatives telles que la LC. Les trois grandes étapes de cette procédure sont exposées en Figure 6.

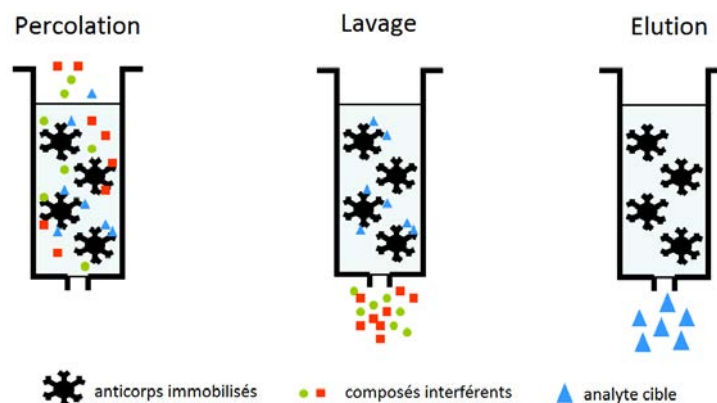


*Figure 6 : Principe d'une extraction sur phase solide sélective basée sur un mécanisme de reconnaissance moléculaire. Exemple des immunoabsorbants. Adapté de [11].*

La procédure d'extraction sélective comprend : (1) une étape de percolation de l'échantillon après une étape de conditionnement, (2) le lavage du support de manière à éliminer les composés interférents retenus par interactions non spécifiques et enfin (3) l'élution de l'analyte cible. La grande différence de cette procédure avec la procédure de SPE sur support conventionnel présentée en Figure 1 en page 23 est la sélectivité de l'extraction qui permet une purification beaucoup plus importante de l'échantillon après l'étape d'élution et donc l'obtention d'un extrait censé ne contenir que le(s) composé(s) d'intérêt.

### 3.1 Outils biomimétiques : les polymères à empreintes moléculaires

Les polymères à empreintes moléculaires (MIP) sont des polymères hautement réticulés présentant des sites de reconnaissance capables de se lier spécifiquement à un analyte cible ou à une classe d'analogues structuraux.

#### 3.1.1 Synthèse

Le mode d'obtention des MIP est schématisé en Figure 7. Les MIP sont obtenus par mise en présence, dans un solvant de synthèse (porogène), d'une molécule empreinte (l'analyte cible ou un

analogue structural de celui-ci), de monomères fonctionnels et d'un agent réticulant. Les monomères fonctionnels sont choisis pour leur capacité à créer des interactions fortes avec la molécule empreinte. L'approche la plus courante est une approche dite non-covalente où les monomères fonctionnels établissent des interactions non covalentes de type liaisons H, interactions  $\pi$ - $\pi$  ou électrostatiques avec certains groupements de la molécule empreinte. Ces interactions sont ensuite conservées lors de la copolymérisation avec l'agent réticulant. De cette façon, après initiation thermique ou photochimique, les monomères et l'agent réticulant polymérisent autour de la molécule empreinte. L'élimination de la molécule empreinte, laisse ainsi des cavités faisant office de sites de reconnaissance spécifique complémentaires de l'analyte cible en forme, taille et groupements fonctionnels. Ces sites de reconnaissance peuvent ensuite se lier spécifiquement à un ou des analytes cibles de structure proche de l'empreinte.

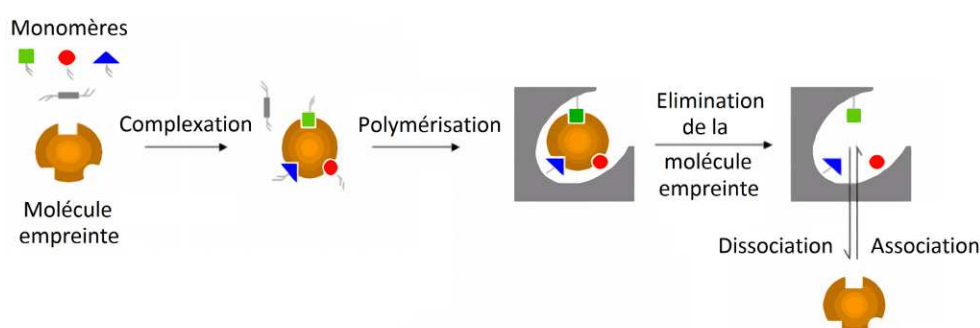


Figure 7 : Principe de la synthèse d'un polymère à empreinte moléculaire. Adapté de [12].

### 3.1.2 Application en SPE

La procédure d'extraction sur un MIP comprend les étapes décrites ci-avant en Figure 6. Chacune de ces étapes doit être optimisée pour obtenir des rendements d'extraction optimaux et une sélectivité élevée. Ces dernières années, le développement de MIP pour l'extraction sur phase solide a été largement décrit pour des applications en analyse environnementale, alimentaire ou pharmaceutique [13-21]. En pratique, différentes méthodes de polymérisation peuvent être employées pour la synthèse de MIP appliqués à la SPE [14, 21]. La plus commune consiste à synthétiser le polymère en bloc puis à le broyer pour obtenir des particules de diamètre compris entre 25 et 50  $\mu\text{m}$  après tamisage. Ces particules sont ensuite conditionnées dans des cartouches de SPE. Cette méthode, bien que facile à mettre en œuvre, peut s'avérer fastidieuse et conduit à un gaspillage important puisque seuls 30 à 40% de la masse initiale du polymère sont finalement utilisés [22]. De plus, les particules obtenues sont irrégulières en termes de taille et de forme. Pour pallier ces inconvénients, de nouvelles voies de synthèse permettant de préparer directement des particules sphériques et monodisperses ont été plus récemment décrites parmi lesquelles la polymérisation en suspension [23], par précipitation [24, 25] ou par étapes multiples de gonflement [26, 27]. Ces méthodes restent cependant encore peu utilisées pour des applications en SPE au format cartouche.

Les MIP présentent une sélectivité maximale lorsque la percolation de l'échantillon est effectuée dans le même solvant que le porogène utilisé lors de la synthèse [28]. Dans ces conditions, l'analyte cible développe avec les cavités des interactions identiques à celles qui s'étaient développées lors de la polymérisation. Ceci résulte en une adsorption sélective et en une reconnaissance moléculaire de l'analyte par le MIP. De façon à caractériser la sélectivité des MIP pour leur analyte, un polymère dit non-imprimé (NIP) est généralement utilisé. Ce polymère est obtenu en appliquant la même procédure de synthèse en l'absence de molécule empreinte. Le NIP présente ainsi les mêmes propriétés chimiques que le MIP mais ne présente pas de cavités. De ce fait, les interactions entre un MIP et l'analyte cible sont de même nature qu'entre le NIP et ce même analyte à la différence que les interactions entre l'analyte et le MIP sont beaucoup plus fortes que celles avec le NIP puisque dans le premier cas l'analyte peut être retenu en différents points du fait de la complémentarité spatiale avec les cavités. Pour éliminer les éventuels interférents faiblement retenus sur le support par des interactions non spécifiques qui peuvent être évaluées par l'étude de la rétention sur le NIP, une étape de lavage utilisant un solvant de nature très proche du solvant de percolation est généralement nécessaire. Une fois les interférents éliminés, les analytes peuvent être élués du MIP avec un solvant de force éluante suffisamment élevée pour rompre les interactions spécifiques du ou des analytes cibles avec les cavités du polymère et ceci avec un volume d'élution minimal.

La plupart des applications avec les MIP ont été réalisées pour l'instant en mode off-line du fait de sa simplicité de mise en œuvre, de sa facilité d'utilisation et grande flexibilité. Cependant, ces dernières années, un nombre croissant d'études ont utilisés des MIP en mode on-line car ils permettent une préconcentration plus élevée tout en réduisant le temps total d'analyse et le nombre de manipulations.

### 3.1.3 Avantages

Les MIP présentent de nombreux avantages parmi lesquels une bonne stabilité permettant de les réutiliser rapidement par simple conditionnement avec un solvant approprié. Ensuite, les mesures de capacités effectuées sur ce type de support ont démontrées que la capacité des MIPs est très élevée, notamment par rapport aux valeurs de capacité pouvant être obtenues sur des supports sélectifs préparés par greffage de biomolécules qui seront plus amplement décrits dans la partie suivante. Par exemple, une étude menée au LSABM a montré que la capacité de l'ochratoxine A sur un MIP spécifique de cette molécule ne pouvait être atteinte et était au moins de 5 µg/g [29]. De façon générale, les valeurs de capacité obtenues sur les MIP sont comprises entre 1 et 40 µmoles par gramme de support [14] et sont jusqu'à 30 fois supérieures à celle d'un support à base d'anticorps.

### 3.1.4 Inconvénients

Le premier inconvénient des MIP est qu'ils ne sont pas intrinsèquement sélectifs. Leur sélectivité résulte de la combinaison entre une procédure de polymérisation permettant d'obtenir des cavités spécifiques et d'une procédure d'utilisation impliquant l'utilisation des solvants adéquats pour le développement d'interactions spécifiques. De ce fait, leur application directe à des matrices réelles reste difficile et dépendra beaucoup de la nature de l'échantillon, le piégeage sélectif d'un analyte cible dans une matrice aqueuse s'avérant toujours assez difficile dans la majorité des cas [14, 21]. Il en découle une durée d'optimisation de la procédure d'extraction qui peut s'avérer très longue, notamment dans le cas des échantillons aqueux puisque les interactions mises en jeu dans ce cas sont majoritairement hydrophobes, et donc non spécifiques. Un grand nombre d'étapes de lavage du MIP seront alors nécessaires de façon à favoriser les interactions entre l'analyte cible et les cavités tout en éliminant les composés interférents.

Le deuxième inconvénient est le phénomène de relargage lié à l'utilisation de la molécule cible comme molécule empreinte lors de la synthèse du MIP [14]. En effet, l'élimination de la molécule empreinte peut s'avérer difficile après synthèse du MIP et requérir un grand nombre d'étapes de lavage avec des solvants organiques ou des solutions acides ou basiques. De ce fait, si la molécule empreinte n'a pas totalement été éliminée après synthèse, la quantification de l'analyte dans un échantillon réel peut être en partie faussée. Pour surmonter ce problème, un analogue structural de l'analyte cible peut être utilisé lors de la synthèse du MIP. Ceci permet également dans certains cas de réduire le coût de synthèse lorsque l'analyte cible est cher. Cependant, tous les analogues structuraux ne sont pas toujours moins coûteux que la molécule cible et un analogue n'est pas toujours disponible.

## 3.2 Outils biologiques pour l'extraction sélective

Comme évoqué précédemment, deux types de supports sélectifs basés sur l'immobilisation de biomolécules peuvent être développés. Une voie possible consiste à utiliser des anticorps immobilisés sur un support solide, le tout constituant un immunoabsorbant (IS) appelé aussi support d'immunoaffinité. La grande sélectivité des interactions antigène-anticorps est alors exploitée pour l'obtention d'une extraction sélective de la molécule cible, jouant le rôle d'antigène, mais également d'analogues structuraux de celle-ci. Néanmoins ces supports peuvent être coûteux et longs à produire ainsi que longs à régénérer du fait de la dénaturation des anticorps une fois exposés à des solvants organiques. Pour ces raisons, une approche complémentaire apparue ces dernières années basées sur l'immobilisation d'oligonucléotides synthétiques, les aptamères, a été développée. On parle alors d'oligoabsorbants (OS). En présence d'un analyte cible, certaines séquences d'oligonucléotides peuvent prendre une conformation 3D permettant le piégeage de la molécule cible.

L'objet de cette partie est ainsi de décrire successivement les grandes caractéristiques de ces deux outils.

### 3.2.1 Les immunoadsorbants (IS)

Les immunoadsorbants mettent à profit la complémentarité spatiale et électronique existant entre le site de reconnaissance d'un anticorps et un analyte cible. Cette spécificité a d'abord été utilisée pour développer des immunoessais consistant à immobiliser un anticorps (ou l'analyte cible) sur un support puis à mettre en contact un échantillon contenant à la fois le composé cible et un antigène marqué (ou l'anticorps) de façon à pouvoir ensuite déterminer la concentration en analyte par fluorescence, spectrophotométrie ou radioactivité. Cependant, sans méthode séparative, cette technique ne permet pas de différencier des analytes de structure proche qui sont reconnus par l'anticorps du fait de la forte réactivité croisée, ce qui ne permet pas une quantification individuelle de chacun des composés. Le développement des immunoadsorbants, suivi d'une étape analytique séparative et d'une détection, a permis de pallier ce problème puisque chaque composé retenu sera ainsi identifié et quantifié individuellement.

#### 3.2.1.1 Les anticorps

##### *a Structure*

Les anticorps, ou immunoglobulines (Ig), sont des protéines produites par l'organisme d'un animal en réponse à la présence d'une substance étrangère. Ils sont produits par les plasmocytes, dérivés des lymphocytes B. Plusieurs classes d'anticorps existent. Parmi ces classes, les IgG représentent la classe majoritaire d'immunoglobulines (de 70 à 75% des anticorps présents dans le sang)[30]. Ils sont produits en grande quantité au cours d'une réponse immunitaire dite secondaire, c'est-à-dire après une deuxième exposition à un antigène. Ces IgG sont les anticorps les plus utilisés pour l'immobilisation sur un support solide et le développement d'IS. Leur structure est représentée en Figure 8.

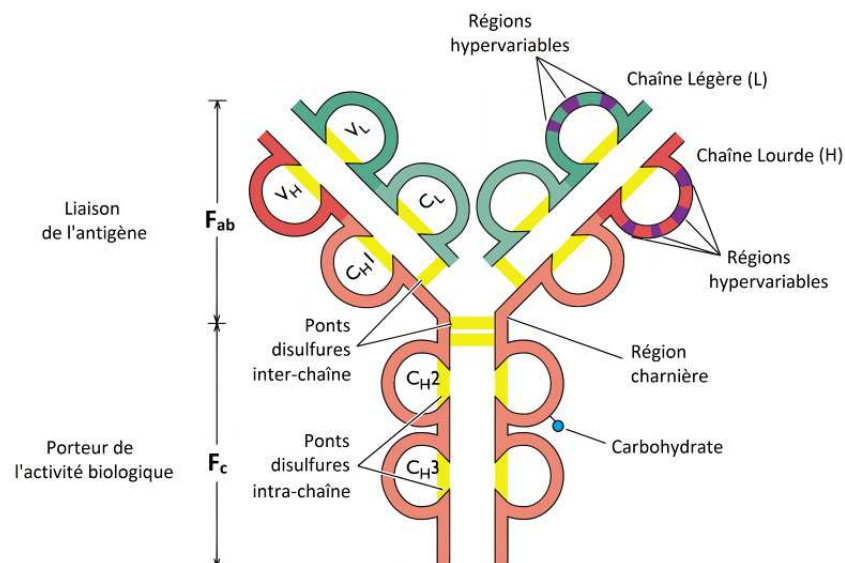


Figure 8 : Représentation schématique d'un anticorps (IgG). Adapté de [31]

La structure des IgG consiste en quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes identiques de 50 kDa (environ 440 acides aminés) et deux chaînes légères de 25 kDa (environ 220 acides aminés)[30]. Chaque chaîne légère est liée à une chaîne lourde par un pont disulfure et les deux chaînes lourdes sont liées l'une à l'autre par au moins un pont disulfure de manière à former une structure tridimensionnelle en forme de Y. Les anticorps sont constitués d'une région constante, conservée d'un anticorps à un autre et d'une région variable. Les chaînes légères présentent ainsi une région constante ( $C_L$ ) et une région variable ( $V_L$ ) d'environ 110 acides aminés chacune. La chaîne lourde quant à elle a également une région variable ( $V_H$ ) faisant environ 110 acides aminés mais sa région constante est plus longue (environ 330 acides aminés). Cette dernière peut être divisée en trois sections homologues ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  et  $C_{H3}$ ). L'extrémité basse de l'anticorps constituée des sections  $C_{H2}$  et  $C_{H3}$  est appelée région  $F_c$ . Cette région ne se lie pas à l'antigène mais porte l'activité biologique de l'anticorps [30]. Cette région se fixe à d'autres protéines en présence d'antigènes de manière à activer une réaction du système immunitaire. Les bras de l'anticorps, constitués des sections  $C_{H1}$ ,  $C_L$ ,  $V_H$  et  $V_L$  sont quant à eux nommés fragments  $F_{ab}$ . Ces fragments comprennent des régions hypervariables dans chaque chaîne qui sont pour la plus grande part responsable de la grande variabilité de ces régions [30]. C'est cette variabilité qui permet d'obtenir des anticorps très variés capables de se lier chacun à un antigène donné.

### *b Production*

Les anticorps sont produits en injectant l'analyte cible immunogène dans l'organisme d'un mammifère. La présence de ce composé étranger entraîne ainsi une réaction immunitaire induisant la production d'anticorps spécifiques de cet analyte.



Dans le cas de molécules de faibles poids moléculaire ( $< 2$  kDa), il est souvent nécessaire d'immobiliser la molécule cible à la surface d'une protéine porteuse, la faible taille de l'analyte ne le rendant pas naturellement immunogène [32-37]. Cette immobilisation implique d'introduire un bras porteur d'un groupement fonctionnel permettant de lier la molécule cible à la protéine. Cette molécule dérivée de l'analyte cible est appelée haptène. Le bras porteur comporte généralement entre 3 et 6 groupements  $\text{CH}_2$  avec un groupement fonctionnel terminal de type  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$  ou  $-\text{SH}$ . Il est donc crucial de synthétiser une molécule conservant au maximum la structure de base de l'analyte cible. L'haptène peut ensuite être immobilisée de façon covalente à la protéine porteuse. La protéine la plus utilisée est la BSA (*Bovine Serum Albumin*) du fait de son faible coût, de sa grande solubilité, de son potentiel immunogène élevé, de sa disponibilité et de sa bonne stabilité [33-37]. L'intensité de la réponse immunitaire de l'animal va beaucoup dépendre de la densité d'analyte greffé sur la protéine. Un minimum de 15 à 20 haptènes par protéine est nécessaire de manière à pouvoir obtenir ensuite une quantité suffisante d'anticorps [34].

La molécule cible ou le conjugué haptène-protéine porteuse peut alors être injecté à l'animal. Les anticorps produits lors de la première exposition d'un animal à un agent étranger sont typiquement des anticorps de classe IgM [34]. Après des expositions répétées, des anticorps de classe IgG vont également être produits. C'est cette seconde réponse immune qui produit les anticorps les plus appropriés pour les applications en SPE ou en chromatographie d'affinité [38]. Deux types d'anticorps peuvent être produits : des anticorps dits polyclonaux et des anticorps dits monoclonaux.

Les anticorps polyclonaux sont produits après une réponse immune normale. Ils peuvent se lier à une grande variété d'épitopes sur l'antigène avec une affinité différente et peuvent être produits contre un analyte cible donné en injectant l'antigène ou un conjugué haptène-protéine porteuse à un mammifère (*i.e.* une souris, un lapin, une chèvre ou un mouton). Avant que ces anticorps ne puissent être utilisés pour des applications analytiques des étapes supplémentaires de purifications sont nécessaires pour isoler les IgG [38]. On estime entre seulement 10 et 15% la fraction d'IgG spécifiques du conjugué et donc de la molécule cible mais ils sont moins coûteux et plus rapides à produire que les anticorps monoclonaux.

Les anticorps monoclonaux peuvent être produits grâce à une approche initialement décrite par Köhler et Milstein en 1975 [39]. Des lymphocytes provenant de la rate d'un animal et produisant des anticorps sont isolés après injection d'une solution d'antigène ou d'immunoconjugué. Ces lymphocytes sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses, *i.e.* des cellules tumorales. La lignée de cellules hybrides résultantes, appelées hybridomes, va alors croître dans un milieu favorisant sa croissance et tuant les cellules myélomateuses et lymphocytes non fusionnées. Les cultures d'hybridomes produisant des anticorps spécifiques de l'analyte cible sont ensuite clonées pour avoir au final une culture homogène de cellules fabriquant un anticorps monoclonal. Cette technique permet ainsi d'obtenir un lot d'anticorps rigoureusement identiques. Bien que ce procédé

puisse être fastidieux et difficile, il a l'avantage de produire des anticorps en quantité relativement élevée et présentant tous la même spécificité pour l'analyte cible [38].

### 3.2.1.2 Immobilisation des anticorps

Une fois les anticorps isolés, ceux-ci peuvent être immobilisés sur un support relativement hydrophile (de manière à ce que ce dernier ne génère que peu d'interactions non spécifiques avec l'analyte cible).

#### *a Les supports d'immobilisation*

Plusieurs types de supports peuvent être utilisés pour immobiliser des anticorps de façon à développer des immunoadsorbants. Le support solide doit être chimiquement inerte et mécaniquement stable. Il doit surtout ne pas développer d'interactions non spécifiques et pouvoir être facilement fonctionnalisé avec des groupements permettant ensuite l'immobilisation des anticorps [40]. Plusieurs supports ont été recensés.

Les polysaccharides naturels tels que l'agarose sont peu coûteux et renferment un très grand nombre de groupements hydroxyles propices à l'immobilisation d'anticorps. Ils ne sont cependant stables que sur une gamme limitée de pH (de 4 à 9). Pour répondre à ce problème, un gel commercial, nommé sépharose, hautement ramifié, peut être utilisé à la place de l'agarose [40, 41]. Il est stable sur une gamme de pH plus large (de 3 à 14). La limitation principale de ce type de support reste sa faible résistance mécanique à la pression [40, 41]. Ainsi, bien qu'approprié à une étape d'extraction en différé (sur cartouche par exemple), ce type de supports ne peut pas être utilisé dans le cadre d'un couplage en ligne direct avec la chromatographie liquide. Il peut toutefois s'avérer possible de réaliser un couplage en ligne à condition d'introduire une seconde précolonne de piégeage des composés permettant le transfert des analytes de l'IS vers la colonne analytique [42].

La silice a également été très utilisée [11, 40, 41, 43-46]. Elle présente notamment une bonne résistance mécanique propice au couplage en ligne et peut être activée de manière à introduire une grande variété de groupements fonctionnels favorables au greffage. Cependant ce type de phase présente un inconvénient majeur qui est sa gamme d'utilisation restreinte en termes de pH (de 2 à 8).

Ces deux types de supports ont été majoritairement utilisés sous forme de particules. Ces dernières années, un nouveau type de support, appelé monolithe, a été utilisé pour développer des IS ou supports d'immunoaffinité [47-50]. Les monolithes consistent en un matériau continu présentant une porosité plus élevée que des supports à base de particules lui conférant une perméabilité élevée et une faible perte de charge [47]. Deux grandes catégories de monolithes peuvent être référencées : les monolithes organiques (à base de polyacrylamide, de

polyméthacrylate ou de poly(styrène-divinyl-benzène) et les monolithes inorganiques (à base de silice). Les applications récentes d'immobilisation d'anticorps sur monolithe décrites dans la littérature sont regroupées dans le Tableau 1. La majorité recense l'immobilisation d'anticorps sur monolithe organique à base de glycidil méthacrylate en utilisant des supports commerciaux monolithiques au format disque [51-54], des précolonnes remplies de monolithes [35, 37, 55] ou des pipettes pasteur [56]. Cette immobilisation est par ailleurs le plus souvent réalisée *via* une approche covalente non orientée [35, 37, 53-56]. Enfin, il ressort clairement de ce tableau que même au format conventionnel l'immobilisation covalente sur monolithe à base de silice a pour l'instant été très peu considérée avant ce projet de thèse. Ce type de support étant tout particulièrement adapté aux systèmes miniaturisés, il ne sera pas davantage décrit dans cette partie. Le lecteur est invité à se reporter à la partie 4.1.2.4 de ce chapitre en page 93 pour plus d'informations sur les monolithes.

#### *b Méthodes d'immobilisation*

Les anticorps peuvent être immobilisés sur des supports en utilisant une grande variété de techniques parmi lesquelles le greffage covalent, l'adsorption et l'encapsulation par voie sol-gel.

- *Immobilisation covalente*

L'immobilisation covalente d'anticorps est l'approche la plus couramment utilisée. Les anticorps peuvent être greffés via leurs groupements amine libres en utilisant des supports activés avec des agents d'activation tels que le N,N'-carbonyldiimidazole, le bromure de cyanogène (CNBr) ou le N-hydroxysuccinimide [38, 40]. Ils peuvent également être immobilisés sur des supports fonctionnalisés époxy ou aldéhyde [35, 37, 38, 53-56]. L'utilisation des groupements amine des anticorps est l'une des méthodes les plus faciles pour immobiliser des anticorps. Elle peut néanmoins limiter l'accès des composés aux sites de reconnaissances antigéniques. En effet, cette réaction conduit à un greffage des anticorps dans une orientation aléatoire, ces derniers possédant plusieurs fonctions amines libres (résidus arginine et lysine). Ceci accroît les problèmes de gênes stériques et peut diminuer l'efficacité de liaison. Une étude de Faye *et al* a par exemple montré que seuls  $65 \pm 6\%$  des anticorps anti-HRP greffés sur un monolithe organique à base de GMA-EDMA par approche non orientée étaient actifs [56]. De manière à orienter l'immobilisation des anticorps, une approche consistant à oxyder, en conditions douces, les résidus carbohydate des chaînes lourdes situés au niveau de la région  $F_c$  des anticorps peut être envisagée [51]. Cette oxydation conduit à la formation de groupements aldéhyde pouvant ainsi réagir avec des supports fonctionnalisés avec des groupements amine ou hydrazide. Les anticorps sont ainsi immobilisés via leur région  $F_c$ , laissant les sites de reconnaissance antigénique accessibles. La capacité des supports reste toutefois grandement dépendante du rendement de greffage des anticorps et peut malgré tout s'avérer faible [51].

*Tableau 1 : Immunoabsorbants préparés par immobilisation d'anticorps sur des monolithes dans des formats conventionnels*

| Cible                                          | Immobilisation des anticorps                                  | Support                                 | Format                         | Q <sup>te</sup> greffée (Q) / Capacité (C)          | Elution                                                 | Echantillons                   | Séparation / Détection                              | Ref. |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------|------|
| HSA<br>Ialp humaine                            | Covalente orientée                                            | CIM® époxy                              | Disque (1 mL)                  | C (HSA): 0,3 mg/mL<br>C (Ialp): 0,13 mg/mL          | 0,5 M ac. acétique                                      | Sérum humain                   | HPLC – UV<br>SDS-PAGE<br>Western Blot               | [51] |
| Protéines de membrane plasmique de foie de rat | Covalente – réticulation aux protéines A ou G                 | CIM® avec protéines A ou G immobilisées | Disque (3 mm x 5 mm d.i.)      | n.d.                                                | 0,1 M ac. citrique, pH 2,3 + 1% d'octyl glucoside       | Extraits de membrane plasmique | UV<br>SDS-PAGE<br>Immunoblot<br>LC-MS/MS            | [52] |
| NT-proBNP                                      | Covalente non orientée ou non covalente streptavidine-biotine | CIM® époxy                              | Disque (2,0 x 6,0 mm d.i.)     | C : 250 pmol (covalent)                             | 100 mM HCl (covalent)<br>5% ac. acétique (non covalent) | Sérum humain                   | UV (frontal)<br>Immunoessais (fractions)<br>HPLC-MS | [53] |
| AFB1                                           | Covalente non orientée                                        | CIM® époxy                              | Disque (12 x 3,0 mm d.i.)      | Q : 0,96 mg<br>C : 1,79 nmol                        | 2,4 mL MeOH                                             | Milieu pur                     | HPLC – Fluo                                         | [54] |
| FITC                                           | Covalente non orientée                                        | Monolithe GMA-EDMA                      | Disque 0,95 mm x 4,5 mm d.i.   | Q : 61 ± 5 mg/g<br>C : 1,11 (± 0,04) nmol           | aucune                                                  | Milieu pur                     | HPLC – Fluo                                         | [55] |
| Bisphénol A                                    | Covalente non orientée                                        | Monolithe GMA-EDMA                      | Précolonne 50 mm x 4,6 mm d.i. | Q : 0,21 ± 0,02 µmol IgG/g<br>C : 32 µg par colonne | MeOH/Eau (70/30, v/v)                                   | Eau environnemen tale          | LC-MS/MS                                            | [35] |
| Pyréthroides                                   | Covalente non orientée                                        | Monolithe GMA-EDMA                      | Précolonne 50 mm x 4,6 mm d.i. | Q : 0,20 ± 0,02 µmol IgG /g                         | MeOH/Eau (70/30, v/v)                                   | Milieu pur                     | LC-UV                                               | [37] |
| HRP                                            | Covalente non orientée                                        | Monolithe GMA-EDMA                      | Pipette pasteur (15 mg)        | Q : 8,4 ± 0,2 µg anticorps/mg<br>C : 51 ± 5 µg      | MeOH                                                    | Milieu pur                     | BCA<br>SDS-PAGE                                     | [56] |

*n.d. : non déterminé, AFB1 : aflatoxine B1, BCA : Bicinchoninic Acid Assay, CIM® : Convective Interaction Media (monolithe GMA-EDMA au format disque), EDMA : éthylène diméthacrylate, FITC : isothiocyanate de fluorescéine, GMA : glycidil méthacrylate, HRP : peroxydase de raifort, HSA : sérum albumine humaine, Ialp : protéine inter-alpha inhibiteur, MeOH : méthanol, NT-proBNP : peptide pro-natriurétique N-terminal, SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium*

- *Immobilisation non-covalente*

Une autre méthode d'immobilisation consiste à utiliser un ligand valente secondaire de manière à immobiliser les anticorps de façon non covalente. Cette approche peut être réalisée en utilisant des anticorps biotinylés notamment en incubant les anticorps avec de la N-hydroxysuccinimide-D-biotine à pH 9,0 [38]. Ces derniers peuvent alors être adsorbés à la surface d'un support sur lequel de l'avidine ou de la streptavidine a été préalablement immobilisée. Ces liaisons ont des constantes d'association de l'ordre de  $10^{13}$ - $10^{15}$  M<sup>-1</sup> [57] et peuvent résister à de nombreuses conditions d'élution permettant la récupération de l'antigène sans dissociation de l'anticorps avec le support. Si le couplage de la biotine avec l'anticorps est réalisé avec une amine, la biotine peut éventuellement se lier à l'antigène à proximité ou au niveau des sites liaison avec l'antigène causant ainsi une diminution de l'affinité de l'anticorps pour sa cible [38]. Il peut également en résulter une orientation aléatoire des anticorps biotinylés sur le support de streptavidine. Ces problèmes peuvent malgré tout être minimisés en utilisant de l'hydrazide-biotine, qui réagit avec les résidus carbohydre des anticorps après oxidation de ces régions en conditions douces pour produire des groupements aldéhyde [38].

Une autre approche utilise la liaison de la protéine A ou de la protéine G aux régions F<sub>c</sub> des anticorps. Il s'agit donc d'une approche orientée qui laisse les sites de reconnaissances antigéniques très accessibles. La protéine A et la protéine G sont des protéines de la paroi de cellules bactériennes qui se lient fortement aux anticorps dans les conditions physiologiques [38]. Cependant, lorsque le pH de la solution est diminué (pH ≈ 2-3), cette liaison peut être rompue et l'anticorps élué [38, 52]. Or, des solutions de faibles pH sont parfois utilisées pour éluer l'analyte cible des IS. Une quantité bien plus importante d'anticorps sera alors nécessaire comparée à une approche par greffage covalent pour le développement d'IS réutilisables ayant une capacité élevée dans la mesure où les anticorps devront être élués et remplacés régulièrement. Il est à noter qu'il peut être possible d'immobiliser de façon permanente des anticorps en réticulant les anticorps avec la protéine A ou G immobilisée en utilisant du carbodiimide ou du diméthyl pimélimidate. Rucevic *et al* ont notamment montré que la réticulation d'anticorps sur un disque CIM® par du diméthyl pimélimidate empêchait la désorption de ces derniers au cours de l'élution menée avec une solution d'acide citrique (0,1 M) à un pH de 2,3 contrairement aux anticorps non réticulés d'un disque contrôle [52].

- *Encapsulation*

Une autre approche consiste à piéger les anticorps par encapsulation dans une matrice à base de silice préparée par un procédé sol-gel [58-60]. Avec ce procédé, l'anticorps est incorporé directement dans le mélange de polymérisation. Lors de la polymérisation, le support croît autour de l'anticorps et l'encapsule. Ce procédé sol-gel est particulièrement attractif car le support est formé

dans un solvant doux, majoritairement aqueux, qui permet donc au piégeage d'être réalisé dans un solvant compatible avec l'anticorps ce qui n'entraîne pas de dénaturation significative. De plus, ce procédé permet une immobilisation en une seule étape, simple, rapide et facile à mettre en œuvre.

Cependant, l'encapsulation présente certains désavantages [58]. Elle nécessite une bonne maîtrise de la dimension des pores du matériau synthétisé de manière à ce que ces derniers soient à la fois assez grands pour minimiser la perte de charge du support mais aussi assez petits pour réduire le relargage d'anticorps au cours de l'utilisation de l'immunoabsorbant [61]. En outre, les anticorps étant des molécules de poids moléculaire élevé, dans le cas où l'analyte cible se trouve être une protéine, ce type d'immobilisation ne peut que difficilement être envisagé puisque la diffusion de la protéine cible au travers des pores du matériau sera difficile voire impossible.

### 3.2.1.3 Procédures d'immunoextraction

#### *a Développement d'une procédure en différé*

Dans la plupart des cas, un IS est préparé par immobilisation des anticorps sur des particules de silice ou de sépharose conditionnées ensuite dans des cartouches au moyen de frittés de façon à être utilisé ensuite en suivant la procédure d'extraction en différé décrite en Figure 6 en page 34. De façon générale, un IS est stocké dans du tampon phosphate salin (PBS : *Phosphate Buffered Saline*) contenant un faible pourcentage d'azoture (un agent anti-bactérien). Certaines études ont d'ailleurs montré qu'une conservation sans cet agent pouvait conduire à une perte de rétention de l'IS de l'ordre de 70% après 30 jours [37]. L'étape de conditionnement consistera alors à remplacer ce tampon par de l'eau ou en renouvelant le tampon PBS. Lors de la synthèse d'un IS et lors du développement de la procédure d'extraction, plusieurs paramètres doivent être attentivement contrôlés et optimisés pour obtenir une méthode de SPE robuste. La nature de la solution (fraction de percolation et de lavage) utilisée au cours de la procédure peut très bien affecter l'affinité entre l'anticorps et sa cible et donc les rendements. De plus, les interactions analyte-anticorps peuvent être affectées par les composants de la matrice ou par des additifs introduits dans l'échantillon, ce qui peut également diminuer les rendements d'extraction.

#### *a-1 Nature de l'échantillon percolé et étape de lavage*

La percolation doit être réalisée dans un milieu favorisant l'interaction antigène-anticorps, c'est-à-dire dans un tampon ou dans l'eau pure. Si la nature de l'échantillon n'est pas favorable à l'établissement de la liaison anticorps-antigène, l'échantillon peut être modifié par dilution dans un tampon ou dans l'eau, par ajout d'un tampon permettant d'ajuster le pH [40]. Les échantillons contenant des analytes très hydrophobes sont souvent problématiques puisque ces analytes ont tendance à interagir fortement avec les parois de la cartouche, des tubes ou avec les particules greffées via des interactions non spécifiques. L'ajout d'un modifiant organique [62] ou d'un

détergent tel que le Tween 20 [62-65], le Triton X-100 [65] ou le Brij-35 [43] lors de la percolation (voire le lavage) peut diminuer ces interactions mais doit être réalisé avec précaution puisqu'il ne favorise pas l'interaction antigène-anticorps. Il peut également entraîner la perte de ce dernier notamment lorsque celui-ci est immobilisé par encapsulation [61].

Les procédures mises en œuvre sur les immunoadsorbants s'avèrent malgré tout plus facile à développer que les procédures sur les MIP. Par exemple, une étude [29] comparant un immunoadsorbant et un MIP spécifiques de l'ochratoxine A a utilisé une procédure de lavage se résumant à percoler du PBS (pH 7.0) et de l'eau dans le cas de l'IS contre une procédure beaucoup plus longue dans le cas du MIP avec une procédure en 5 étapes consistant à percoler successivement 1mL de HCl 0.1M, 1mL d'un mélange HCl 0.1M/ACN 60/40 (v/v), 10mL d'eau purifiée puis à sécher la cartouche pour ensuite percoler une solution d'acétonitrile contenant 0.01% d'acide acétique.

#### *$\alpha$ -2 Conditions d'élution*

L'élution doit ensuite permettre de rompre l'interaction antigène-anticorps sans perturber la liaison de l'anticorps à son support. Les énergies d'interaction étant très élevées, la désorption ne peut avoir lieu qu'en modifiant drastiquement les conditions expérimentales. Plusieurs solutions peuvent alors être envisagées en fonction de la nature de l'analyte : agents chaotropes, variations du pH ou un mélange eau/solvant organique [11, 40, 41].

Les agents chaotropes sont plutôt utilisés dans le cas de l'élution des protéines. Les ions chaotropes les plus courants sont les ions chlorure, iodure, perchlorate et thyocyanate à des concentrations comprises entre 1,5 et 8 mol/L [11]. Ces ions induisent une dénaturation partielle des protéines (anticorps et protéine cible) conduisant à une rupture de la liaison antigène-anticorps. Ce type d'élution ne peut cependant pas être appliqué aux petites molécules dont la conformation ne sera pas affectée par ces agents. Une élution avec des solutions de faibles pH peut aussi être envisagée pour désorber les petites molécules d'un IS, cependant le choix d'un pH à trois unités du point isoélectrique de l'anticorps est requis [11]. Un inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle requiert bien souvent de grands volumes de solution pour éluer efficacement l'analyte retenu sur l'IS, ce qui diminue le facteur d'enrichissement.

La méthode la plus employée pour l'élution des petites molécules reste donc l'utilisation d'une solution hydro-organique. Des solutions contenant un fort pourcentage d'acétonitrile ou de méthanol ont été utilisées dans de très nombreuses études pour réaliser cette étape notamment pour l'analyse de pesticides [11, 40]. Parfois, l'ajout d'un acide organique (acide trifluoroacétique, acide acétique, etc) au mélange hydro-organique peut être requis de façon à réduire encore le volume d'élution [11]. L'utilisation d'un solvant organique lors de l'élution est cependant dépendante de la stratégie d'immobilisation choisie. En effet, dans le cas d'une immobilisation non-covalente ou d'une encapsulation, la percolation d'une grande quantité de solvant organique peut entraîner des pertes d'anticorps [66].

En définitive, les choix des conditions d'élution se fait principalement en tenant compte de l'affinité de l'anticorps pour sa cible, de l'antigène lui-même et de la stratégie d'immobilisation.

#### *b      Contrôle de la sélectivité de la procédure d'immunoextraction*

Des interactions non spécifiques peuvent se produire entre l'analyte et le support utilisé pour l'immobilisation des anticorps ainsi qu'entre des constituants de l'échantillon et le support. Ces interactions sont souvent de nature hydrophobe et ionique et résultent en une diminution de la sélectivité et affectent alors la limite de détection. Les IS à base de silice ou d'agarose se sont avérés minimiser ce type d'interactions générées par le support solide. Lorsque la procédure d'immobilisation implique de la silice activée, la réaction de liaison est habituellement suivie par la neutralisation des groupements libres activés restant sur le support.

Généralement, pour estimer les interactions non spécifiques et ainsi caractériser la sélectivité d'un support, le support greffé par les anticorps spécifiques peut être comparé à deux types de supports : un support non greffé mais ayant été en contact avec tous les réactifs nécessaires au greffage et un support greffé avec des anticorps non spécifiques de l'analyte cible [11]. Ce type d'études donne une indication de la contribution des interactions non spécifiques dans le mécanisme de rétention généré par la procédure d'extraction développée qui peut alors être ré-optimisée notamment par la modification de l'étape de lavage. Il peut aussi indiquer si ces interactions sont dues au support lui-même ou à la combinaison de la région constante de l'anticorps, du bras espaceur et du groupement de couplage.

#### *c      Couplage en ligne*

Le principal intérêt d'intégrer des IS dans un système en ligne est la possibilité d'automatiser l'extraction ainsi que le gain en sensibilité puisque la totalité des composés extraits de l'échantillon est analysée. Il existe deux procédures selon le type d'adsorbant utilisé.

Dans le cas où le support utilisé résiste à la pression (par exemple : particules de silice), l'IS introduit dans une précolonne peut être directement connecté au système de chromatographie liquide. Le principe est alors similaire à celui présenté en Figure 4 en page 27. Ce montage simple est bien adapté pour les molécules de faible poids moléculaire qui nécessite généralement une étape d'élution avec une phase hydro-organique de composition proche de la phase mobile utilisée en LC (en phase inverse). Cette approche a été largement appliquée à l'analyse d'eaux environnementales, il y a maintenant une quinzaine d'années. Elle a notamment permis l'extraction et l'analyse de phenylurées à une concentration de 50 ng/L à partir d'un échantillon de 5 mL d'eaux de surface [67] ou même d'HAPs à des concentrations inférieures à 20 ng/L à partir de 20 mL d'eaux de surface [43]. L'un des grands avantages de cette méthode est de permettre une analyse globalement plus rapide, un maintien de la sensibilité tout en diminuant le volume d'échantillon (l'intégralité des composés



extraits de l'échantillon étant ensuite analysée) ainsi que de réduire la quantité d'anticorps à immobiliser.

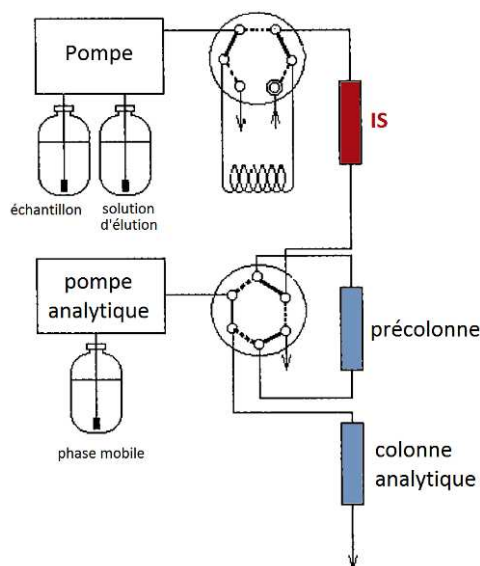


Figure 9 : Couplage en ligne indirect d'un immunoadsorbant. Adapté de [42].

Dans le cas où le support ne résiste pas à la pression, le système doit comprendre deux précolonnes : la première contenant l'IS et la seconde consistant en une précolonne de piégeage conditionnée avec des particules de silice ou avec un copolymère apolaire greffé C8/C18. Ce type de couplage est schématisé en Figure 9. L'échantillon est d'abord percolé au travers de l'IS à faible pression. Après lavage de l'IS, la deuxième vanne est basculée de manière à coupler en série l'IS et la précolonne de repiégeage. Les analytes sont désorbés par une solution aqueuse appropriée et refocalisés sur la deuxième précolonne. Ce transfert est réalisé à faible débit de manière à ne générer qu'une faible perte de charge. Enfin, la deuxième vanne est à nouveau basculée de manière à coupler la précolonne de repiégeage avec la chromatographie liquide ce qui permet à la phase mobile de désorber les analytes et de les entraîner vers la colonne analytique et le détecteur. Si l'ajout de solvant organique est indispensable lors de la désorption des analytes depuis l'IS, l'ajout d'un pourcentage d'eau suffisant pour permettre la refocalisation des analytes sur la deuxième précolonne doit être souvent envisagé. Ceci implique l'ajout d'une deuxième pompe rendant ce couplage plus fastidieux à mettre en œuvre.

Si ces applications en ligne sont relatives à l'utilisation de particules greffées par des anticorps, certaines études ont porté sur le couplage d'IS à base de monolithe, exclusivement organique à base de glycidyl méthacrylate et d'éthylène diméthacrylate (GMA-EDMA), avec la chromatographie liquide (cf. Tableau 1 en page 43), l'avantage de ces supports étant leur résistance à la pression.

Dans une étude, Liang *et al* ont utilisé ce monolithe organique (précolonne 50 mm x 4,6 mm d.i.) pour préparer un IS anti-pyréthroides *via* une immobilisation covalente [37]. Dans les conditions

optimisées, ce support sélectif a permis l'obtention de rendements d'extraction élevés pour la deltaméthrine, la fluméthrine, la flucythrinate et la cis/trans perméthrine (de l'ordre de 100 %) et une rétention faible sur un contrôle consistant en un monolithe greffé avec de l'ovalbumine. Calleri *et al* ont, eux, immobilisé des anticorps polyclonaux anti-AFB1 sur un disque CIM® (12 mm x 3 mm d.i.) consistant en un monolithe de GMA-EDMA. Cet IS, une fois intégré dans un système chromatographique similaire à celui de la Figure 4 en page 27, a été appliqué à l'extraction en ligne de l'aflatoxine B1 (AFB1), la sélectivité de l'extraction ayant été cette fois mise en évidence grâce à un disque CIM® non greffé [54]. Enfin, une méthode d'extraction sélective en ligne du bisphénol A (BPA) à partir d'échantillons d'eau suivie par une quantification par LC-ESI-MS/MS a été décrite en utilisant des anticorps anti-BPA immobilisés de façon covalente à nouveau sur un monolithe à base de GMA-EDMA (50 mm x 4,6 mm d.i.) et un support contrôle non greffé [35]. Des rendements d'extraction supérieurs à 91% ont été obtenus sur l'IS tandis que les aires des pics du BPA sur le contrôle n'ont été évaluées qu'à environ 26% de celles sur l'IS. La méthode a permis d'atteindre une limite de détection de 0,3 ng/L en utilisant un volume d'échantillons de 100 mL. Des échantillons d'eau du robinet, d'eau de lac et d'effluent de station d'épuration ont aussi été analysés avec des rendements respectifs très satisfaisants, de 87%, 110% et 113%, respectivement.

Enfin, le couplage avec la chromatographie en phase gazeuse peut être envisagé mais n'est pas aussi évident qu'en LC. Ce couplage a notamment été décrit par l'équipe de Brinkman en 1999 [68] et appliqué à l'extraction et l'analyse de l'atrazine. Le principe d'un tel couplage est schématisé en Figure 10. Dans ce cas, l'IS est constitué d'une précolonne conditionnée avec des particules de cellulose greffées avec des anticorps anti-atrazine. Après élution avec une solution acide, l'analyte est transféré et refocalisé sur une précolonne polymérique. Après une étape de lavage et de séchage sous flux d'azote, l'élution depuis la précolonne de repiégeage et le transfert vers la colonne de chromatographie gazeuse est réalisé grâce à une solution d'acétate d'éthyle et une interface « on-column ». Le gain en sélectivité avec un IS est tel qu'un détecteur peu sélectif à ionisation de flammes (FID) a pu être utilisé permettant de diminuer grandement la limite de détection de l'atrazine jusqu'à 15-25 ng/L.

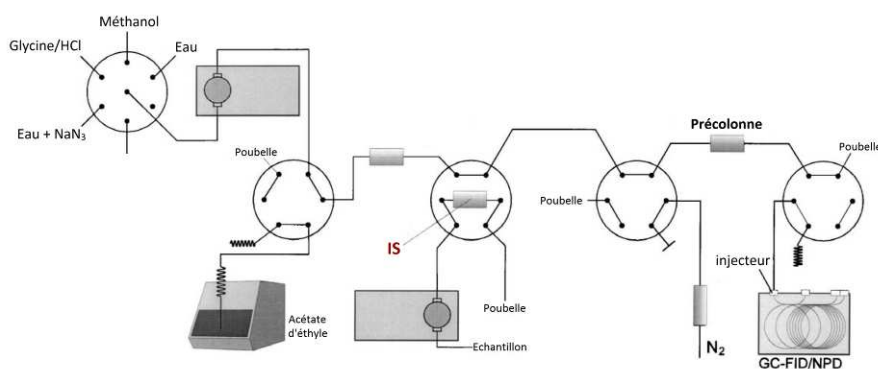


Figure 10 : Couplage en ligne d'un immunoadsorbant avec la GC. Adapté de [68]

## 3.2.1.4 Caractéristiques des immunoadsorbants

## a Taux de greffage

Le taux de greffage (ou densité de greffage) correspond au nombre total d'anticorps immobilisés à la surface du support. Il peut être déterminé en mesurant la concentration initiale d'anticorps dans la solution utilisée pour l'immobilisation et la concentration finale restante après la procédure de greffage par dosage au BCA (méthode colorimétrique de dosage des protéines) [56], par la méthode ADECA (méthode colorimétrique déterminant la densité d'amines surfaciques) [56, 69] ou éventuellement par une méthode destructive de broyage du support suivie d'un dosage au BCA [55, 56]. Il dépend de la surface spécifique accessible aux anticorps. Des supports présentant des pores de faibles diamètres ont une surface spécifique très élevée mais les anticorps étant des protéines de grande taille, l'accessibilité des pores pour le greffage sera faible. A l'inverse des matériaux présentant des pores de grand diamètre permettront une meilleure accessibilité mais auront une surface spécifique faible. Un compromis doit donc être trouvé de manière à avoir une densité de greffage optimale. L'importance de la taille des pores du matériau sur la quantité d'anticorps immobilisés a notamment été décrite par une étude de Jiang *et al* [55] pour le greffage d'anticorps sur monolithe organique à base de GMA-EDMA. La surface spécifique et la porosité de ce type de monolithes varient beaucoup en fonction de la composition du porogène utilisé tel qu'illustré en Figure 11-(a).

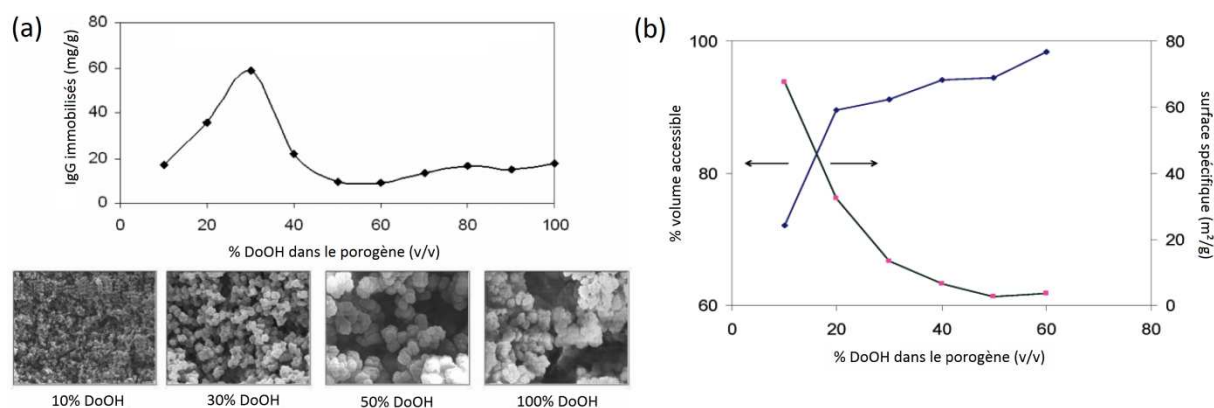


**Figure 11** : Effet de la composition du porogène (a) sur la quantité d'IgG immobilisées sur des monolithes de GMA-EDMA. Immobilisation : 10 mL d'une solution d'IgG à 0,6 mg/mL, à pH 8,0, 0,10 M de tampon phosphate appliqué sur la colonne monolithique à un débit de 1 mL/min à  $T_{\text{ambiante}}$  pendant 40 h. (b) sur la surface spécifique et le volume poreux accessible pour des IgG de lapin. Adapté de [55]

Comme cette figure l'indique, la surface spécifique et le type de pores engendrés dans le monolithe ont une importance cruciale car ils peuvent avoir un effet prononcé sur la surface qui sera effectivement accessible à l'anticorps pour l'immobilisation. Il est montré ici que lorsque la fraction de dodécanol (DoOH) dans le porogène augmente de 10 à 30%, la quantité finale d'IgG immobilisée augmente de 17 à 60 mg/g. Cette augmentation est suivie d'une diminution de cette même densité

de greffage lorsque le pourcentage de DoOH est augmenté de 30 à 55%. Il a été ainsi démontré dans cette étude qu'il existe une quantité maximale d'anticorps qu'il est possible d'immobiliser sur un monolithe de GMA-EDMA. Ce comportement peut être expliqué par l'évolution de la surface spécifique ainsi que par la morphologie du monolithe. La Figure 11-(b) montre que la surface spécifique du monolithe augmente drastiquement lorsque la quantité de DoOH dans le porogène décroît. Cette augmentation est similaire à celle de l'augmentation de la quantité d'IgG immobilisées dans l'intervalle 50% à 30% de DoOH. Par contre, en dessous de 30% de DoOH, la baisse de la quantité d'IgG immobilisés peut être attribuée à la diminution du volume accessible aux anticorps. En effet, avec un tel ratio de DoOH des particules et agrégats bien plus petits sont obtenus conduisant alors à une diminution globale de la dimension des pores. Ceci réduit par la même occasion le volume accessible aux anticorps bien que la surface spécifique augmente.

La quantité d'anticorps pouvant être immobilisés sur un support est aussi affectée par les conditions d'immobilisation qui influent sur la cinétique de liaison de l'anticorps au support. Cette cinétique a été, entre autres, étudiée par l'équipe de Hage sur un monolithe organique à base de GMA-EDMA [55].

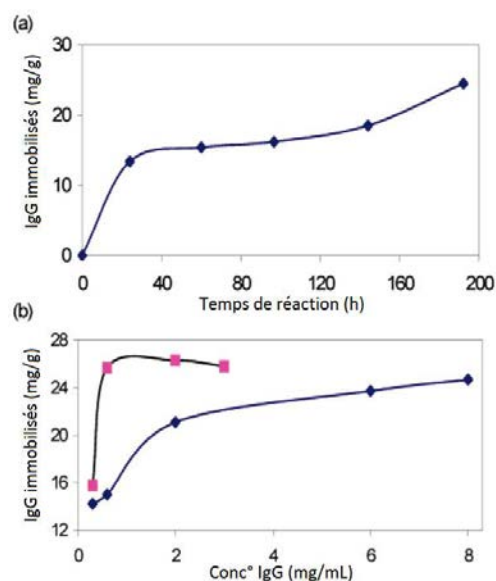


**Figure 12 :** Effet (a) du temps d'immobilisation et (b) de la concentration en anticorps sur l'immobilisation d'un IgG de lapin sur un monolithe de GMA/EDMA conditionné dans une colonne (4 mm d.i x 10 mm) par une méthode epoxy. Immobilisation : 10 mL d'une solution d'IgG à pH 8,0, 0,10 M de tampon phosphate percolée au travers de la colonne. En (a) la concentration en IgG dans la solution de greffage est de 0,6 mg/mL. En (b) le temps de réaction est de 40 h (♦) et de 144 h (□). Adapté de [55].

Il est visible en Figure 12 que la quantité d'anticorps greffés en percolant une solution d'IgG de lapin à 0,6 mg/mL à travers le support pendant des durées variables augmente puis atteint un plateau. Pendant le premier jour d'immobilisation la quantité greffée augmente drastiquement jusqu'à environ 12 mg/g. Au-delà, bien que la durée d'immobilisation augmente, la quantité d'anticorps greffés n'augmente que peu, jusqu'à une valeur finale d'environ 25 mg/g après près de

200 h d'immobilisation (soit un gain d'un facteur 2 pour une durée d'immobilisation 8 fois plus longue) montrant ainsi qu'un greffage de courte durée de l'ordre de 24 à 40 h était dans ces conditions suffisant pour avoir un taux de greffage optimal. Faye *et al* [56] ont également montré que la quantité d'anticorps anti-HRP immobilisés sur un monolithe à base de GMA-EDMA était seulement 18% plus élevée après 12h de contact qu'après 30 min confirmant qu'un greffage de courte durée peut être suffisant. De plus, une immobilisation trop longue peut résulter en une augmentation de la dénaturation des anticorps ou du développement d'interactions protéine-protéine [55].

D'autres facteurs tels que l'effet de la concentration en IgG dans la solution sur la quantité d'anticorps immobilisés ont également été étudiés. Dans l'exemple donné en Figure 12-(b) il apparaît qu'utiliser une concentration supérieure à 2 mg/mL en IgG dans la solution de greffage ne semble pas nécessaire pour un temps d'immobilisation de 40 h puisque la quantité d'anticorps greffés n'augmente que très faiblement au-delà de cette valeur. Cependant, il est aussi visible qu'en augmentant le temps d'immobilisation dans ce cas, à 144 h (*i.e.* en abaissant le débit de percolation de la solution d'anticorps), les mêmes solutions ont permis d'obtenir une quantité d'anticorps greffés bien plus importante à partir de concentrations en anticorps plus faibles. Ici une solution à 0,6 mg/mL est suffisante, au-delà la quantité greffée n'augmente plus. D'autres paramètres tels que le pH de la solution d'immobilisation (pH de 6,7 à 9,3), la température (4°C et 28°C) ou la force ionique du tampon d'immobilisation (phosphate 0,1M ou 0,5M) ont aussi été évalués mais n'influencent que très peu le taux de greffage [55].

## *b*      Capacité

Bien que le taux de greffage soit un paramètre très important, il n'est pas suffisant pour connaître le nombre d'anticorps greffés ayant conservé leur activité après immobilisation, bien que nombre d'auteurs se contentent de ce paramètre. Un autre paramètre primordial est la capacité de l'IS. La capacité correspond à la quantité maximale d'analyte cible qu'il est possible de percoler à travers l'IS sans observer de perte de rétention. Elle est directement liée au nombre d'anticorps actifs à la surface du support. De ce fait, la capacité dépend du taux de greffage mais aussi de l'accessibilité des anticorps pour l'analyte cible et de la nature des anticorps puisque l'utilisation d'anticorps polyclonaux réduit le nombre global d'anticorps participant à la rétention comparé aux anticorps monoclonaux. Une façon simple pour mesurer la capacité d'un IS consiste à extraire des quantités croissantes de l'analyte cible sur l'IS et à analyser les fractions d'élution résultantes. Ainsi, en traçant la quantité d'analyte retenue sur l'IS en fonction de la quantité percolée, il est possible de déterminer la capacité. Un exemple d'une telle mesure est présenté en Figure 13.

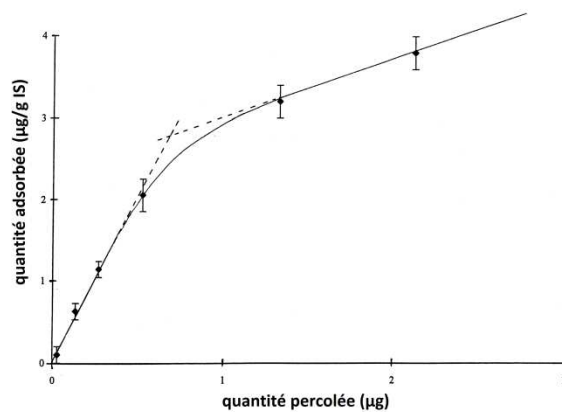


Figure 13 : Exemple de courbe permettant une mesure de la capacité. Adapté de [36]

Cette courbe présente deux parties. La première partie linéaire (quantité injectée < 0,6 µg) présente une pente élevée et correspond à un rendement d'extraction constant de 80-90 %. Dans cet intervalle, l'analyse est quantitative. L'ensemble des sites de liaison des anticorps n'est pas lié à un antigène. Ensuite, une rupture de pente caractéristique d'une chute de rétention est observée. La deuxième partie de la courbe, également linéaire, présente cette fois une pente beaucoup plus faible, dans cet exemple de l'ordre de 15 % exprimée en rendements. Cette diminution de rendements est due à la saturation de l'ensemble des sites de liaison des anticorps et donc au dépassement de la capacité de l'IS. D'un point de vue pratique, la capacité peut être définie comme étant la limite supérieure de la première partie linéaire de la courbe, ici 0,6 µg. Dans un cas idéal, où la procédure d'extraction développée permet de s'affranchir complètement des interactions non spécifiques, la deuxième partie de la courbe est un plateau (pente de 0%). La pente de 15 % présentée dans cet exemple correspond donc à la contribution des interactions non spécifiques dans le mécanisme de rétention qui conduit à un rendement d'extraction de 15%.

L'un des principaux paramètres affectant l'immobilisation des anticorps sur un support est la gêne stérique due à leur taille importante. Une étude réalisée au LSABM en 2001 a ainsi montré que la capacité des IS pouvait être limitée par cette gêne stérique [70]. En effet, la capacité n'évolue pas linéairement avec la concentration en anticorps de la solution utilisée pour le greffage : lorsque la quantité d'anticorps en solution dépasse 1 mg pour 100 mg de support, la capacité réellement obtenue est inférieure à celle attendue. La gêne stérique entre les anticorps qui empêche l'accès du soluté à l'ensemble des anticorps peut expliquer ces observations. De ce fait, une quantité de 1 mg d'anticorps en solution pour 100 mg de support est la valeur optimale pour ce type d'anticorps et d'adsorbant.

### c Rendements d'extraction

Un paramètre important de l'immunoextraction est le rendement d'extraction, qui est lié au volume de fin de fixation et à la capacité. Afin d'atteindre des limites de détection basses, l'IS doit permettre la percolation de volumes importants d'échantillons sans perte d'analytes. Ce paramètre

n'est pas si important dans le cas d'échantillons de sérum ou plasma, mais devient plus pertinent lors de la manipulation d'échantillons d'urines, généralement dans l'intervalle 5-25 mL et d'échantillons environnementaux qui peuvent dépasser plusieurs centaines de mL lorsque la détermination de l'analyte est désiré au niveau du ng/L en utilisant la LC couplé un simple détecteur UV [40].

Tout comme pour les supports conventionnels de SPE, en immunoextraction un volume de fin de fixation peut être défini. Il représente le volume maximal d'échantillon qui peut être percolé avec un rendement théorique de 100% pour une quantité fixée de support. Si la capacité n'est pas dépassée, ce qui est généralement le cas en analyse de traces, ce volume de fin de fixation dépend uniquement de l'affinité entre l'analyte et l'anticorps. De ce fait, plus l'affinité et donc le volume de fin de fixation seront élevés, meilleure sera la limite de détection. Un compromis doit donc être trouvé entre le coût et la quantité approprié d'anticorps greffés à la surface.

#### *d Réactivité croisée et spécificité*

L'objectif premier de l'utilisation d'anticorps est bien entendu l'obtention d'une forte spécificité. Comme mentionné précédemment, un anticorps peut se lier à un ou plusieurs analytes présentant des structures similaires à l'analyte ayant induit la réponse immunitaire. On parle alors de réactivité croisée. Cette propriété est généralement considérée comme un handicap pour des immunoessais mais est à l'inverse très attendue en extraction car l'immunoextraction est suivie d'une étape de séparation chromatographique et détection permettant la quantification de chaque composé retenu individuellement. Pour les échantillons biologiques il peut être intéressant de déterminer un groupe de composés pharmaceutiques ainsi que leurs métabolites. Dans le domaine de l'environnement, les analyses concernent souvent des classes de polluants et pas seulement un analyte donné.

#### 3.2.1.5 Régénération et réutilisation

Idéalement, tout comme les autres supports de SPE, les IS ne devraient pas être réutilisés pour limiter les risques de contamination. Cependant, lorsqu'ils ne sont pas commercialement disponibles ou lorsqu'ils sont utilisés en ligne, la tendance est plutôt de les réutiliser du fait du coût des anticorps. Ils sont généralement régénérés en percolant une solution de PBS et conservés ensuite à 4°C lorsqu'ils ne sont pas utilisés pendant une durée supérieure à 24 h. Un agent antimicrobien, tel que l'azoture de sodium est très souvent ajouté à cette solution de conservation. Cependant, avec le temps et un nombre d'utilisations important, une diminution de capacité est souvent observée. La possibilité de réutiliser un IS dépend beaucoup de la robustesse du support d'immobilisation. De très nombreuses études ont fait état de la réutilisation de supports commerciaux et/ou « faits maison » à base d'agarose, de sépharose ou de silice.

### 3.2.1.6 Apport en sélectivité des immunoadsorbants

Du fait du fort degré de purification permis par les IS, ces derniers ont été appliqués ces dernières années à l'extraction de très nombreux composés dans des matrices très variées. Ils permettent le développement de méthodes de traitement de l'échantillon rapides et en une seule étape comparées avec des méthodes conventionnelles qui doivent parfois être combinées entre elles pour des échantillons très complexes et permettent de s'affranchir de l'utilisation de solvants tels que l'hexane, le dichlorométhane, l'acétone, et d'autres supports conventionnels utilisés généralement pour la purification d'échantillons complexes. Le principal avantage des IS est que l'extraction et le lavage sont réalisés simultanément sur le même support et, même si leur prix est élevé, ce prix doit surtout être comparé au prix des nombreuses cartouches de supports conventionnels devant généralement être utilisées pour la purification d'un échantillon et nécessitant le développement de procédures d'extraction différentes augmentant par la même occasion le temps de manipulation. Le gain en fiabilité au niveau des résultats (du fait de la sélectivité) s'avère également élevé.

#### *a Immunoadsorbants appliqués aux petites molécules*

Ces dernières années, beaucoup d'IS ont été développés pour l'analyse de traces de pesticides et autres micropolluants organiques, principalement pour l'analyse environnementale et le contrôle alimentaire [11, 40, 61]. Le principal avantage d'utiliser un IS avant une séparation en LC est de permettre l'utilisation de détecteurs simples tels que l'UV ou la fluorescence et l'atteinte de limites de détection faibles grâce à une ligne de base globalement épurée du fait de l'élimination des interférents de la matrice. Un exemple présenté en Figure 14 compare les chromatogrammes obtenus après analyse par HPLC-UV d'un échantillon d'eau en sortie d'un barrage, sans et avec couplage en ligne d'un IS spécifique d'un insecticide, le carbofuran [60]. Le chromatogramme de l'éluat issu du protocole d'immunoextraction est clairement plus propre que celui de l'échantillon d'eau non purifié. Les pics des composants de la matrice y sont en effet moins intenses et les deux métabolites du carbofuran (3-kéto-7-phénolcarbofuran et 7-phénolcarbofuran) ainsi que le 2,4-dichlorophénol observés dans l'échantillon ont été clairement éliminés grâce à la purification sur l'IS. Le pic du carbofuran s'y retrouve par ailleurs parfaitement résolu et la co-élution avec le 7-phénolcarbofuran observé initialement dans l'échantillon ne gêne plus la quantification du carbofuran. Cet exemple met ainsi en lumière la sélectivité des IS ainsi que leur spécificité et leur fort pouvoir purifiant.



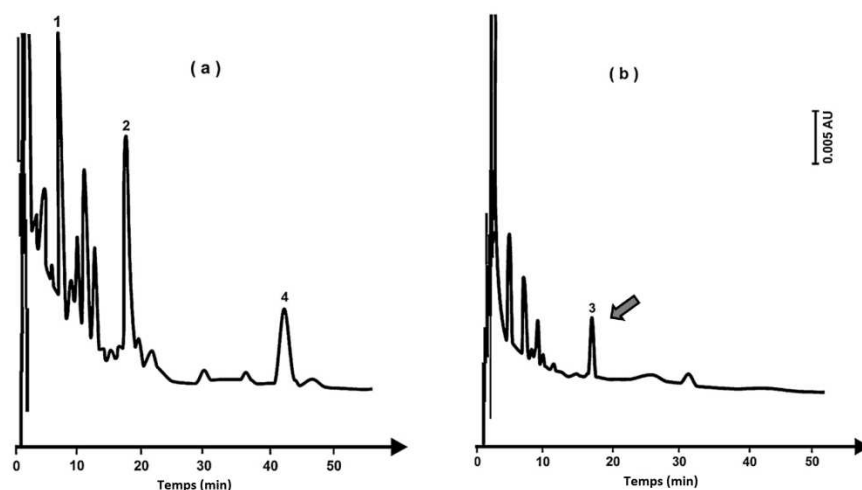


**Figure 14** : Analyse d'eau provenant de la retenue d'un barrage (50 mL). Chromatogrammes de : (a) eau en sortie de barrage, (b) éluat d'un IS anti-carbofuran, analysé par IS-HPLC-UV en ligne (280 nm). Phase mobile : ACN/eau 23/77 (v/v), débit : 1 mL/min. Solutés : (1) 3-keto-7-phenolcarbofuran (dopé 2,24 ng/mL), (2) 7-phenolcarbofuran (dopé 2,24 ng/mL), (3) carbofuran (dopé 1,12 ng/mL), (4) 2,4-dichlorophenol (dopé 2,27 ng/mL). Adapté de [60].

Le couplage en ligne d'un IS avec la GC, tel que décrit précédemment (cf. page 49) a également été appliqué à l'analyse d'échantillons d'eau réels contenant des triazines détectés par un simple FID non sélectif avec une limite de détection de l'ordre de 15-25 ng/L à partir d'un échantillon de 10 mL [68]. Les échantillons alimentaires sont bien plus complexes que les eaux de surface et nécessitent généralement une préparation de l'échantillon bien plus poussée. L'immunopurification de ce type d'échantillons constitue également un outil très puissant. Ce potentiel de purification a été appliqué à des mycotoxines telles que les aflatoxines, ochratoxines, fumisonines, patuline et zearalenone dans les aliments [54, 71-83]. De nombreuses méthodes ont été validées et constituent aujourd'hui des méthodes officielles [73, 84]. De ce fait, des immunoabsorbants au format cartouche (Aflaprep®, Ochraprep®, Easi-Extract®, Starline™, OchraTest™, ZearalaTest™, etc) sont aujourd'hui commercialisés par de nombreux fabricants (R-Biopharm, Romer Labs, Randox Life Sciences, Vicam, etc) [71-75, 77, 79, 84]. De nombreux formats sont proposés dans l'intervalle de capacité de 50 à 1000 ng [11]. Certains d'entre eux sont même considérés comme étant réutilisables, avec la possibilité de les utiliser pour la percolation de 10 à 200 échantillons [11]. Des IS au format précolonne 50 mm x 2,1 mm d.i. sont également disponibles [11]. Parmi les IS disponibles, des cartouches peuvent contenir un mélange d'anticorps tels que des anticorps anti-aflatoxine et anti-ochratoxine A (AflaOchra™, Vicam) permettant ainsi l'extraction simultanée des aflatoxines G1, G2, B1, B2 et de l'ochratoxine A dans une grande variété de produits alimentaires tels que le cacao [83], le pollen [81], le beurre de cacahuète [80], le maïs [80] et le paprika [82]. Cette association est particulièrement intéressante car ces deux classes de mycotoxines peuvent être analysées simultanément par LC-fluo. Bien qu'une détection par fluorescence apporte déjà une forte sélectivité, certaines matrices sont tellement complexes que l'immunoextraction apporte des chromatogrammes globalement épurés, permettant une quantification simple des analytes cibles [54, 71-83].

*b Immunoadsorbants appliqués aux protéines*

L'immunoextraction a été largement appliquée aux protéines. Dans ce cas, l'analyse est le plus couramment réalisée par LC-MS. Cependant, l'ionisation par électrospray des protéines conduit à des spectres complexes présentant une enveloppe d'ions multi-chargés qui requiert leur déconvolution. De ce fait une approche dite « *bottom-up* » est généralement utilisée pour digérer les protéines et produire des fragments peptidiques plus petits qui sont ensuite facilement analysés par LC-MS<sup>2</sup>. De plus, les protéines d'intérêt sont généralement contenues dans un mélange complexe contenant d'autres protéines et molécules plus petites coexistant dans un milieu biologique. Il est estimé que les concentrations en protéines dans les échantillons biologiques couvrent 12 ordres de grandeur. Dans le plasma, 22 protéines représentent 99% du contenu protéique et les protéines d'intérêt et biomarqueurs appartiennent aux 1% restants [85]. Malheureusement, lors de l'ionisation d'un tel mélange par électrospray, l'identification de protéines peu abondantes est généralement entravée par la présence de protéines plus abondantes telles que l'albumine, la résistine, l'insuline, l'hémoglobine et l'érythropoïétine. L'utilisation d'IS pour l'extraction d'une protéine ciblée s'avère donc d'un grand intérêt.

Une procédure d'extraction en différé sur IS est généralement utilisée pour l'analyse de protéines avant une analyse par LC-MS. Les protéines élués de l'IS sont ensuite digérées en solution en ajoutant une enzyme de digestion (pepsine, trypsine, chymotrypsine). Cependant, cette étape supplémentaire est particulièrement chronophage, une autoprotolyse de l'enzyme peut se produire et les diverses manipulations peuvent conduire à une contamination des échantillons. De manière à contourner ce problème, les enzymes de digestion peuvent être immobilisées sur des supports solides de façon à être intégrées dans des systèmes analytiques permettant l'automatisation de l'analyse. Ces supports sont appelés IMER (*IMmobilized Enzyme Reactors*). La grande majorité des IMER décrits dans la littérature sont basés sur l'immobilisation de trypsine. Cependant cette enzyme clive les protéines à un pH légèrement basique. Or, l'élution des protéines sur un IS se fait généralement à un pH acide (de l'ordre de 2-3) ce qui est incompatible avec une digestion à la trypsine. Une alternative étudiée au cours d'une thèse doctorale soutenue en 2009 au LSABM consiste à utiliser un IMER de pepsine, enzyme clivant les protéines à un pH acide [86, 87]. La pepsine a été immobilisée de façon covalente sur des particules de sépharose conditionnées dans une précolonne intégrée dans le montage en ligne schématisé en Figure 15. Cette approche a permis l'analyse totale en ligne du cytochrome C à partir d'échantillons de plasma. Ce type d'approche sera décrit plus en détail dans le chapitre 5 de ce manuscrit qui est intégralement dédié à la miniaturisation des outils bioanalytiques (IS et IMER) pour l'analyse de protéines.

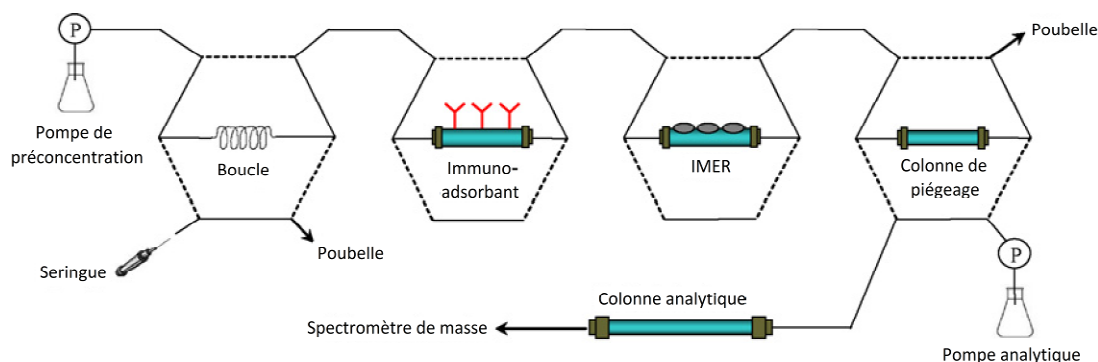


**Figure 15 :** Système en ligne incluant un immunoabsorbant pour l'extraction sélective d'une protéine cible qui est ensuite transférée en utilisant une solution acide vers un IMER contenant de la pepsine immobilisée. Les peptides résultant de la digestion enzymatique sont retenus sur la colonne de piégeage par un polymère hydrophobe et élués par la phase mobile utilisée pour réaliser l'analyse par LC-MS. Adapté de [86].

L'immunoextraction peut également être réalisée dans un cône de pipette (MSIA™ Pipette Tips, Thermo Scientific) et l'éluat directement introduit sur une plaque pour analyse de la protéine cible par MALDI-TOF-MS sans étape de séparation [88]. Des approches sans digestion, impliquant une analyse des diverses fractions par SDS-PAGE, Western Blot, Immunoessais ou une analyse frontale en absorbance UV peuvent être envisagées. Ce type d'approche a notamment été utilisé avec des supports à base de monolithes une fois encore organiques, CIM® (Convective Interaction Media, Bia Separations), conditionné sous forme de disques (cf. Tableau 1 en page 43). Delmotte *et al* ont préparé un IS par immobilisation d'anticorps dirigés contre le peptide pro-natriurétique N-terminal (NT-proBNP) sur des disques CIM® activés époxy (2.0 x 6.0 mm d.i.). Deux méthodes d'immobilisation différentes ont été caractérisées, par liaison covalente au support ou par la formation d'un complexe biotine/streptavidine. Ces deux types de supports ont présenté des performances similaires avec des rendements d'extraction de l'ordre de 94%, cependant aucune injection sur un support contrôle n'a été envisagée ne permettant pas d'évaluer l'apport réel en sélectivité de cette approche. Des capacités de l'ordre du picomole pour un volume de support de 22,4 µL ont été obtenues et considérées comme plus que suffisantes pour isoler des protéines à des concentrations biologiquement pertinentes [53]. Rucevic *et al* ont quant à eux préparé des disques CIM® pour isoler des protéines membranaires [52]. Dans cette étude, des anticorps monoclonaux dirigés contre la CEACAM1 (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*) ont été immobilisés sur un support CIM® greffé par des protéines A ou G. Des extraits contenant un grand nombre de protéines membranaires ont été percolés au travers de l'IS et les fractions de lavage et d'éluion ont été collectées et séparées par SDS-PAGE. La très grande majorité des protéines s'est avérée être éliminée au cours du lavage démontrant la rétention spécifique de la CEACAM1. Brne *et al* ont, eux, utilisé ce même support, pour immobiliser des anticorps par une approche covalente et orientée [51]. Dans cette étude, les groupements époxy du monolithe de GMA-EDMA ont été activés par du dihydrazide d'acide adipique. Les groupements carbohydate des anticorps ont été ensuite oxydés en groupement aldéhyde et les anticorps immobilisés par les groupements hydrazide à la surface du monolithe. Deux anticorps différents ont été immobilisés, un IgY spécifique de la HSA

(Human Serum Albumin) et un anticorps monoclonal spécifique de protéines inter-alpha inhibiteur (IaIp). Ces colonnes ont été testées avec du sérum humain et une bonne sélectivité a pu être démontrée pour les deux protéines cibles grâce à une comparaison de l'extraction des protéines avec un disque CIM® non greffé suivie de la séparation des différentes fractions par SDS-PAGE. Cependant la capacité des deux colonnes s'est avérée être faible et la liaison non spécifique d'autres protéines sur le monolithe organique a été observée.

### 3.2.2 Les oligoadsorbants (OS)

Si les immunoadsorbants constituent un outil puissant pour extraire sélectivement des analytes à partir d'échantillons complexes comme nous venons de le voir, les anticorps présentent néanmoins certains désavantages parmi lesquels leur durée de production qui requiert l'utilisation de mammifères. Une autre stratégie peut consister à utiliser un autre type de biomolécules synthétiques : les aptamères. Ceux-ci ont d'abord été utilisés pour des applications thérapeutiques, pour le diagnostic (en cytométrie de flux, pour la reconnaissance de biomarqueurs cellulaires, etc) ou pour des applications analytiques telles que le développement de biocapteurs (capteurs électrochimiques, optiques ou sensibles aux variations de masse) ou de bioessais [89-93]. Ces dernières années, leur utilisation comme outil d'extraction sélective s'est largement accrue. L'objet de cette partie est de décrire les propriétés des aptamères ainsi que les applications récentes de ces molécules dans le domaine de l'extraction au format conventionnel.

#### 3.2.2.1 Les aptamères

Les aptamères sont des oligonucléotides simple brin, en série ARN ou ADN, pouvant se lier à leurs cibles avec une forte affinité et spécificité grâce à leur structure tridimensionnelle. Cette structure tridimensionnelle est dictée par l'enchaînement des nucléotides les uns aux autres. Ainsi, du fait du très grand nombre de séquences différentes possibles, un très grand nombre d'analytes cibles peut potentiellement être associé à un aptamère. De nombreuses études se sont intéressées aux aptamères ces dernières années. En effet, en plus d'avoir tous les avantages des anticorps, ils présentent une bonne stabilité thermique, sont moins onéreux à produire que les anticorps, et peuvent être utilisés pour de nombreuses applications.

##### *a Structure*

La structure des oligonucléotides est hiérarchisée en trois catégories. La structure primaire, tout d'abord, qui correspond à la séquence des nucléotides. Ces oligonucléotides se replient ensuite et interagissent pour former ce que l'on nomme la structure secondaire (structure tridimensionnelle locale de certains segments) puis tertiaire (structure tridimensionnelle générale).

## a-1 Structure primaire

L'ADN et l'ARN sont composés de seulement quatre nucléotides différents. Tous les nucléotides ont une structure commune : un groupement phosphate lié par une liaison phosphodiester à un pentose (une molécule de sucre à 5 carbones) qui est lui-même lié à une base organique. L'ARN et l'ADN diffèrent l'un de l'autre par leur sucre. En effet, le pentose de l'ARN est un ribose tandis que celui de l'ADN est un désoxyribose. L'autre différence majeure entre ADN et ARN concerne ensuite la nature d'une des quatre bases organiques. Les bases adénine, guanine et cytosine sont présentes à la fois dans les chaînes en série ADN ou ARN, par contre la thymine, elle, n'est présente que dans l'ADN et l'uracile n'est présente que dans l'ARN. Ces bases sont, de façon générale, abrégées A, G, C, T, et U respectivement et leur structure est représentée en Figure 16.

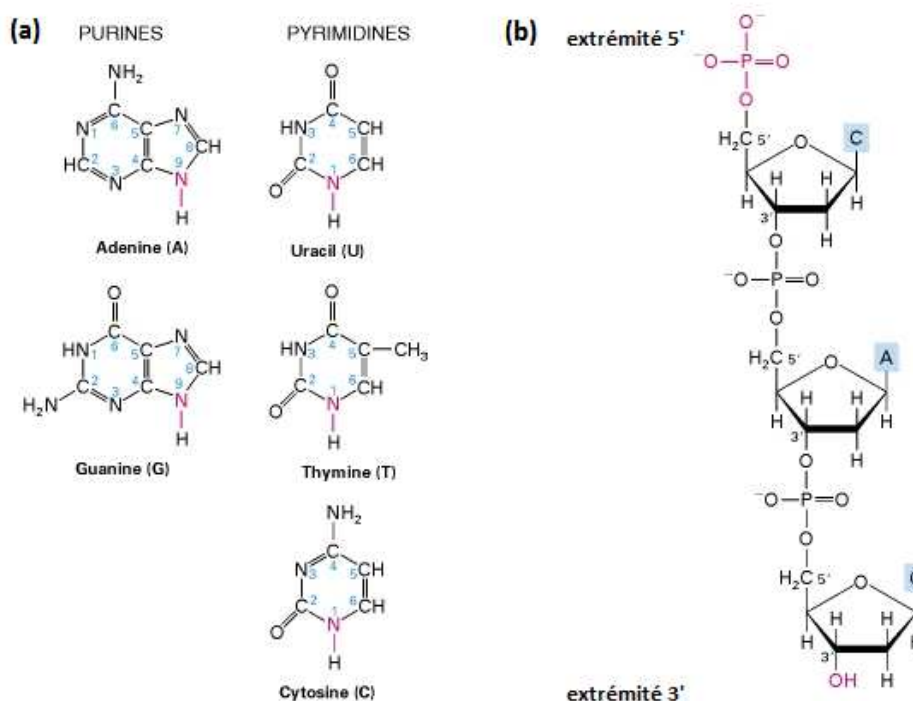


Figure 16 : Structure des acides aminés et de leurs bases et d'un oligonucléotide à trois bases. Adapté de [94].

Les bases organiques consistent en des hétérocycles composés d'atomes d'azote et de carbone. L'adénine et la guanine sont des purines qui contiennent deux cycles aromatiques. La cytosine, la thymine et l'uracile sont, quant à elles, des pyrimidines et ne comprennent qu'un seul cycle aromatique. La structure d'un oligonucléotide simple brin, également présentée en Figure 16, consiste en un polymère phosphate-pentose (un polyester) avec des chaînes latérales constituées des bases purine et pyrimidine. L'extrémité 5' présente un groupement phosphate libre sur le carbone 5' de son sucre terminal tandis que l'extrémité 3' présente un groupement hydroxyle libre sur le carbone 3' de son sucre terminal.

Par convention les séquences d'oligonucléotides sont toujours données dans le sens 5' → 3'. La séquence linéaire des nucléotides, liés entre eux par des liaisons phosphodiester, constitue la structure primaire des oligonucléotides.

### a-2 Structure secondaire

Les aptamères sont capables de former des structures tridimensionnelles stables en solution aqueuse. Puisque les oligonucléotides simple brin suivent les mêmes règles d'appariements de bases que les molécules doubles brins, il est relativement simple de prédire leur structure secondaire. De nombreux algorithmes permettent une modélisation des arrangements secondaires de plus basse énergie en se basant uniquement sur leur séquence. La structure secondaire de base des oligonucléotides simples brins est la double hélice, formée via le repliement du squelette (désoxy)ribose-phosphate de ceux-ci [95]. Des paires de bases complémentaires au sens de Watson et Crick se forment ainsi entre l'adénine et la thymine (ADN) ou l'uracile (ARN) grâce à deux liaisons hydrogène, et entre la guanine et la cytosine grâce à trois liaisons hydrogène.

Les repliements de l'oligonucléotide entraînent la formation de divers motifs structuraux pouvant constituer des structures propices à l'interaction avec un ligand donné. De nombreux motifs structuraux d'aptamères ont été décrits dans la littérature. On en recense trois grands types qui sont schématisés en Figure 17. Le motif le plus connu est premièrement la structure en « épingle à cheveux » ou « tige-boucle » [96]. Il correspond au repliement d'un brin sur lui-même pour former une double-hélice à l'extrémité de laquelle se forme une boucle de quelques nucléotides non appariés (généralement entre 4 et 8). Le deuxième motif est la structure dite en pseudo-nœud [97] qui résulte de l'appariement de nucléotides de la boucle avec des nucléotides présents dans une autre région du brin et située en dehors de la tige. Cette structure présente ainsi deux hélices. Enfin la structure dite G-quadruplexe [98] résulte de l'empilement de plusieurs G-quartets (ou tétrades de G qui correspondent à l'association de 4 guanines dans un même plan cyclique). Chacune est un donneur et un accepteur de deux liaisons hydrogène. L'empilement d'au moins deux tétrades de G délimite au centre une zone chargée négativement qui permet l'inclusion de cations qui permettent de stabiliser la structure. Le repliement en solution ainsi que les changements de conformation en présence de la molécule cible peuvent être ainsi fortement dépendants de la présence de cations divalents [99].

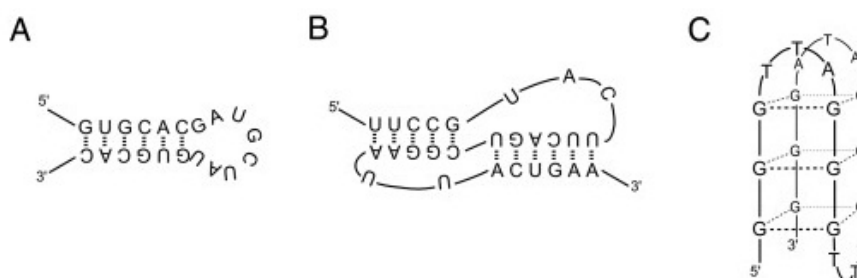


**Figure 17 :** Représentation schématique des principaux motifs structuraux des aptamères. A) la tige-boucle. B) le pseudo-nœud. C) empilement des tétrades de G. Adapté de [89].

### *a-3 Structure tertiaire*

Les structures secondaires préalablement décrites interagissent et forment une structure globale compacte : des riboses interagissent par liaisons hydrogène et stabilisent le rapprochement électrostatiques des hélices, faisant ainsi émerger l'architecture tridimensionnelle de la molécule. L'empilement d'hélices et le compactage de l'ensemble sont enfin la conséquence d'interactions entre boucles. Deux boucles peuvent « s'embrasser » pour former une structure appelée « kissing complex » par appariement de leurs résidus complémentaires. Une boucle peut également s'insérer soit dans une hélice, soit dans une structure réceptrice complémentaire, on parle alors de « docking » [95]. Contrairement aux structures secondaires dont les modélisations se sont avérées fiables, les tentatives de modélisation de la structure tridimensionnelle des aptamères n'ont, jusqu'à présent, pas été aussi concluantes. En effet, les modèles prédits ne présentent que de faibles ressemblances avec les structures déterminées expérimentalement par cristallographie [100] ou par spectroscopie RMN [101].

### *b La sélection des aptamères*

Les aptamères sont sélectionnés via un procédé de sélection *in vitro* appelé SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*). Ce procédé permet de produire des oligonucléotides simple brin, en série ADN ou ARN, se liant spécifiquement à une cible. Ce procédé a été développé parallèlement par l'équipe de Gold, celle de Szostak et celle de Joyce en 1990 [102-104]. Depuis le développement de la méthode SELEX, qui est aujourd'hui une méthode classique de sélection d'aptamères, de nombreux aptamères peuvent être directement sélectionnés *in vitro* contre diverses cibles, allant des petites molécules aux protéines ou même aux cellules [105].

#### *b-1 Principe général de la sélection in vitro*

Le procédé SELEX permet d'isoler un aptamère à partir de bibliothèques d'oligonucléotides. En général ce procédé est divisé en trois étapes qui sont répétées dans le but de sélectionner la séquence d'oligonucléotides présentant la meilleure affinité pour la cible. L'ensemble des étapes du procédé SELEX est schématisé en Figure 18.

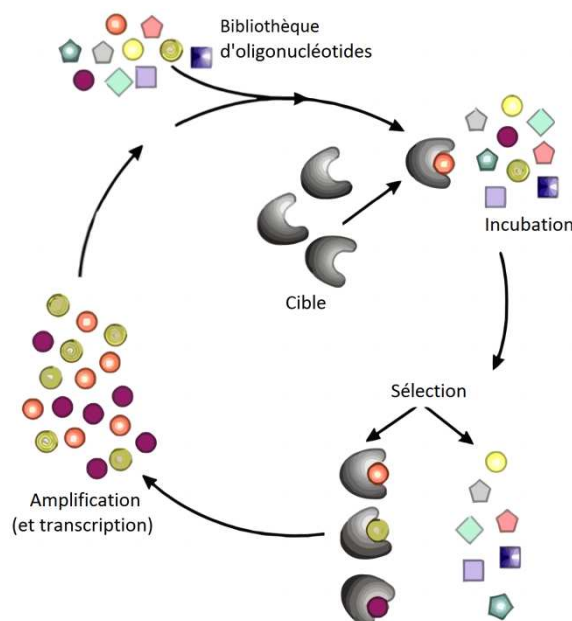


**Figure 18 :** Principe général du procédé d'identification des aptamères : Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment (SELEX). Adapté de [106].

Dans un premier temps une bibliothèque d'oligonucléotides comprenant un très grand nombre de séquences aléatoires est synthétisée. Dans un second temps (incubation et sélection), les séquences de la bibliothèque liées à la cible sont séparées des autres séquences non liées. Cette étape est généralement couplée avec plusieurs autres méthodes pour rendre la sélection de la cible ou de la bibliothèque facile et rapide. Finalement, lors de la troisième étape (amplification), les séquences liées à la cible sont amplifiées par PCR (« *Polymerase Chain Reaction* ») pour créer une nouvelle bibliothèque qui sera utilisée dans le cycle suivant. Un grand nombre d'aptamères sélectionnés sont ensuite tronqués de façon à avoir une taille minimale et ne conserver que la partie active de la séquence après le procédé SELEX.

### *b-2 Les bibliothèques d'oligonucléotides*

Le point de départ du procédé SELEX est la synthèse aléatoire d'une bibliothèque d'oligonucléotides. Les aspects importants pour mettre en place ces bibliothèques sont la taille de la région aléatoire de la séquence, le type de randomisation et les modifications chimiques de l'ADN ou ARN. Ces bibliothèques offrent une grande diversité d'espèces et une grande facilité de screening. Les fragments d'ADN simple brin ( $\approx 10^{15}$  séquences) comprennent une région centrale aléatoire de 20 à 80 nucléotides flanqués de différentes séquences spécifiques de 18 à 21 nucléotides constituant les sites d'amorce pour la PCR. Les études réalisées jusqu'à maintenant ont indiqué que le nombre optimal de séquences différentes pouvant être étudiées simultanément est compris entre  $10^{13}$  et  $10^{15}$  [107, 108]. En revanche, les bibliothèques conventionnelles de composés de faible poids moléculaire (médicaments potentiels) ne comprennent usuellement pas plus de  $10^6$  molécules différentes, c'est-à-dire jusqu'à 1 milliard de fois moins [109].



Certaines bibliothèques peuvent contenir des séquences flanquantes dirigeant les aptamères pour former une structure secondaire spécifique ou inclure des nucléotides modifiés. Ces derniers peuvent grandement élargir le champ des séquences possibles et peuvent aussi influencer les propriétés des aptamères, telles que leur stabilité *in vivo* ou leur résistance à la nucléase [110]. Les nucléotides modifiés peuvent être introduits soit durant la synthèse des bibliothèques ou durant l'optimisation post-sélection. De telles modifications peuvent consister en une substitution de l'un des groupements hydroxyle par un groupement méthyle [111], ammonium [112], fluorine [113], alkyle [114], par une amine aliphatique [115], des polyamines[116] ou en une substitution d'un oxygène dans la liaison phosphodiester avec un atome de soufre [117].

Des bibliothèques ne comprenant que de courtes régions aléatoires semblent suffisantes pour une sélection efficace des aptamères et sont plus facilement maniables et moins onéreuses. De plus, l'utilisation d'aptamères de faible taille est préférée pour de nombreuses applications. Cependant, des régions aléatoires plus longues donnent aux bibliothèques une complexité plus importante ce qui est particulièrement important pour des cibles qui ne sont pas connues pour leur capacité à se lier à des acides nucléiques.

### *b-3 Etape de sélection*

L'étape de sélection est une étape cruciale du procédé SELEX. Elle comprend la liaison des molécules cibles à la bibliothèque d'oligonucléotides, l'élimination ultérieure des séquences non liées et finalement l'élution des oligonucléotides liés à la cible. La sélection est alors mise en œuvre de manière à isoler les molécules présentant la plus grande affinité et spécificité pour la cible à partir de l'immense variété de séquences présentes dans la bibliothèque. Pour ce faire, la bibliothèque d'oligonucléotides est exposée directement à la cible et incubée pendant un certain temps. Plusieurs méthodes peuvent alors être employées pour réaliser cette étape.

- *Ultrafiltration sur membrane de nitrocellulose*

Une méthode couramment utilisée pour l'isolement des séquences d'oligonucléotides sans immobiliser la cible consiste en une ultrafiltration sur des membranes de nitrocellulose permettant une séparation des séquences liées et non liées à la cible basée sur la différence de masse. En 1968, une méthode utilisant ce type de membranes a d'abord été employée par l'équipe de Kramlova pour isoler une protéine à partir de solutions contenant également des brins d'ARN [118]. Quand le procédé SELEX a été mis au point par le groupe de Gold, l'aptamère spécifique de l'ADN polymérase T4 a été isolé en utilisant une stratégie basée sur l'utilisation de ces membranes de nitrocellulose [103]. Cependant, ces membranes ont certaines limitations. Tout d'abord elles sont inefficaces pour isoler les aptamères spécifiques des petites molécules et des peptides. De plus, elles nécessitent généralement au moins 12 cycles de sélection [119, 120]. Enfin, des pertes d'oligonucléotides liés à la

cible ainsi que des interactions non-spécifiques avec la membrane résultant en l'amplification de séquences non-spécifiques peuvent survenir.

- *L'immobilisation sur particules*

L'immobilisation de la molécule cible sur un support solide permet une séparation efficace. Dans ce cas, la bibliothèque d'oligonucléotides est incubée pour permettre la liaison des séquences avec la cible immobilisée.

La chromatographie d'affinité, basée sur l'immobilisation de l'analyte cible (protéines ou petites molécules) sur des particules de sépharose ou d'agarose conditionnées dans des colonnes est ainsi généralement utilisée pour les étapes de liaison et d'élution. De nombreux aptamères ont été sélectionnés en utilisant cette méthode [121-125]. Cependant cette méthode présente certains inconvénients. Elle nécessite tout d'abord une quantité élevée de molécule cible pour pouvoir obtenir une forte densité de greffage. De plus, cette méthode ne peut pas être utilisée si la molécule cible ne présente pas le groupement fonctionnel nécessaire au greffage sur les particules [126].

Plus récemment, la sélection d'aptamère a été réalisée en combinant une stratégie basée sur l'immobilisation de la cible sur des billes magnétiques avec la technique SELEX. L'immobilisation peut être réalisée par simple interaction non covalente ou par liaison covalente. Comparée à l'immobilisation sur particules de sépharose, l'immobilisation sur billes magnétiques ne requiert qu'une faible quantité de molécule cible. De nombreuses études se sont plus intéressées à la sélection d'aptamères par cette méthode du fait de la facilité et de la rapidité d'isolement des séquences de la bibliothèque liées à la cible de celles non liées par l'utilisation d'un simple aimant [113, 127-131]. Enfin, les billes magnétiques permettent de réaliser en parallèle plusieurs essais, à la fois manuellement mais aussi de façon automatisée.

- *CE-SELEX*

L'électrophorèse capillaire (CE) possède de nombreux avantages comparée à d'autres méthodes de séparation analytique notamment en termes de vitesse, de résolution, de capacité et de volume d'échantillon nécessaire pour l'analyse. Cette méthode permet de séparer, sous l'influence d'un champ électrique, des espèces ionisées en fonction de leur charge, des forces de friction qui s'exercent sur elles et donc de leur rayon hydrodynamique [119]. Grâce à cette méthode, un aptamère peut être sélectionné grâce au déplacement de mobilité induit par la formation du complexe aptamère-cible. Son principe est schématisé en Figure 19. Après incubation en solution de la bibliothèque d'oligonucléotides avec la cible, le mélange est injecté en entrée du capillaire. Les séquences liées et non liées à la cible sont alors séparées du fait de leur différence de mobilité. Il est ainsi facile de récupérer les deux fractions séparément. Les étapes suivantes sont alors similaires à celles du procédé SELEX conventionnel décrit ci-avant.

La CE-SELEX permet de s'affranchir des inconvénients liés aux interactions non spécifiques avec le support ainsi qu'à l'inaccessibilité d'une partie de l'analyte cible résultant de l'immobilisation. Un des gros avantages de cette méthode est aussi son pouvoir de séparation accru. En conséquence, la sélection d'un aptamère peut se faire en seulement quelques cycles, généralement de 2 à 4. Le groupe de Mendonsa et Bowser a notamment réussi à sélectionner des aptamères spécifiques du neuropeptide Y et de l'IgE humain après seulement 4 cycles de sélection [132, 133].

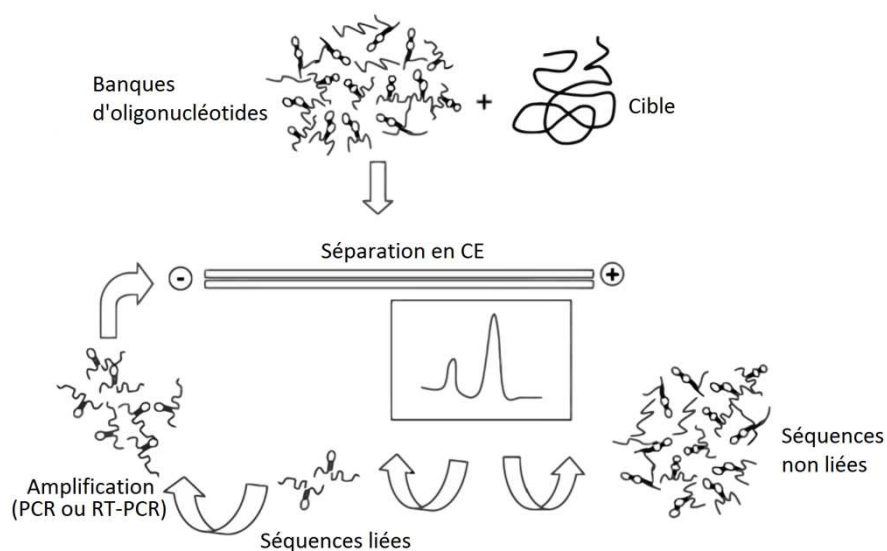


Figure 19 : Schéma de la CE-SELEX. Adapté de [134]

Malgré ces avantages, la CE-SELEX présente tout de même certaines limitations. La nécessité d'avoir une différence de mobilité importante entre les oligonucléotides liés à la cible et ceux non liés implique que l'analyte cible présente un poids moléculaire assez élevé (ex : protéines) pour induire une différence de mobilité importante. Mendonsa et Bowser ont réussi à descendre jusqu'à une masse de 4,2 kDa pour la cible (neuropeptide Y) en diminuant la concentration des séquences d'ADN simple brin [132].

Une autre limitation est le nombre restreint de séquences pouvant être utilisées pour la sélection de façon à éviter toute surcharge du capillaire du fait du faible volume d'injection.

#### b-4 Etape d'amplification

Du fait de la complexité de la bibliothèque initiale d'oligonucléotides, peu de séquences fonctionnelles peuvent être au final obtenues après l'étape de sélection. Il est donc nécessaire d'amplifier les rares séquences sélectionnées de façon à reconstruire une banque enrichie avant de débiter un nouveau cycle. Outre l'amplification du pool d'aptamères sélectionnés, il est aussi possible d'attacher des modifications via des amorces spéciales durant l'étape d'amplification. De cette façon, il est possible d'introduire des groupements fonctionnels aux aptamères pour faciliter leur détection, leur immobilisation ou pour les allonger.

### *b-5 Automatisation et miniaturisation du procédé SELEX*

Dans le but de sélectionner un aptamère de façon plus efficace, des systèmes automatisés de sélection ont été développés. Ces systèmes peuvent permettre de traiter plusieurs cibles en parallèle. De plus, les cycles de sélection peuvent être réalisés sans aucune intervention intermédiaire. Récemment des systèmes microfluidiques automatisés ont aussi été développés [135]. Puisque cette méthode est principalement réalisée sur puce, elle permet d'améliorer l'efficacité de sélection à petite échelle. Par exemple, un aptamère spécifique de la neurotoxine B a été obtenu après un seul cycle de sélection en utilisant un système CMACS (Continuous-flow Magnetic Activated Chip-based Separation) conçu par le groupe de Soh [136]. Le screening d'aptamères spécifique de protéine C-réactive (CRP) a été réalisé automatiquement en utilisant un système microfluidique et des billes magnétiques conjuguées avec la CRP [137]. La microfluidique apparaît ainsi comme une technique à très fort potentiel pour le futur pour la sélection rapide et automatisée de séquences d'aptamères.

### *c Caractéristiques des aptamères*

La séquence d'aptamère sélectionnée est constituée d'une partie variable et d'une partie fixe. Ces parties fixes peuvent allonger la séquence d'environ 50 nucléotides. Généralement, la taille d'un aptamère est inférieure à 100 nucléotides et la grande majorité des aptamères présente une séquence comprise entre 25 et 40 nucléotides. L'aptamère dirigé contre l'ochratoxine A est par exemple composé de 36 nucléotides [138] et celui de la cocaïne de 38 nucléotides [139].

Les séquences d'aptamères identifiées à l'heure actuelle présente une affinité variable pour leur cible respective. En effet, si certaines séquences présentent une affinité très forte pour leur cible, notamment dans le cas des protéines et peptides avec des constantes de dissociation très faible de quelques nanomolaires, d'autres en revanche ont une affinité qui s'avère moins élevée que l'affinité d'anticorps pour ces mêmes cibles. Ces faibles affinités sont particulièrement le fait des petites molécules pour lesquelles des  $K_d$  de quelques centaines de nanomolaires (L-arginine, 17 $\beta$ -estradiol, Moenomycine A 1582, vert de malachite, etc) voire supérieures au micromolaire (cocaïne) sont souvent référencées. Cette différence entre petites et grosses molécules est notamment due à la différence de surface d'interaction avec la séquence d'aptamères qui rend la sélection d'oligonucléotides ayant une affinité très forte pour une petite molécule plus difficile. Quelques exemples de cibles pour lesquelles une séquence a été identifiée sont référencés dans le Tableau 2.

**Tableau 2 :** Exemple d'aptamères développés contre des cibles de différentes tailles et présentant des constantes de dissociation inférieures à 500 nmol.L<sup>-1</sup> (exceptée la cocaïne \*)

| Cible                                              | Type d'aptamère | K <sub>d</sub>   |
|----------------------------------------------------|-----------------|------------------|
| <b>Petites molécules organiques (MW &lt; 2000)</b> |                 |                  |
| L-Arginine                                         | ARN             | 330 nmol/L       |
| Cocaïne                                            | ADN             | 5000 nmol/L*     |
| Cyanocobalamine (cofacteur) 1356                   | ARN             | 88 nmol/L        |
| Dichlofénac                                        | ADN             | 43 nmol/L        |
| Ethanolamine                                       | ADN             | 6-19 nmol/L      |
| 17β-estradiol                                      | ADN             | 130 nmol/L       |
| Fuminosine B1                                      | ADN             | 100 nmol/L       |
| Kanamycine A/B 484                                 | ARN             | ≤ 300/180 nmol/L |
| Lividomycine 777                                   | ARN             | ≤ 300 nmol/L     |
| Vert de malachite                                  | ARN             | 118-800 nmol/L   |
| Moenomycine A 1582                                 | ARN             | 300-400 nmol/L   |
| Neomycine 908                                      | ARN             | ≈ 100 nmol/L     |
| Theophylline                                       | ARN             | 100 nmol/L       |
| Sulforhodamine B                                   | ADN             | 190 nmol/L       |
| Ochratoxine A                                      | ADN             | 50 nmol/L        |
| Oxytetracycline                                    | ADN             | 9-56 nmol/L      |
| Syalil Lewis X (carbohydrates) 820                 | ADN             | 0.085-10 nmol/L  |
| Tetracycline                                       | ADN             | 64 nmol/L        |
| Tobramycine 467                                    | ARN             | 2-3 nmol/L       |
| Zearalenone                                        | ADN             | 41 nmol/L        |
| <b>Peptides et protéines</b>                       |                 |                  |
| Thrombine bovine                                   | ARN             | 164-240 nmol/L   |
| HIV-1 RT                                           | ADN             | 0.18-0.5 nmol/L  |
| Immunoglobuline E                                  | ADN             | 10 nmol/L        |
| Récepteur neurotensine NTS-1 (rat)                 | ARN             | 0.37 nmol/L      |
| Oncostatine M                                      | ARN             | 7 nmol/L         |
| Protéine Prion (PrP <sup>C</sup> )                 | ARN             | 0.1-1.7 nmol/L   |
| Ricine                                             | ADN             | 58-100 nmol/L    |
| L-Selectine                                        | ADN             | 2 nmol/L         |
| Streptavidine                                      | ARN             | 7 nmol/L         |
| α-Thrombine                                        | ARN             | 1-4 nmol/L       |
| TTF-1 ( <i>Thyroid transcription factor 1</i> )    | ADN             | 3-32 nmol/L      |

### 3.2.2.2 Immobilisation des aptamères

Les oligoadsorbants sont préparés en liant l'aptamère à un support solide comme souvent décrit pour des applications en séparation chirale [140-143]. Cette étape d'immobilisation est un paramètre critique pour la mise au point d'OS. De la même façon que pour l'immobilisation d'anticorps, le support doit être inerte chimiquement, avoir une bonne stabilité mécanique, être uniforme, et être facilement activable de façon à permettre l'immobilisation des aptamères. Il doit

également présenter une taille de pores importante, doit être hydrophile dans le but d'éviter les interactions non spécifiques et préserver l'activité des aptamères. Comme nous venons de le voir, les aptamères sont synthétisés chimiquement. Cette synthèse permet l'introduction de modifications aux extrémités 5' et 3' de l'oligonucléotide de manière à faciliter son immobilisation. Cette modification est choisie en fonction de la nature de la liaison à établir. Un bras espaceur peut être introduit dans le but de maintenir les propriétés de liaison de l'aptamère à sa cible lorsque celui-ci se retrouve immobilisé à la surface [144]. Ce bras espaceur peut consister en une chaîne n-alkyle en C6 [145-151], en C12 [140, 146, 148], en tri-[142] ou tétra-éthylène glycol [152], en polyéthylène glycol [153] ou en hexaéthoxyglycol [154].

#### *a Immobilisation non-covalente*

L'immobilisation d'aptamères a été largement réalisée pour développer des phases pour la chromatographie d'affinité et pour le développement de bioessais en utilisant une liaison non covalente de type biotine-streptavidine ou -avidine. Cette liaison, comme déjà évoqué pour les anticorps, est facile à établir sur des supports commerciaux activés à la streptavidine tels que le polystyrène, le verre ou des billes magnétiques. Ce type de ligand est connu pour maintenir efficacement la capacité de liaison de l'aptamère. L'immobilisation est simplement réalisée en mélangeant les aptamères biotinylés avec les supports activés streptavidine [131, 145, 148, 155] ou avidine [141, 156, 157] mais, tout comme pour les anticorps, cette approche non covalente présente un désavantage majeur en termes de réutilisation notamment lors d'une élution impliquant des solvants organiques [145]. La simple encapsulation des aptamères au sein d'une matrice préparée par voie sol-gel a été également étudiée pour le développement d'un OS sous forme de fibre, pour une utilisation en SPME, mais son potentiel s'est avéré être moins élevé que celui développé par une liaison covalente [158].

#### *b Immobilisation covalente*

L'immobilisation covalente des aptamères sur différents types de supports activés est favorisée par la possibilité d'introduire différentes fonctions (amine, thiol, groupements carboxyliques,...) à l'extrémité de la séquence des aptamères au cours de leur préparation. Certains supports, largement utilisés pour l'immobilisation d'anticorps, ont déjà été utilisés. Parmi ceux-ci on peut référencer la sépharose activée CNBr [147, 148, 150] ou activée NHS [159] qui sont particulièrement bien adaptés aux procédures de SPE comme nous l'avons vu précédemment. Dans le cas de procédures d'extraction non plus basées sur la percolation de l'échantillon à travers le support mais consistant en l'incubation ou la mise en suspension de l'OS dans un volume donné d'échantillon, des approches impliquant le greffage d'aptamères sur des nanoparticules d'or [160], des nanotubes d'or [154], des billes magnétiques [131, 151] ou des nanoparticules magnétiques [161] ont été référencées. L'immobilisation covalente sur plaque de silice pour une utilisation directe

en MALDI [162, 163] ou à la surface de capillaires de silice [164] a également été décrite. Enfin, un monolithe à base de PGDMA-EGDMA et greffé avec des aptamères amino-modifiés via l'activation de groupements époxy a été synthétisé dans une colonne (10 x 4,6 mm d.i.) pour une utilisation directe en chromatographie de façon à purifier une protéine [149].

Au vu de l'ensemble des travaux déjà publiés, il est encore difficile à l'heure actuelle d'évaluer la meilleure approche pour l'immobilisation d'aptamères, qu'elle soit covalente ou non covalente. En effet, peu d'études ont été réalisées en SPE et il n'existe, à ce jour, que peu d'études comparatives [145].

### 3.2.2.3 Procédure d'oligoextraction

De la même façon que pour les IS, les OS au format conventionnel sont généralement conditionnés entre deux frittés dans des cartouches ou colonnes pour pouvoir appliquer la procédure de SPE en différé déjà décrite en Figure 6 en page 34 pour les IS suivi de méthodes séparatives telles que la LC ou l'électrophorèse sur gel comme en témoigne le Tableau 3 qui recense les travaux publiés à ce jour et relatifs à l'extraction sur OS. La différence principale avec un IS réside dans le stockage de l'OS. En effet, les OS sont conservés à 4°C, tout comme les IS, mais dans une solution tampon dont la composition est, cette fois, proche du tampon utilisé lors de la procédure de sélection. Ce tampon est appelé tampon de liaison (BB, de l'anglais *Binding Buffer*).

Comme il est visible dans ce tableau, l'extraction de composés à partir d'échantillons réels a également été réalisée en incubant une quantité donnée de particules d'OS dans un volume fini d'échantillon pendant 0,5 à 2h [151, 165]. Après ce temps d'incubation, les particules sont lavées par un solvant adapté puis introduites dans une solution permettant de rompre les interactions aptamère-analyte. Une procédure similaire a également été utilisée après immobilisation d'un aptamère sur une fibre de SPME avec des temps d'incubation de 40 minutes dans l'échantillon [158]. Enfin, un OS peut également être conditionné dans une colonne et être utilisé comme phase stationnaire en HPLC pour l'injection directe d'un échantillon complexe. Après percolation d'une phase mobile de faible force éluante jouant le rôle de solvant de lavage, la force éluante de la phase mobile a été augmentée drastiquement de façon à éluer la molécule cible qui peut être ensuite directement détectée [150].

La grande sélectivité de l'oligoextraction a par ailleurs été exploitée pour l'analyse directe de l'éluat de l'OS par fluorescence [138] ou spectrométrie de masse [153, 166]. Ceci inclut aussi des approches MALDI pour les protéines [160, 162, 163, 167] sans aucune méthode de séparation en amont et avec élimination de la matrice MALDI avec une solution d'eau/acétonitrile [163] ou d'ACN pure [162] avant la réutilisation de la plaque MALDI sur laquelle les aptamères sont immobilisés.

Enfin, il est à noter que, si des IS ont déjà été couplés en ligne avec la chromatographie liquide, aucune étude ne fait référence à l'heure actuelle à ce type de couplage dans le cas des OS.

*Tableau 3 : Applications d'oligoadsorbants dans des formats conventionnels*

| Analyte cible                           | Modification de l'aptamère /Espaceur | Support                                                                    | Format                 | Elution                   | V <sub>éch.</sub> | Facteur de dilution | Matrice                     | Méthode analytique | Ref.  | Année |
|-----------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------|-------|-------|
| ATP                                     | SH/-                                 | AuNP                                                                       | Incubation             | Citrate, CTAB             |                   |                     | Lysat cellulaire déprotéiné | MALDI              | [137] | 2010  |
| Adénosine                               | COOH/-                               | Sol-gel                                                                    | Fibre de SPME          | MeOH/eau (1/1), ultrasons |                   |                     | Plasma humain               | LC/MS              | [158] | 2013  |
| Cocaine                                 | NH <sub>2</sub> /C6                  | CNBr-Sépharose                                                             | SPE(35 mg)             | Eau/ACN (4/6)             | 0.2 mL            | 2                   | Plasma humain               | LC/UV              | [147] | 2009  |
| Cocaine/Adénosine                       | SH/PEG                               | Oxide de Graphène                                                          |                        |                           |                   |                     | Plasma                      | MS                 | [153] | 2010  |
| Cocaine                                 | NH <sub>2</sub> , biotine/C6 C12     | CNBr-Sépharose, thiol-sépharose, Streptavidine-agarose, Glutaraldéhyde-Si, | SPE(35 mg)             | Eau/ACN, (4/6)            | 0.1 mL            | 4                   | Sang post-mortem (après PP) | LC/MS              | [148] | 2011  |
| Cocaine                                 | NH <sub>2</sub> /C6                  | CNBr-Sépharose                                                             | Colonne 50 x 8 mm d.i. |                           | 0,5 L             |                     | Eau potable                 |                    | [150] | 2011  |
| Dichlofénac                             | NH <sub>2</sub> /C6                  | CNBr-Sépharose                                                             | Colonne 50 x 8 mm d.i. |                           | 2 L               |                     | Eau potable                 |                    | [150] | 2011  |
| 17β-estradiol                           | NH <sub>2</sub> /-                   | NCS                                                                        | incubation (50 billes) | EDTA, Urée, Tween 20      | 0.1 mL            |                     | Eau de rivière              | LC/UV              | [165] | 2011  |
| Protéine His-tag (His <sub>6</sub> Tag) | NH <sub>2</sub> /C6, C7              | NH <sub>2</sub> -billes magnétiques                                        | incubation             | imidazole                 |                   |                     | Lysats de E Coli            | SDS-PAGE           | [151] | 2011  |
| Histones                                | Biotine/                             | Billes d'agarose Streptavidine                                             |                        | NaCl                      |                   |                     | Lysat cellulaire            | SDS-PAGE           | [155] | 2012  |
| IgE                                     | SH/-                                 | APTES-verre                                                                | incubation             | aucune                    | 1 µL              | 3                   | Sérum humain                | MALDI              | [163] | 2006  |
| Lysozyme                                | NH <sub>2</sub> /C6                  | monolithe PGDMA-co-EGDMA                                                   | Colonne 10x4.6mm d.i.  | NaClO <sub>4</sub>        | 5 µL              | 4                   | Blanc d'oeuf de poule       | HPLC/UV            | [149] | 2012  |
| Ochratoxine A                           | -/-                                  | DADPA                                                                      | SPE (400µL)            | EDTA, 20%MeOH             | 12 mL             | 4                   | Extrait de blé              | Fluorescence       | [138] | 2008  |
| Ochratoxine A                           | -/-                                  | DADPA                                                                      | SPE (300µL)            | MeOH/tampon (2/8)         | 10 mL             | 4                   | Extrait de blé              | LC/Fluo            | [168] | 2011  |



| Analyte cible                                  | Modification de l'aptamère /Espaceur | Support                                  | Format                         | Elution                         | V <sub>éch.</sub> | Facteur de dilution | Matrice             | Méthode analytique     | Ref.  | Année |
|------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|------------------------|-------|-------|
| Ochratoxine A                                  | NH <sub>2</sub> , biotine/C6         | CNBr-Sépharose, Streptavidine-agarose    | SPE (35 mg)                    | Eau/ACN (6/4)                   | 1 ml              | aucune              | Vin rouge           | LC/Fluo                | [145] | 2011  |
| Ochratoxine A                                  | NH <sub>2</sub> /C6, C12             | CNBr-Sépharose                           | SPE (35 mg)                    | Eau/ACN (6/4)                   | 1 mL              | 10                  | Extrait de blé      | LC/Fluo                | [146] | 2013  |
| Ochratoxine A                                  | NH <sub>2</sub> /C6                  | NH <sub>2</sub> -MNS                     | Incubation                     | ACN/Eau (95/5)+ 1% ac. acétique | 0.1 mL            | 4                   | Extrait de café     | LC/Fluo                | [161] | 2011  |
| Ochratoxine A                                  | NH <sub>2</sub> /C6                  | NHS-sépharose                            | SPE (200µL)                    | MeOH                            | 3 mL              | 10                  | Poudre de gingembre | UHPLC/Fluo             | [159] | 2014  |
| L-sélectine                                    | Biotine/-                            | Résine Streptavidine-polyacrylamide      | Colonne: 5 x 0.5 mm d.i.       | EDTA                            |                   |                     | Cellule CHO         |                        | [157] | 1999  |
| Tétracycline                                   | NH <sub>2</sub> /C6                  | CNBr-Sépharose                           | SPE (35 mg)                    | MeOH/eau (8/2)                  | 0.2 mL            | 3                   | Plasma (après PP)   | ESI-IMS                | [166] | 2013  |
| Thrombine                                      | SH/C6                                | AumNP                                    | Incubation                     | Trypsine pour digestion directe |                   | 10                  | Sérum, sang         | Digestion/ MALDI       | [167] | 2012  |
| Thrombine                                      | SH/-                                 | APTES-verre (surface MALDI)              | Incubation                     | aucune                          |                   |                     | Plasma humain       | MALDI-TOF-MS           | [169] | 2004  |
| Thrombine                                      | SH/-                                 | APTES-capillaire de silice fondue dénudé | Capillaire 47 cm x 100 µm d.i. | Urée, Tris, 50°C                |                   |                     | Échantillon pur     | MALDI-TOF              | [164] | 2006  |
| Thrombine                                      | HS/(EG) <sub>6</sub>                 | Au-nanotubes                             | Incubation                     |                                 | 0.1 mL            |                     | Plasma              | Electrophorèse sur gel | [154] | 2012  |
| TTF1 ( <i>Thyroid transcription factor 1</i> ) | Biotine/-                            | Streptavidine-billes magnétiques         | Incubation                     | DNase Recombinante              |                   |                     | Lysat bactérien     | Electrophorèse sur gel | [131] | 2003  |

ACN: acetonitrile; ATP, adénosine triphosphate; cellule CHO : cellule ovarienne de hamster chinois; CTAB: bromure d'hexadécyltriméthylammonium ; DADPA: diaminodipropylamine; EG: éthoxyglycol; ESI-IMS : ionisation par électrospray – spectrométrie de mobilité ionique; MNS : nanosphère magnétique ; mNP : nanoparticules magnétiques; NCS: billes de silice-isothiocyanate; NP: nanoparticules; PEG : polyéthylèneglycol; PP: précipitation de protéines; SH : Thiol; SPME: microextraction sur phase solide, TRF: fluorescence résolue en temps

## *a Nature de l'échantillon percolé*

Dans la plupart des cas, les conditions de percolation sont proches de la composition du tampon de liaison utilisé lors de la sélection de l'aptamère de manière à favoriser l'interaction entre les deux molécules. La liaison entre un aptamère et sa cible, qui est hautement dépendante de la conformation de l'aptamère, peut être dépendante de la présence de cations propres à chaque aptamère. L'effet de cations monovalents ou divalents sur la conformation des aptamères a ainsi été largement étudié. Nous avons notamment vu précédemment que les aptamères riches en guanosine pouvaient adopter une structure inter- et intramoléculaire en quadruplexe stabilisée par la présence de G-quartets qui sont favorisés par la présence d'ions  $K^+$  [167]. Il a été récemment décrit que le remplacement des ions magnésium par des ions calcium dans le tampon utilisé lors de la sélection de l'aptamère anti-OTA résulte en des constantes de dissociation plus faibles et donc en une affinité plus forte [138]. De plus, cette affinité n'est pas affectée significativement par la concentration d'autres ions (sodium ou potassium) tant que des ions magnésium ou calcium sont présents en solution. La force ionique a donc peu d'effet sur l'interaction entre l'OTA et son aptamère. Cet exemple illustre la nécessité d'étudier l'effet de différents cations de manière à déterminer les conditions optimales dans lesquelles la liaison de la cible à l'OS est la plus forte durant l'étape de percolation. D'autres paramètres tels que la température [143] ou le pH [170] peuvent aussi affecter la conformation des aptamères. L'échantillon peut ainsi être modifié avant percolation par simple dilution dans du tampon ou de l'eau.

Les échantillons solides (sols, légumes, etc) sont usuellement extraits en utilisant des solvants organiques ou des mélanges hydro-organiques. Cependant la percolation d'un extrait contenant une forte teneur en solvant organique peut grandement affecter la rétention de l'analyte par l'aptamère. En effet, il a été décrit, dans le cas du vert de malachite, que l'utilisation d'un pourcentage de méthanol supérieur à 2% réduit fortement la stabilité du complexe aptamère-cible [170]. Ce n'est en revanche pas le cas pour l'OS préparé avec un aptamère anti-OTA qui a pu être utilisé pour des extraits contenant de 10% [161] à 15% de méthanol [168]. Dans la plupart des cas, les extraits contenant une phase organique sont évaporés pour éliminer le solvant organique pouvant affecter l'affinité analyte-aptamère ou dilués dans l'eau ou un tampon aqueux [138, 159, 161, 168]. Cette étape de dilution est aussi réalisée de manière à diminuer la viscosité de certaines matrices avant leur percolation au travers de l'OS [149, 167] ou pour limiter la proportion de solvant organique après une étape de précipitation de protéines dans le cas des fluides biologiques [148, 166]. Cette approche par dilution est plus facile à mettre en œuvre mais le volume percolé doit tout de même être limité à cause des pertes d'analyte pouvant survenir par dépassement du volume de fin de fixation. Or, le risque est de ne percoler qu'une fraction de l'extrait et de diminuer les performances de la méthode en termes de sensibilité.

### *b Conditions d'élution*

Tout comme pour les anticorps, l'étape d'élution doit idéalement rompre efficacement, à savoir par un volume de solvant réduit, les interactions aptamère-analyte sans affecter drastiquement les aptamères immobilisés. Comme indiqué dans le Tableau 3, différentes approches sont possibles de manière à éluer les analytes : des solvants organiques (ACN, MeOH, etc), des agents chaotropes tels que  $\text{NaClO}_4$ , des agents dénaturants tels que l'urée ou le chlorure de guanidinium, des complexants tels que l'EDTA, une élévation de la température, des variations de pH ou des mélanges hydro-organiques. Ces conditions dépendent fortement de la nature de l'analyte, de l'aptamère et du mode de greffage. Par exemple, une fraction d'élution composée de 60% d'acétonitrile a pu être percolée au travers d'un OS constitué d'aptamères spécifiques de la cocaïne liés au support par approche covalente alors qu'un pourcentage de seulement 10% d'acétonitrile peut être utilisé lorsque le même aptamère est lié au support *via* une interaction non covalente de type biotine/streptavidine. Dans ce dernier cas, une élévation de la température jusqu'à 60°C a été utilisée pour accroître la force éluante de cette solution et compenser la faible teneur en acétonitrile [148]. De plus, pour les aptamères sélectionnés dans des tampons ne contenant pas d'ions divalents, la structure tridimensionnelle des aptamères n'est pas dépendante d'un ion divalent. Ainsi, l'élution au moyen d'agents tels que l'EDTA n'est pas possible [151].

### *c Contrôle de la sélectivité de la procédure d'extraction*

De façon similaire aux IS, des interactions non spécifiques peuvent survenir entre l'analyte ou certains composés de la matrice et le support solide. De ce fait, des supports non greffés [150, 155, 159], des supports greffés avec des aptamères non spécifiques de l'analyte considéré [146] ou des supports greffés avec des aptamères dont la séquence est mélangée, i.e contenant les mêmes nucléotides mais dans un ordre aléatoire empêchant ainsi la formation d'un complexe spécifique de l'analyte cible [146, 148, 157, 158, 161-165], peuvent être utilisés pour étudier la sélectivité de l'OS. Ce type d'études donne une indication sur la contribution des interactions non-spécifiques au cours de la procédure d'extraction et indique si ces dernières sont dues au support, aux nucléotides composant la séquence, au bras espaceur ou aux groupements de couplage. L'utilisation de ces supports de contrôle est aussi utile pour optimiser l'étape de lavage et ensuite obtenir une sélectivité optimale [29, 148, 151, 158, 166] même lorsque l'approche suivie consiste en une incubation des particules d'OS avec l'échantillon puis immersion dans une solution de lavage [161]. Un exemple d'optimisation d'une procédure de lavage est présenté en Figure 20. La comparaison des histogrammes correspondant à l'utilisation de nanosphères sans aptamères, de nanosphères greffées avec des aptamères anti-OTA et de nanosphères greffées avec une séquence mélangée montre que deux étapes de lavage sont nécessaires pour éliminer l'OTA des nanosphères

« contrôles » tandis que 90% de la quantité initiale d'OTA est toujours retenue sur les nanosphères greffées avec l'aptamère spécifique de l'OTA.

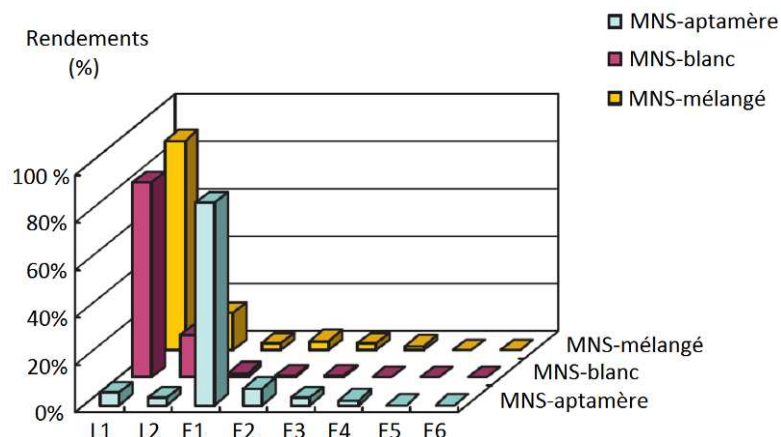


Figure 20 : Profil d'extraction de l'ochratoxine A (OTA) à partir d'un échantillon dopé (200 µg/kg d'OTA) sur des nanosphères magnétiques (MNS) greffées avec des aptamères, sur des MNS greffées avec un aptamère mélangé et sur des MNS non greffées (blanc). Lavage (L): 250 µl de Tris-HCl; Elution (E): 250 µl eau/acétonitrile (5:95 (v/v)). Adapté de [161].

Enfin, l'évaluation de la sélectivité peut être réalisée en contrôlant l'absence de rétention d'analogues structuraux de l'analyte cible tels que la prothrombine dans le cas de la thrombine [162] ou de composés susceptibles d'être présents dans les matrices étudiées [138, 155, 163-165, 167].

### 3.2.2.4 Potentiel des Oligoadsorbants

#### a Capacité et densité d'immobilisation

De façon similaire à l'immobilisation d'anticorps, la densité de greffage des aptamères sur un support peut être déterminée en analysant le surnageant résultant de la solution d'immobilisation en utilisant l'électrophorèse sur gel d'acrylamide [138], une détection UV [152, 157] voire la chromatographie liquide de paires d'ions couplée à une détection UV [148], ce qui conduit à une possible surestimation du nombre d'aptamères immobilisés si les étapes de lavages ultérieures à l'étape d'immobilisation ne sont pas prises en compte dans cette mesure. La détermination de la quantité d'aptamères restante dans le surnageant peut être tout du moins intéressante pour étudier la cinétique d'immobilisation. Par exemple, le temps nécessaire à l'immobilisation de deux aptamères anti-his-tag sur des billes magnétiques amino-modifiées a été optimisé en évaluant la quantité d'aptamères greffés après différents temps d'immobilisation allant de 10 min à 22 h. Comme il est visible en Figure 21-A, la quantité d'aptamères immobilisés augmente au cours des trois premières heures d'incubation et atteint un plateau à une valeur d'environ 800 pmol d'aptamères liés par mg de billes magnétiques quel que soit l'aptamère étudié (6H7 ou 6H5)[151]. La quantité de protéine his-tag liée a ensuite été déterminée par incubation de cette dernière avec les billes d'OS (Figure 21-B). Comme attendu, la quantité de protéines fixées augmente lorsque le temps d'immobilisation des aptamères augmente (et donc la densité de greffage) pour atteindre un plateau

après approximativement 2h d'immobilisation. La différence entre l'évolution de la capacité et l'évolution de la densité d'immobilisation après 3h d'incubation peut s'expliquer, selon les auteurs, par une gêne stérique plus importante lorsque la densité de greffage devient trop élevée ou bien par l'appariement d'aptamères proches, ce qui interfère ainsi avec un repliement optimal des aptamères.

Ainsi, comme nous l'avons vu pour le greffage des anticorps, il existe également une quantité optimale d'aptamères pouvant se lier à un support, *i.e.* un ratio optimal entre la quantité d'aptamères actifs et la quantité d'aptamères utilisée dans la solution de greffage. Toujours dans cette même étude, Kökpinar *et al* ont également montré que des concentrations d'aptamères supérieures à 1 mg/mL lors de l'immobilisation n'entraînent pas un accroissement de la quantité de protéine cible liée à un OS, *i.e.* de la capacité (Figure 21-C). Des résultats similaires ont été obtenus au LSABM [146] en immobilisant des quantités croissantes d'aptamères anti-OTA sur une quantité constante de sépharose activée CNBr. Le greffage de 150, 450 et 600 µg d'aptamères sur 35 mg de sépharose résulte en des valeurs de capacité de 24, 28 et 38 nmol/g respectivement avec une efficacité de greffage diminuant de 37 à 14% illustrant ainsi l'effet de la gêne stérique qui conduit à une quantité maximale d'aptamères pouvant être greffée sur une phase solide avec une efficacité de greffage acceptable [146]. Dans le but de limiter le coût des OS, il semble donc approprié de déterminer ce paramètre.

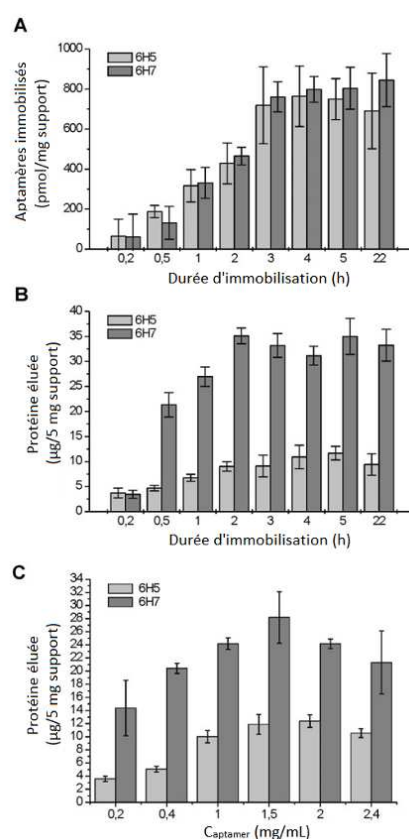


**Figure 21 :** Optimisation de l'immobilisation d'aptamères anti-His-Tag 6H5 et 6H7. **A:** Densité d'aptamères immobilisés en fonction du temps d'incubation **B:** Quantité de protéine éluée en fonction du temps d'incubation des aptamères activés chlorure cyanurique avec les billes magnétiques. **C:** Quantité de protéine éluée en fonction de la concentration en aptamères utilisée lors de l'étape d'immobilisation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type relatif de 3 expériences indépendantes. Adapté de [151].

La capacité réelle d'OS utilisés en SPE a été déterminée en mesurant la quantité d'analyte retenu en fonction de la concentration d'analyte dans l'échantillon percolé et en analysant la quantité d'analyte présente dans la fraction d'élution après des procédures d'oligoextraction [145-148, 150]. Dans ce cas, la capacité dépend du volume percolé. Ce volume doit être similaire au volume d'échantillons réels percolé puisque ce volume a un effet direct sur le rendement d'extraction [150]. Définir la capacité d'un OS en appliquant la procédure d'extraction qui sera appliquée pour des échantillons réels permet de définir la limite haute de concentrations pour lesquelles des extractions quantitatives pourront être réalisées.

Des valeurs de capacité déterminées pour plusieurs oligoadsorbants et par différentes méthodes (pas toujours bien décrites) sont reportées dans le Tableau 4.

**Tableau 4 : Valeurs de capacité d'oligoadsorbants et rendements d'immobilisation d'aptamères.**

| Cible            | Capacité                                            | Support / espaceur              | Type de liaison | Rendement de greffage | Ref.  |
|------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------------|-------|
| Protéine His-Tag | 263 pmol/mg                                         | Billes magnétiques/ C6 aptamère | Covalente       | 24%                   | [151] |
| Cocaine          | 69 nmol/g (sec)<br>12 nmol/g (mouillé) <sup>a</sup> | Sépharose/ C6 aptamère          | Covalente       | 19,3%                 | [147] |
| Cocaine          | 6.3 nmol/g (mouillé) <sup>c</sup>                   | Sépharose/biotine-aptamère      | Non-covalente   | 24%                   | [148] |
|                  | 14.65 nmol/g <sup>a</sup>                           | Sépharose/ C6 aptamère          | Covalente       | 25%                   | [148] |
| Ochratoxine A    | 16 nmol/g (mouillé)                                 | Sépharose/ C6 aptamère          | Covalente       | 22-27%                | [146] |
|                  | 24 nmol/g(mouillé)                                  | Sépharose/ C12 aptamère         | Covalente       | 37%                   | [146] |
| Ochratoxine A    | 19 nmol/g (mouillé)                                 | Sépharose/ C12 aptamère         | Covalente       | 29%                   | [145] |
|                  | 8.9 nmol/g (mouillé)                                | Sépharose/biotine-aptamère      | Non-covalente   | 25%                   | [145] |
| Dichlofénac      | 9.3 mg/ g aptamères <sup>b</sup>                    | Sépharose/ C6 aptamère          | Covalente       |                       | [150] |
| Cocaine          | 21.6 mg/ g aptamères <sup>b</sup>                   | Sépharose/ C6 aptamère          | Covalente       |                       | [150] |

<sup>a</sup>: Valeur calculée en considérant que 35 mg de sépharose sèche est équivalente à 200 mg de support mouillé [146, 148]; <sup>b</sup>: quantité d'aptamères en solution avant greffage; <sup>c</sup>: valeur calculée en considérant que 300 µL de streptavidine-sépharose est équivalent à 360 mg de support mouillé [146, 148].

Pour les analytes cibles de faible poids moléculaire, ces valeurs sont relativement homogènes (bien qu'issues de groupes de recherche différents) et sont dans l'intervalle 6,3 à 24 nmol/g d'OS. Ces valeurs sont très proches de celles obtenues avec des immunoabsorbants (de 4 à 93,6 nmol/g de support, *e.g.*, des immunoabsorbants spécifiques de pesticides)[171]. Concernant les rendements de greffage, ceux-ci se situent entre 19 et 37%. Lors de l'étude de l'immobilisation de l'aptamère anti-OTA sur des particules de sépharose activée CNBr, une capacité plus élevée a été obtenue en utilisant des aptamères greffés en utilisant un bras espaceur C12 plutôt qu'en utilisant un bras espaceur C6 [146]. Ce point est illustré en Figure 22.

Une capacité de 24 nmol/g au lieu de 16 nmol/g a été obtenue en remplaçant un bras en C6 par un bras en C12. Les résultats reportés en Figure 22 montrent aussi que l'immobilisation d'un aptamère par son extrémité 3' ou 5' conduit à la même valeur de capacité, indiquant ainsi que l'extrémité de la chaîne utilisé n'a pas d'effet sur le ratio d'aptamères anti-OTA actifs. Dans cet

exemple, les parties linéaires correspondant au plateau des courbes de capacité ont une pente similaire à la pente de la courbe obtenue avec le support contrôle. Cette valeur correspond à la contribution des interactions non spécifiques dans le mécanisme de rétention, qui a été estimé à 1,8% dans ce cas, et montre également qu'un bras en C12 ne génère pas plus d'interaction non spécifique qu'un bras en C6 malgré sa plus grande hydrophobie.

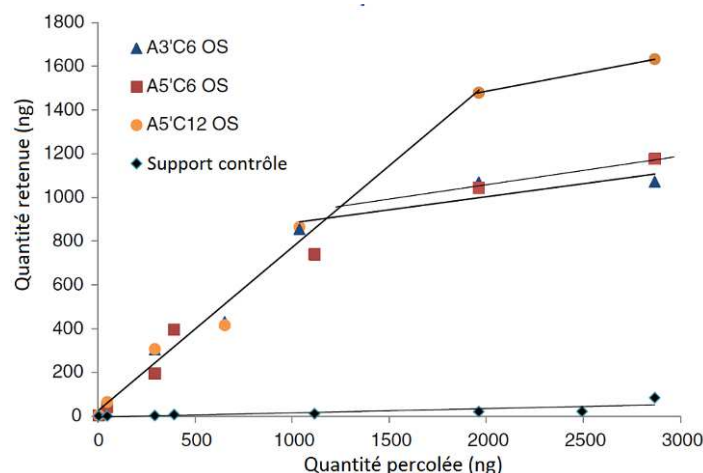


**Figure 22 :** Courbes de capacité obtenues pour l'Ochratoxine A (OTA) après percolation de quantités croissantes d'OTA sur un OS préparé avec des aptamères 5'-C6-amino-modifiés (A5'C6), 3'-C6-amino-modifiés (A3'C6) et 5'-C12-amino-modifiés (A5'C12) ainsi que sur un support contrôle (35 mg de support). La quantité retenue correspond à la quantité d'OTA dans la fraction d'élution. Procédure d'extraction : percolation 1 mL de BB dopé avec de l'OTA à 4°C ; lavage 1 mL BB/MeCN (90/10, v/v) à 4°C ; élution 1 mL BB/MeCN (60/40, v/v). Adapté de [146].

### b Rendements d'extraction

Comme pour les immunoadsorbants, et de façon générale pour toutes les procédures de SPE, les rendements d'extraction dépendent de l'affinité de l'analyte cible pour l'OS, *i.e.* pour les aptamères immobilisés. Des rendements d'extraction supérieurs à 80% ont souvent été rapportés pour différents analytes cibles [138, 147, 148, 157]. Ces rendements sont le fruit de la percolation de volumes d'échantillons plus faible que le volume de fin de fixation qui dépend de la valeur de la constante de dissociation  $K_d$ . Une parfaite illustration de ce point a été décrite par Hu *et al.* Cette équipe a préparé un OS en immobilisant dans les mêmes conditions des aptamères spécifiques du dichlorofénac ( $K_d = 47,2$  nM) et de la cocaïne ( $K_d = 5$   $\mu$ M). Cette grande différence dans les valeurs de  $K_d$  explique facilement qu'il a été possible pour les auteurs de percoler jusqu'à 2 L d'eau potable contenant du dichlorofénac sans observer de diminution de rendements tandis que le volume a dû être limité à 0,5 L d'eau dans le cas de la cocaïne, le volume de fin de fixation étant plus faible que pour le dichlorofénac à cause de la valeur de  $K_d$  plus élevée de l'aptamère spécifique de la cocaïne [150].

## c Réactivité croisée

Les OS diffèrent beaucoup des IS par rapport à leur capacité à retenir des analogues structuraux de l'analyte. Si les anticorps présentent souvent une réactivité croisée assez grande pour les petites molécules, permettant ainsi le piégeage d'un groupe d'analogues structuraux comme nous l'avons vu en partie 3.2.1.4.c, la capacité des aptamères à retenir des analogues structuraux est faible. Par exemple, il a été démontré que les aptamères spécifiques du vert de malachite ne présentent aucune affinité pour le vert de leucomalachite [170]. Des comportements similaires ont été observés pour les aptamères dirigés contre l'OTA qui présentent 100 fois moins d'affinité pour l'ochratoxine B que pour l'OTA, une différence de l'ordre d'un facteur 3 étant seulement observée pour les anticorps monoclonaux anti-OTA [138]. De la même façon, aucune rétention de l'hydroxyquinone, métabolite de l'OTA, n'a été observée sur un OS anti-OTA [146]. Cette forte spécificité des aptamères est le résultat du procédé SELEX qui permet de sélectionner une séquence ayant un enchaînement unique de nucléotides très spécifique de la cible. La moindre mutation dans la séquence entraîne d'ailleurs une perte de rétention comme observé dans le cas de l'aptamère de cocaïne au LSABM [148].

La possibilité de retenir puis de séparer plusieurs analogues structuraux, *i.e.* l'adénosine cyclique monophosphate, l'adénosine  $\beta$ -nicotinamide dinucléotide, l'adénosine et l'adénosine mono-, di- et tri- phosphate, a néanmoins été démontrée avec un aptamère spécifique de l'adénosine immobilisé sur des particules pour réaliser des séparations en HPLC [172]. Cette séparation est forcément basée sur la différence d'affinité de cet aptamère vis-à-vis des différents analogues dans un milieu donné, *i.e.* le contenu ionique de la phase mobile dont une faible modification peut sévèrement affecter la rétention des analytes les moins retenus [172]. En extraction, les conditions optimales conduisant aux rendements les plus élevés sont souvent définies pour l'analyte cible et peuvent ne pas convenir aux analogues lorsque l'affinité correspondante de l'aptamère est beaucoup plus faible que pour la cible.

Une autre équipe a, quant à elle, montré que l'aptamère spécifique de la théophylline ne présente aucune affinité pour la caféine bien que ces deux molécules ne diffèrent que par un groupement méthyle [173]. Dans ce cas, le procédé SELEX avait été appliqué de façon à éliminer les oligonucléotides pouvant présenter une affinité pour la caféine. La procédure SELEX peut aussi être adaptée de manière à sélectionner les aptamères montrant une affinité pour les différentes cibles en les utilisant alternativement au cours de la sélection. Ceci montre les possibilités offertes par la technologie SELEX en termes de contrôle de la spécificité des aptamères ce qui ne peut pas être réalisé avec les anticorps. Enfin, il est intéressant de mentionner que pour piéger simultanément deux molécules différentes deux aptamères ont été greffés sur le même support pour le piégeage de la cocaïne et du dichlorofénac dans l'eau, le volume étant adapté à l'aptamère de plus faible affinité [150].



### 3.2.2.5 Apport en sélectivité des oligoadsorbants

Grâce au fort pouvoir purifiant des OS, ces derniers ont été récemment appliqués à l'extraction d'un grand nombre de composés de matrices complexes. Ils ont été l'objet d'un fort engouement ces dernières années comme en témoigne le Tableau 3 qui met évidence que 16 publications sur les 25 référencées ont été publiées de 2011 à 2014, *i.e.* au cours des trois années de ce projet de thèse.

#### *a Oligoadsorbants appliqués aux petites molécules*

Récemment, une dizaine de travaux relatifs au développement d'OS appliqués à l'analyse de traces d'analytes de petite taille dans différents types d'échantillons ont été publiés. L'adénosine et la cocaïne ont été extraites du plasma humain [147, 153, 158] après une simple étape de dilution avec du BB [147]. Une première étape de précipitation de protéines a été effectuée avant l'oligoextraction de la tetracycline du plasma [166]. La cocaïne et le dichlofénac ont été extraits à partir de volumes importants d'eau potable (> 0,5 L) sur un OS préparé avec les deux aptamères correspondants. Enfin, le composé le plus étudié reste l'ochratoxine A (OTA) qui a été extraite de différentes matrices telles que des extraits de blé [138, 146, 168], de café [161], d'extraits de poudre de gingembre [159] mais aussi de vin rouge [145], engouement qui s'explique par une constante de dissociation  $K_d$  favorable mais aussi des besoins de sélectivité évident pour le domaine de l'analyse alimentaire.

Le couplage direct d'OS avec des systèmes de détection tels que la fluorescence et la spectrométrie de masse constitue une réelle démonstration de la capacité d'un OS en termes de sélectivité malgré la spécificité déjà apportée par ces détecteurs. Néanmoins, la spécificité de ces détecteurs n'est pas toujours suffisante. En effet, la sélectivité apportée par un aptamère spécifique de la cocaïne a été démontrée pour la détection de cette même molécule dans du sang post-mortem [148] par l'élimination d'une co-élution en LC/MS d'un composé interférent avec la cocaïne donnant un signal au même ratio  $m/z$  que la cocaïne et que le spectromètre de masse (simple quadrupôle) seul ne permettait donc pas de quantifier avec fiabilité.

Pour évaluer la performance des OS pour le traitement d'échantillons réels, différentes approches ont été utilisées. Premièrement, l'extraction d'OTA à partir de matrices de référence (extraits de blé contaminés) a souvent été décrite. Ces échantillons de référence ont été traités en utilisant des OS conditionnés au format cartouche de SPE [138, 146] ou après incubation de nanosphères greffées par des aptamères dans l'échantillon [161] démontrant que le format d'extraction ne joue pas sur la performance du support. Les chromatogrammes obtenus avant et après purification de l'OTA à partir d'une matrice de référence contaminée (B-myc0880) sont présentés en Figure 23.

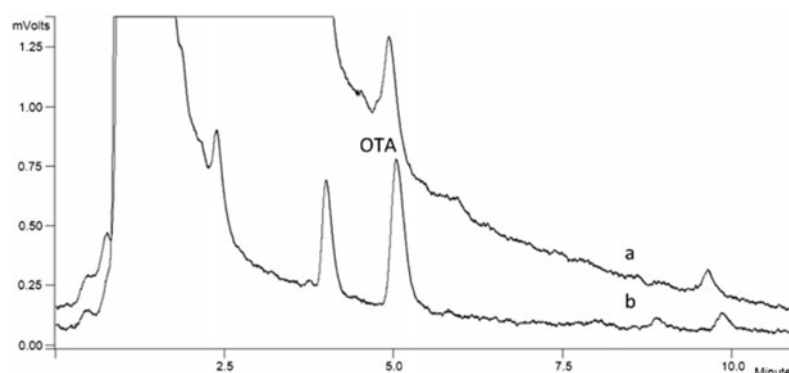


Figure 23 : Chromatogrammes résultant de l'analyse (a) d'une injection directe d'une matrice de référence contaminée (*B-myc0880*) contenant  $2,7 \pm 1$  ng d'OTA par gramme de blé diluée dix fois avec le tampon de liaison et (b) d'une fraction d'élution après purification du même échantillon sur l'OS anti-OTA. Adapté de [146].

La comparaison des deux chromatogrammes met clairement en lumière la sélectivité apportée par l'OS qui permet l'élimination de la plus grande partie du pic très intense correspondant aux composés interférents. Néanmoins, la façon la plus commune d'évaluer l'OS développé est basée sur la comparaison de la performance de l'OS à la performance d'un support conventionnel d'extraction tel que de la silice greffée C18 [145, 161] ou d'un immunoabsorbant [145, 159] pour l'extraction de l'OTA des différentes matrices préalablement citées. Il a également été vérifié que les rendements étaient les mêmes en dopant diverses matrices tels que des poudres de gingembre avec l'OTA à différentes concentrations [159]. Des rendements similaires d'OTA dans la gamme 67-91% avec des C.V de 2 à 8% ( $n = 5$ ) ont été obtenus pour des céréales, de la farine de blé ou du café [161]. En conclusion, tout ceci montre la fiabilité des aptamères appliqués à l'analyse de contaminants dans des milieux réels.

#### *b Oligoadsorbants appliqués aux protéines*

La première méthode d'oligoextraction décrite dans la littérature est liée à la purification de la L-sélectine à partir de cellules ovariennes de hamster chinois [157]. L'échantillon a été injecté sur un OS au format colonne. Après application d'une phase mobile consistant en un tampon de faible force éluante, servant ainsi d'étape de lavage, de façon à éliminer les composés interférents de la matrice, la force éluante a été drastiquement augmentée pour éluer la L-sélectine. Tel qu'illustré dans le Tableau 3, les autres applications concernent principalement la thrombine, autre molécule modèle, qui a été extraite de sérum, plasma ou sang et ensuite analysée par MALDI-MS [162, 167] ou par électrophorèse sur gel [154]. Pour une analyse MALDI, la trypsine a été directement mise en contact avec des nanoparticules d'or greffées avec des aptamères pour digestion/élution directe de la thrombine avant MALDI [167] ou des aptamères ont été directement immobilisés à la surface d'une plaque MALDI pour la détection directe de la thrombine [162]. Un lysat bactérien a également été traité sur un OS pour le piégeage sélectif du premier facteur de transcription thyroïdien (TTF1), l'étape d'élution étant réalisée en introduisant la DNase recombinante pour ce support à usage unique [131].

L'aspect quantitatif de l'oligoextraction appliqué aux protéines est moins décrit que pour les petites molécules. Ceci peut s'expliquer par les méthodes analytiques utilisées pour l'analyse des molécules cibles (électrophorèse sur gel, MALDI-MS, etc). Le contrôle des interactions non-spécifiques a été également moins décrit que pour les petites molécules. Néanmoins, ce contrôle a tout de même été réalisé pour un OS spécifique de l'histone [155] : aucune rétention de l'histone n'a ainsi été observée sur un blanc et d'autres protéines se sont avérées ne pas être retenues sur l'OS. Le potentiel d'une telle approche a d'ailleurs également été comparé au potentiel de support d'IMAC classique pour des protéines His-tag [151]. Les performances de l'OS se sont avérées être similaires à ce type de support. Une approche similaire a été décrite pour un OS spécifique d'un IgE et pour un OS spécifique de la thrombine en étudiant leur rétention sur un support greffé par des séquences mélangées et en contrôlant qu'aucune rétention ne se produisait pour l'albumine [162, 163].

### 3.2.2.6 Régénération et réutilisation

Du point de vue de la régénération, les aptamères ont pour principal avantage par rapport aux anticorps de pouvoir être régénérés en quelques minutes alors que les anticorps requièrent plus de 12h [159] voire un à deux jours pour recouvrer leur conformation active après dénaturation. La limitation première des aptamères (principalement les aptamères en série ARN) est leur sensibilité à la nucléase, ce qui est particulièrement critique pour des applications ex-vivo et in-vivo. Cependant, il a été montré que leur stabilité peut être améliorée grâce à des modifications chimiques [120].

La réutilisation d'un OS est grandement dépendante de la régénération de l'aptamère mais aussi de la stabilité chimique du support et de la liaison de l'aptamère au support. Une détérioration peut se produire par application d'une pression externe trop importante ou par gonflement du support avec différents solvants. Ces deux derniers points peuvent être contournés par un choix de support approprié. L'étape la plus critique est la dissociation du complexe aptamère-analyte, qui est induite par un changement de solvant durant l'étape d'élution ce qui peut endommager la liaison de l'aptamère avec le support solide lorsqu'une immobilisation non-covalente a été choisie. Si des aptamères biotinylés immobilisés sur des billes en verre poreux recouvertes de streptavidine ont été utilisés sur plus de 200 injections en chromatographie d'affinité [156], un manque de stabilité de cette liaison non-covalente a en effet été observé après percolation d'échantillons de vin contenant un fort pourcentage d'éthanol altérant l'OS qui n'a pu ensuite être réutilisé en raison d'une perte de capacité [145].

Pour évaluer la stabilité d'un OS anti-cocaine, des échantillons d'eau pure dopés avec l'analyte cible ont été percolés avant et après extraction d'échantillons de plasma. Les mêmes rendements ont été obtenus pour les échantillons d'eau pure dopée démontrant ainsi qu'il était possible de réutiliser l'OS après son application à des échantillons réels [147]. La stabilité de cet OS anti-cocaine a également été démontrée après la percolation de trois échantillons de plasma. De la

même façon, une fibre SPME sur laquelle des aptamères ont été immobilisés s'est avérée être stable après 20 extractions d'échantillons de plasma [174]. Pour ce qui est des échantillons alimentaires, plus de 25 extractions incluant 15 extraits de blé ont été réalisées sur le même OS sans observer aucune perte de rétention [146]. Il a également été montré qu'un OS peut être conservé 30 jours [150] voire des mois [167] avant d'être réutilisé. Bien sûr cette stabilité dépend du nombre d'échantillons appliqués pour une période donnée.

### 3.2.3 Conclusions

L'analyse de traces dans les milieux complexes nécessite généralement une étape de préparation de l'échantillon de manière à préconcentrer les composés d'intérêt et éliminer la matrice avant de procéder à l'étape de séparation et de détection. La SPE est la méthode la plus courante de traitement de l'échantillon. Cependant, si le but est de rechercher un composé unique voire une famille de composés de structure très proche, les supports conventionnels basés sur des mécanismes de rétention peu spécifiques sont peu appropriés puisqu'ils conduisent à l'extraction de nombreux composés interférents. Il est alors nécessaire de jouer sur l'étape de séparation chromatographique de manière à éviter des problèmes de quantification liés aux co-élutions avec des éléments interférents ou aux effets de matrice pouvant affecter la réponse des détecteurs tels que les spectromètres de masse.

Une alternative consiste à utiliser des outils très sélectifs. Parmi ceux-ci, des supports basés sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire et mettant notamment en jeu des biomolécules ont été développés : les immunoadsorbants basés sur l'immobilisation d'anticorps et les oligoadsorbants basés sur l'immobilisation d'aptamères. Aujourd'hui, ces deux supports peuvent être vu comme complémentaires du fait des avantages et inconvénients de chacune des deux biomolécules. Les grandes caractéristiques de chacune d'entre elles et qui ont été décrites dans ce chapitre sont résumées et comparées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Comparaison des propriétés des anticorps et des aptamères

|                                              | Anticorps (Immunoadsorbant)                                                                                              | Aptamères (Oligoadsorbant)                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Sélection</b>                             | <i>In vivo</i> , nécessite l'utilisation d'animaux ou lignées cellulaires                                                | <i>In vitro</i> , voie chimique                                                                                                                                   |
| <b>Production</b>                            | Peut s'avérer laborieuse, coûteuse et peut résulter en des variations inter-lots                                         | Synthèse rapide et précise, avec une forte reproductibilité, peu de variations inter-lots                                                                         |
| <b>Affinité</b>                              | Affinité pour la cible extrêmement élevée, constante de dissociation extrêmement faible : $K_D \approx \text{nM}$        | Affinité pour la cible variable selon les aptamères considérés, constante de dissociation faible à élevée selon la cible : $K_D \approx \text{nM}$ au $\text{mM}$ |
| <b>Limitations liées à la molécule cible</b> | Production difficile pour des molécules faiblement immunogéniques et des molécules extrêmement toxiques pour l'organisme | Aucune limitation à priori                                                                                                                                        |

|                                 | Anticorps (Immunoabsorbant)                                                                                           | Aptamères (Oligoabsorbant)                                                                                                                                                      |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Modifications chimiques</b>  | Marquage des anticorps pouvant conduire à une perte d'affinité                                                        | Fonctionnalisation facile                                                                                                                                                       |
| <b>Stabilité</b>                | Durée de conservation longue<br>Régénération longue                                                                   | Durée de conservation longue<br>Régénération rapide                                                                                                                             |
| <b>Conditions d'utilisation</b> | La liaison de l'anticorps à son antigène s'effectue dans des conditions physiologiques ou dans des conditions proches | La synthèse de l'aptamère peut être contrôlée de manière à favoriser la liaison de l'aptamère à sa cible dans des conditions extrêmes mais effet de certains agents à contrôler |
| <b>Poids moléculaire</b>        | Poids moléculaire élevé ( $\approx 150$ kDa)                                                                          | Poids moléculaire moyen ( $\approx 10-26$ kDa)                                                                                                                                  |

Le haut degré de purification permis par ces supports à base de biomolécules limite fortement les co-extractions ce qui permet d'utiliser des méthodes conduisant à un pouvoir séparatif plus limité ainsi que des détecteurs moins spécifiques et donc souvent moins onéreux. Aujourd'hui, de nombreuses études se focalisent notamment sur la miniaturisation des systèmes séparatifs couplés à des modes de détection simples et facilement transportables. Les dimensions réduites de ces systèmes entraînent de plus une perte en pouvoir séparatif. Un bon moyen de contre-carrer ces limitations est ainsi d'intégrer une étape d'extraction sélective dans les systèmes miniaturisés de manière à procéder à une purification des échantillons avant analyse.

## 4 Miniaturisation des outils analytiques

La miniaturisation des systèmes analytiques, appelés  $\mu$ TAS (*Micro Total Analysis Systems*), est aujourd'hui d'un grand intérêt. Elle répond tout d'abord à la volonté de développer des systèmes portatifs intégrant les étapes d'extraction, séparation et détection et rendant envisageables des analyses de terrain, mais elle répond aussi aux besoins des laboratoires en termes de réduction des coûts et de volumes d'échantillon requis lors des analyses conventionnelles, notamment par l'utilisation de la nanochromatographie. Même si le volume injecté et l'efficacité diminuent, la détectabilité d'un composé est inversement proportionnelle au carré du diamètre des colonnes de séparation. De ce fait, une sensibilité élevée peut être atteinte avec ces systèmes d'autant plus si une étape de SPE sélective, qui permet une purification et une préconcentration importante, y est intégrée. Sans étape de préconcentration, l'utilisation d'un détecteur très sensible reste nécessaire afin d'atteindre les limites de détection généralement recherchées.

La détection UV peut être envisagée pour sa quasi-universalité mais malheureusement ce type de détection souffre d'un manque de sensibilité en raison de la réduction du trajet optique. Un détecteur par fluorescence peut également être envisagé mais seule une minorité de molécules est

fluorescente (environ 15 %). Ce type de détection implique donc dans beaucoup de cas une étape de dérivation de l'analyte recherché de manière à y introduire un fluorophore (ex : Isothiocyanate de fluorescéine, FITC). Enfin, aujourd'hui, si la spectrométrie de masse apparaît comme le détecteur le plus sensible et sélectif, les contraintes techniques associées à ce type de détection (nécessité d'un vide, taille de l'appareil, etc) ne permettent pas encore d'envisager son transport sur le terrain, principalement dans le cas d'analyses par LC-MS. L'intégration d'une étape de traitement de l'échantillon sélective avant analyse sur des systèmes miniaturisés est donc essentielle pour limiter les besoins en sensibilité.

Cette partie présente les approches décrites ces dernières années pour intégrer des phases plus ou moins sélectives dans des systèmes miniaturisés. La miniaturisation de l'étape d'extraction sur phase solide sera présentée. Une attention particulière sera donnée aux approches récemment employées pour intégrer les outils biologiques présentés dans la partie précédente, anticorps et aptamères, à des systèmes d'analyses miniaturisés.

## 4.1 Modes de contrôle de l'écoulement et phases utilisées

La miniaturisation en LC a été globalement moins rapide que la miniaturisation des systèmes de GC ou de CE, car le transport des fluides pour ces derniers y est plus aisément réalisé qu'en LC [175]. Une autre raison est que les systèmes de LC impliquent de fortes pertes de charge ce qui ne facilite pas le couplage avec le reste du système analytique et que le remplissage de systèmes de faible diamètre avec une phase stationnaire peut s'avérer difficile.

### 4.1.1 Contrôle de l'écoulement dans les systèmes miniaturisés

Lorsque l'on parle de miniaturisation, il semble aujourd'hui difficile de s'y retrouver parmi les très nombreuses approches différentes décrites dans la littérature. La miniaturisation peut être conduite en intégrant les phases dans des capillaires de faible diamètre interne ou en développant des puces. La question des forces motrices impliquées dans l'exécution de la séparation chromatographique ou de l'extraction sur phase solide est alors cruciale. Deux approches sont possibles : une approche électrocinétique pour mettre le fluide en mouvement sous contrôle d'un champ électrique et une approche hydrodynamique par l'application d'une pression de manière à obtenir un débit contrôlé.

#### 4.1.1.1 Intérêt de l'approche électrocinétique

La plupart des séparations en microsystèmes ont été réalisées en mode électrocinétique. Le principal avantage de cette méthode est que le pompage électro-osmotique donne naissance à un

profil d'écoulement plat qui diminue le phénomène d'élargissement de bandes, la séparation est ainsi plus efficace ce qui n'est pas négligeable lorsque l'on réduit les longueurs de séparation. La séparation peut être réalisée dans un microcanal libre par l'application d'une différence de potentiel à ses deux extrémités et l'écoulement de la phase mobile est assuré par le flux électro-osmotique, comme en CE. La Figure 24 présente un microsystème de géométrie « simple croix », un des dispositifs les plus simples pour effectuer ce type de séparation [176]. Le petit canal est appelé « canal d'échantillonnage », tandis que le long canal est nommé « canal de séparation ». L'échantillon est introduit dans le premier canal par application d'une différence de potentiel entre S et SW. Puis, une différence de potentiel est appliquée dans le deuxième canal pour entraîner le volume d'échantillon situé à l'intersection des deux canaux dans le canal de séparation. La séparation peut alors se faire au sein de ce second canal. Dans ces conditions, seules les espèces chargées sont séparées, mais il est possible de travailler dans un milieu micellaire pour augmenter le pouvoir séparatif de cette technique et l'appliquer aux molécules neutres [176].

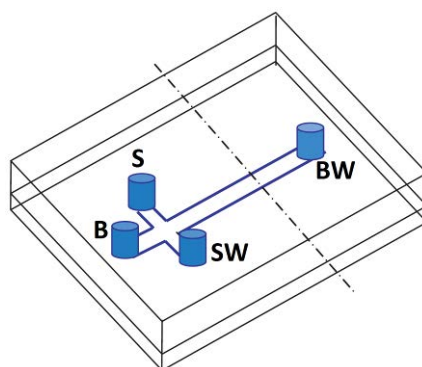


*Figure 24 : Représentation schématique d'un microsystème comportant deux canaux en croix et quatre réservoirs. S : réservoir échantillon (Sample), SW : réservoir échantillon poubelle (sample waste), B : réservoir électrolyte (buffer) et BW : réservoir poubelle (buffer waste). Adapté de [176].*

Une alternative pour la séparation d'espèces non chargées dans les microsystèmes est l'utilisation de l'électrochromatographie. L'électrochromatographie est à ce jour l'approche la plus simple pour réaliser des analyses chromatographiques sur le terrain dans des systèmes jetables. L'électrochromatographie capillaire (CEC, *Capillary ElectroChromatography*) est un hybride entre l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide : la phase mobile balaie une phase stationnaire par pompage électro-osmotique. Elle offre ainsi les avantages de ces deux techniques. Elle permet, tout d'abord, tout comme la LC, la séparation d'espèces non chargées et, ensuite, tout comme la CE, elle permet des séparations extrêmement efficaces à partir de très petits volumes d'échantillon, sans nécessiter de systèmes de pompage à haute pression. Un autre avantage important est que le débit n'est pas dépendant de la taille des particules [175]. Il est ainsi possible de grandement diminuer la taille de ces dernières ce qui est plus difficile avec des pompes LC conventionnelles du fait de la perte de charge qui en résulte.

Toutefois, cette dernière approche ne présente pas que des avantages. Le flux électro-osmotique est en effet directement dépendant de l'électrolyte utilisé ce qui limite le choix des solvants pouvant être envisagés en phase exploratoire, *i.e.* lors du développement de phases dont les mécanismes sont encore mal maîtrisés. Le flux électro-osmotique est également dépendant de la chimie de surface, ainsi que du champ électrique appliqué dans le canal ou le capillaire de séparation. Ce champ électrique va être limité par le phénomène d'effet Joule et la résistance instrumentale (habituellement quelques kV/cm). La chimie de surface, quant à elle, peut être grandement altérée au cours du temps par des modifications de pH ou l'adsorption de solutés rendant cette technique moins robuste que la chromatographie à contrôle hydrodynamique [175].

D'autre part, le couplage de la CE avec la spectrométrie de masse reste aujourd'hui encore difficile, l'interface devant minimiser les volumes morts pour ne pas affecter la qualité de la séparation et isoler les circuits électriques de la partie CE de ceux de la source du spectromètre de masse [177]. Comme nous allons le voir, beaucoup d'études se limitent ainsi à des milieux purs sur des molécules modifiées par un marqueur de fluorescence.

#### 4.1.1.2 Intérêt de l'approche hydrodynamique

L'approche hydrodynamique consiste à utiliser des systèmes de pompage de différents types. Plusieurs méthodes peuvent ainsi être employées pour générer des débits de l'ordre de la centaine de nL/min. Une première approche consiste à utiliser des pousse-seringues capables d'atteindre de faibles débits [178, 179] ou des systèmes d'électrophorèse capillaire [180, 181]. Cependant, ces systèmes impliquent l'utilisation de phases stationnaires ne développant que très peu de pertes de charge. Une deuxième approche consiste en des pompes conventionnelles connectées au capillaire ou à la puce par un diviseur de débit (« split ») [178, 182]. Cette approche va cependant à l'encontre de la réduction de la consommation en solvants en théorie induite par les systèmes miniaturisés puisque la majorité du volume de solvant prélevé est dirigé vers la poubelle et qu'une très faible partie de la phase mobile est finalement utilisée. Pour s'adapter aux faibles diamètres des systèmes miniaturisés, il est alors possible d'envisager d'utiliser d'autres types de pompes. Pour des tailles caractéristiques allant de 10 à 100  $\mu\text{m}$  on parlera de nanoLC, les débits générés seront alors de l'ordre de quelques centaines de nanolitres. Pour des systèmes de l'ordre de 100 à 500  $\mu\text{m}$  on parlera de LC capillaire (capLC) et les débits associés seront de l'ordre de quelques microlitres par minute. Certaines pompes prélevant exactement la quantité de phase mobile désirée existent aujourd'hui (Système Ultimate® 3000 RSLC Nano - pompe NCP-3200 RS, Thermo Scientific). Ces pompes permettent de délivrer des débits de l'ordre de quelques dizaines de nL/min avec une fiabilité élevée (cf. Annexe 2).

Le principal désavantage du mode de contrôle hydrodynamique reste à ce jour le coût des pompes de nanochromatographie, ce qui explique en partie le nombre d'études traitant plutôt de



l'électrochromatographie. Ces pompes ne sont également pas disponibles dans un format miniaturisé. Cependant, elles permettent une sélection de solvants variés à des débits contrôlés ce qui facilite les études exploratoires sur des systèmes et des phases dont les mécanismes ne sont pas encore parfaitement maîtrisés. Le couplage avec des détecteurs très sensibles et spécifiques tels que les spectromètres de masse peut aujourd'hui facilement être envisagé tout comme le couplage avec des modes de détection plus faciles à prendre en main en première approche tels que l'UV ou la fluorescence induite par laser (LIF).

#### 4.1.2 Les phases utilisées dans les systèmes miniaturisés

L'objectif de cette partie est de présenter les solutions pouvant être utilisées pour intégrer une phase stationnaire dans un système miniaturisé. Quatre approches principales ont jusqu'à maintenant été référencées dans la littérature. Il est possible de recouvrir la surface interne des capillaires ou des canaux d'une fine couche de phase solide, de microfabriquer des structures en forme de pilier, de remplir les canaux avec des particules solides ou bien de synthétiser *in situ* une phase monolithique.

##### 4.1.2.1 Approches en tube ouvert

L'approche la plus simple est l'approche en tube ouvert (*open tubular*). Pour une utilisation en LC, cette approche présente en théorie un certain nombre d'avantages, le principal étant la faible perte de charge induite par ce type de systèmes. Elle est aussi bien adaptée à l'analyse d'échantillons biologiques contenant un grand nombre de protéines, tel que le plasma, puisqu'elle permet d'éviter l'obstruction de la colonne par ces molécules [183].

Cette approche peut consister à fonctionnaliser la surface interne de capillaires ou de canaux comme pour les colonnes capillaires de GC. Cependant, la faible quantité de phase fait que la capacité de rétention générée par cette seule fonctionnalisation de surface reste très faible [175, 176].

De manière à accroître le rapport des phases et à améliorer cette rétention, une autre méthode consiste à recouvrir la surface interne des canaux ou capillaires avec des particules. Des approches utilisant des particules hydrophobes ou des nanoparticules d'or ont notamment été décrites [175, 184]. L'immobilisation des nanoparticules d'or a notamment accru la quantité de BSA liée de façon covalente aux parois d'un canal de microsystème résultant en un accroissement de la capacité du support pour des séparations chirales en CEC de deux isomères (éphédrine et noréphédrine) marqués FITC en milieu pur [185]. Toutefois, malgré une bonne répétabilité des séparations (C.V. < 6,0%) caractéristique de la stabilité d'un microsystème unique, se pose encore la question de la répétabilité d'immobilisation des nanoparticules.

Dans cette même optique, des phases stationnaires pelliculaires peuvent être déposées ou synthétisées *in situ* à la surface interne de ces capillaires (ou canaux) de manière à augmenter la surface spécifique de la phase stationnaire. Des approches sol-gel permettant, notamment dans le cas de capillaires de silice fondue, de réaliser la synthèse d'un film de phase stationnaire tout en le liant à la paroi interne du capillaire ont ainsi été décrites [186]. Une pellicule de silice synthétisée *in situ* par voie sol-gel dans un capillaire de 50  $\mu\text{m}$  d.i. et observée par microscopie électronique à balayage (MEB) est présentée à titre d'exemple en Figure 25. L'inconvénient de cette méthode reste le manque de répétabilité des synthèses sol-gel et la gamme de stabilité de la silice en termes de pH (pH 2-8) [183]. Surtout, peu de méthodes s'avèrent, à ce jour, efficaces pour préparer des films homogènes et suffisamment poreux pour augmenter significativement la surface spécifique [186]. Une autre approche consiste à recouvrir la surface d'un capillaire ou d'un canal par un polymère poreux. Les phases polymériques sont généralement stables même dans des conditions extrêmes de pH ou de température [183]. Cette méthode présente d'autre part l'avantage de pouvoir jouer plus facilement sur de nombreux paramètres tels que la structure même du matériau (pores, mésopores et taille des globules) ou la chimie de surface qui peuvent être adaptées en changeant les monomères de base pour obtenir les fonctions de surface appropriées [183]. Malgré ces avantages apparents, la vitesse de polymérisation doit être parfaitement contrôlée de manière à ne former qu'une fine couche de polymère sans affecter drastiquement la porosité du matériau ce qui peut là encore s'avérer difficile à mettre en œuvre [183].

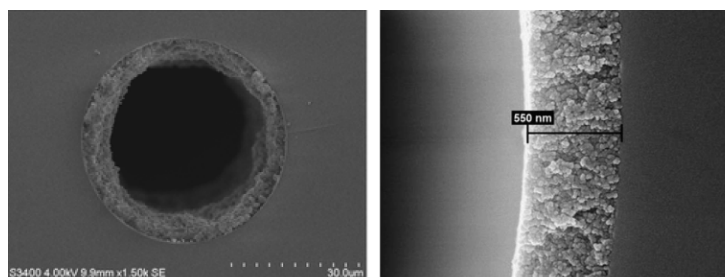


Figure 25 : Image MEB d'un capillaire ouvert recouvert d'une couche de silice. Adapté de [183]

De plus, bien que des améliorations aient été faites en termes de surface spécifique grâce au développement des couches poreuses que nous venons de présenter, la capacité de ce type de supports reste faible [183] ce qui, dans le cadre de la miniaturisation d'outils d'extraction basés sur l'immobilisation de biomolécules restent un problème majeur. Si un faible nombre de biomolécules peut être greffé, l'ensemble des sites de liaison seront rapidement saturés ce qui limitera les performances du système en termes d'enrichissement.

#### 4.1.2.2 Phases basées sur des structures microfabriquées

De façon à augmenter la surface spécifique d'interactions avec les analytes par rapport à une approche en tube ouvert, des structures microfabriquées en forme de pilier peuvent être synthétisées dans les canaux de microsystèmes analytiques. Cette approche a notamment fait l'objet de nombreuses études par le groupe de Régnier ces dernières années. Des structures appelées COMOSS (Collocated Monolith Support Structures) présentant des piliers de dimensions de l'ordre du micromètre ont été préparées par photolithographie dans les canaux de séparation en même temps que la puce elle-même. Ils ont pour l'instant été principalement utilisés pour des séparations en électrochromatographie [187-193]. Un exemple de COMOSS est présenté en Figure 26. L'un des avantages de cette approche est que la distribution des piliers peut apparemment être contrôlée précisément et avec une répétabilité élevée [175, 184, 194]. De plus, les COMOSS faisant intégralement partie du système microfluidique, ils ne risquent pas de bouger au cours de l'analyse par  $\mu$ CEC. En outre, les dimensions des canaux sont indépendantes d'un quelconque procédé de conditionnement de particules et la largeur des canaux peut être modifiée indépendamment de la taille et de la forme des piliers. La surface de cette structure COMOSS peut être ensuite recouverte d'une phase stationnaire améliorant les séparations en  $\mu$ CEC. Les premiers travaux de cette équipe ont été réalisés avec des structures en quartz [187-189]. Cependant, la conception et la fabrication de puces à base de quartz est onéreuse et fastidieuse. Des essais de COMOSS ont été ensuite réalisés en utilisant du PDMS comme substrat [190-193]. Un COMOSS a été développé sur du PDMS modifié de façon à présenter à sa surface des groupements C18 et de groupements acide sulfonique [192]. Ce support a été appliqué à la séparation de peptides par CEC. D'autres types de COMOSS préparés sur des copolymères d'oléfines cycliques avec la même géométrie ont été utilisés pour la séparation de coumarines [195].

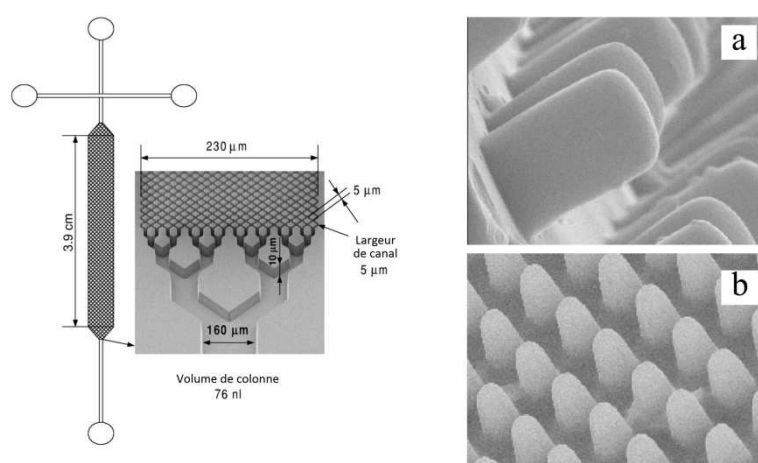


**Figure 26** : Schéma d'une colonne d'électrochromatographie en format COMOSS et images MEB de ce COMOSS (a et b). Adapté de [192] et [191]

Bien que les COMOSS permettent d'augmenter drastiquement la surface d'interaction et l'efficacité de la séparation par rapport aux canaux ouverts, leur capacité reste néanmoins plus faible que celle des phases particulières ou monolithiques car les nanostructures ne sont pas poreuses [194].

#### 4.1.2.3 Phases particulières

Une troisième approche peut consister à utiliser une méthode similaire à celle généralement utilisée au format conventionnel. Il s'agit de conditionner des particules poreuses dans des capillaires de faible diamètre ou dans les canaux d'une puce. Cette approche est particulièrement attrayante du fait de la grande variété de supports disponibles dont les caractéristiques chromatographiques ont déjà été bien étudiées. Elle présente de plus une surface spécifique beaucoup plus élevée que les approches précédentes conduisant ainsi à une capacité du support globalement plus élevée [175, 184, 194]. Malgré ces avantages apparents, les phases particulières présentent deux désavantages principaux qui sont à prendre en compte lors de la mise au point d'un système chromatographique miniaturisé. Tout d'abord, le remplissage et l'obtention d'un lit de particules uniforme peut s'avérer difficile et peu reproductible [175, 184, 194]. Ensuite, l'immobilisation des particules dans les capillaires ou dans les canaux des puces peut s'avérer elle aussi délicate [175, 184, 194, 196]. Plusieurs approches ont été mises en place pour réaliser cette immobilisation des particules.

##### *a Conditionnement dans des colonnes capillaires*

Dans le cas des colonnes capillaires de faible diamètre, le lit de particules peut être immobilisé au moyen de frittés. Cependant, les faibles dimensions des capillaires rendent l'utilisation de frittés difficile [196]. En effet, à une telle échelle, les frittés doivent être synthétisés ou préparés *in situ* aux extrémités du capillaire. Ils doivent de ce fait être bien accrochés aux parois internes du capillaire ainsi qu'être suffisamment poreux de manière à laisser la phase mobile s'écouler sans générer une trop forte perte de charge. De plus, ces derniers ne doivent pas, tant que possible, retenir les composés analysés faute de diminuer l'efficacité des colonnes capillaires. En outre, un des problèmes récurrents des frittés est qu'il peuvent causer l'apparition de bulles dans le système ce qui est particulièrement gênant en chromatographie liquide ou en CEC [196].

Trois approches ont été référencées pour préparer ces frittés [196]. La première approche consiste à utiliser un monolithe organique poreux synthétisé directement au sein du capillaire. La dimension de ce monolithe peut être maîtrisée en utilisant des techniques de photopolymérisation et en enlevant la couche de polyimide recouvrant le capillaire à l'emplacement désiré [196]. La deuxième approche de synthèse d'un fritté est une approche par voie sol-gel. Des silanes (TEOS : tétraéthoxysilane) peuvent être utilisés pour former un fritté par catalyse acide ou des solutions de silicate polymérisées par chauffage locale du capillaire. Enfin, la troisième et dernière approche

consiste à agglomérer des particules de phase stationnaire en traitant les extrémités du capillaire à très haute température au moyen d'une flamme par exemple [196, 197]. Toutefois cette technique souffre de sa faible répétabilité et du risque élevé d'endommager le capillaire [196].

Deux autres approches ne nécessitant pas de frittés ont également été décrites. Il est ainsi possible de réduire le diamètre des capillaires de manière à retenir la phase stationnaire. Cette diminution du diamètre interne peut être réalisée par chauffage du bout du capillaire puis léger broyage de cette extrémité [196]. Cependant, des pertes de particules ont déjà été observées avec cette méthode [198]. Une autre approche consiste à créer une restriction en utilisant en sortie du capillaire particulière un autre capillaire de diamètre beaucoup plus faible. Une technique brevetée consiste notamment à utiliser des colonnes capillaires analytiques de 75-150  $\mu\text{m}$  de diamètre interne et où le diamètre des capillaires de restriction est de seulement 10-20  $\mu\text{m}$ . Du PDMS est alors utilisé pour lier la surface interne du premier capillaire à la surface externe du second [196] mais reste à connaître la stabilité d'un tel raccord.

#### *b Conditionnement dans les canaux de microsystèmes*

De la même façon que pour les capillaires, le remplissage tout comme l'immobilisation des particules dans les canaux de microsystèmes peut être délicat et fastidieux à réaliser. Les particules peuvent être introduites dans le canal de séparation de la puce en utilisant un flux électroosmotique au travers d'un canal spécial d'introduction [199, 200]. Cependant, ce conditionnement électrocinétique des colonnes peut s'avérer difficile lorsque leur longueur devient trop importante (à partir de 1 mm) [184]. Dans ce cas, le remplissage peut être assisté par application d'une pression en utilisant un canal dédié au remplissage de la chambre du microsystème et en appliquant la pression au moyen d'une seringue [184]. Ces particules doivent ensuite être bloquées dans les canaux de la puce. Pour cela, plusieurs approches sont envisageables.

Les particules peuvent être maintenues en place au moyen de frittés, tout comme pour les approches en capillaire, ou au moyen de « barrages » microfabriqués. Ces barrages peuvent être fabriqués en même temps que la puce elle-même. Cependant l'élimination des frittés ou barrages dans les microsystèmes est apparu comme étant un des grands challenges dans la conception de phases stationnaires en microcanaux. Cette approche « sans frittés » a été explorée par les travaux de Ceriotti et al. [184, 201] qui ont défini, sur un principe similaire aux colonnes capillaires, une géométrie consistant en un rétrécissement des dimensions du canal de séparation permettant de provoquer un effet « clef de voûte » (*keystone effect*). Une représentation schématique de cette géométrie est représentée en Figure 27.

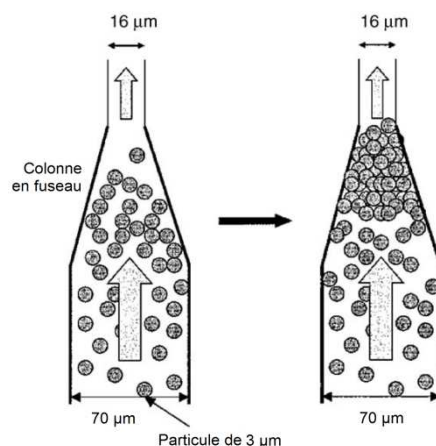


Figure 27 : Représentation schématique de l'effet « keystone ». Adapté de [184].

Des particules de diamètre 3 µm ont été conditionnées dans un canal fait de PDMS avec application d'un vide [201]. Ce vide n'étant pas suffisant pour maintenir les particules en place, la stabilisation des particules a été réalisée en plaçant la puce à une température de 115°C résultant en l'établissement de liaisons entre les particules stabilisant ainsi le lit de particules. Une autre approche a été développée par l'équipe de Gomez [202]. Elle joue sur les propriétés élastiques du PDMS. Lors du remplissage des canaux avec les particules, la pression appliquée entraîne une légère déformation du PDMS au niveau des murs du canal, agrandissant ainsi légèrement le canal. De ce fait, lors du relâchement de la pression, les murs en PDMS reprennent leur place exerçant ainsi une contrainte sur les particules du fait du rétrécissement des dimensions du canal. Les particules externes du lit se retrouvent alors en partie incrustées dans le PDMS constituant le microsysteme. La stabilité du lit de particules s'avère apparemment bonne, même soumis à un champ électrique ou à une forte pression [202]. Toutefois, un traitement thermique reste nécessaire de manière à assurer la stabilité du lit de particules durant l'ensemble des analyses chromatographiques et les auteurs, encore une fois, ne mentionnent pas la répétabilité de préparation du support [202].

#### 4.1.2.4 Phases monolithiques

La facilité de fabrication des phases monolithiques à partir de précurseurs sous forme liquide dans des colonnes ou canaux miniaturisés a permis le développement de ce type de phases comme alternative aux phases particulaires. Bien que les premières colonnes monolithiques aient été préparées dans des colonnes de grands diamètres, comme nous l'avons entrevus pour l'immobilisation d'anticorps ou aptamères en partie 3.2, cette approche est particulièrement bien adaptée pour des diamètres de colonnes allant de 20 µm à 530 µm [194]. Les phases monolithiques consistent en des structures tridimensionnelles, continues et poreuses. Elles sont constituées d'un squelette ayant un double réseau poreux fait de macropores interconnectés entre eux et de micro-/mésopores. En générale, le diamètre des macropores ( $\phi_{\text{macro}}$ ) est compris entre 1 et 12 µm et celui des micro- et mésopores est de 2 à 4 fois plus faible. Par convention, les dimensions des macropores

et micro-/mésopores sont définies comme suit :  $\phi_{\text{micro}} \leq 2 \text{ nm} < \phi_{\text{més}} \leq 50 \text{ nm} < \phi_{\text{macro}}$ . Les macropores permettent l'écoulement de la phase mobile au travers du réseau tridimensionnel, tandis que les micro- et mésopores du squelette confère au monolithe une surface spécifique élevée. Cette structure favorise ainsi un transfert de masse rapide des solutés entre la phase stationnaire et la phase mobile. On recense deux grands types de monolithes qui diffèrent par la composition chimique du squelette : les monolithes organiques résultant de la réticulation et de la polymérisation de monomères organiques et les monolithes inorganiques.

#### a Les monolithes organiques

Les monolithes organiques, développés depuis 1993 [176], sont préparés *via* un procédé de polymérisation ou co-polymérisation radicalaire de monomères organiques, suivie d'une étape de réticulation du polymère formé. Le mélange de polymérisation présente l'avantage d'être simple, peu coûteux et rapide à préparer. Ce mélange de polymérisation est généralement constitué d'un ou plusieurs précurseurs porteurs de fonctions mono- ou di-vinyls, d'un agent réticulant (utilisé surtout avec des monomères mono-fonctionnels), d'un mélange binaire ou ternaire de solvants jouant le rôle de porogène (en présence ou non de sels inorganiques) et enfin d'un initiateur de radicaux libres, dont l'activation est conduite sous l'action d'une élévation de la température ou d'une exposition à des radiations UV.

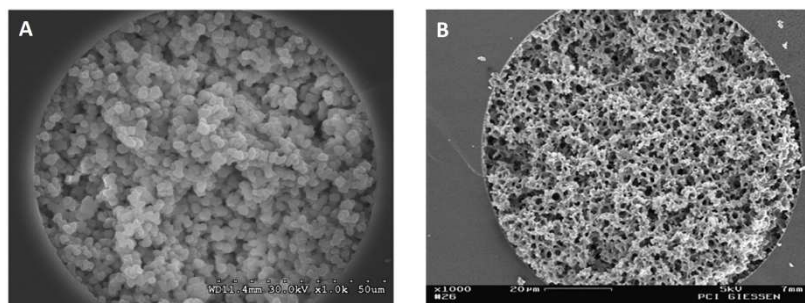


**Figure 28 :** Images MEB de (A) un monolithe organique, synthétisés *in situ* dans des capillaires, (B) un monolithe inorganique à base de silice. Adapté de [194].

Comme le montre la Figure 28-A, les monolithes organiques ont une structure dense à géométrie micro-globulaire. Leur macroporosité est élevée mais à l'inverse leur micro-porosité s'avère faible. Du fait de cette configuration (faible porosité intra-squelettique, faible surface spécifique), ceux-ci sont plutôt adaptés à des applications liées à la séparation de protéines, peptides ou polymères synthétiques [50, 203, 204]. Les monolithes organiques peuvent être classés en trois grandes familles en fonction de la nature du squelette organique.

Les premiers, les poly(styrène-co-divinylbenzène) (ou PS-DVB), développés par Svec *et al* [205], sont commercialisés dans des capillaires de 500  $\mu\text{m}$  de diamètre interne pour la chromatographie liquide capillaire [204]. Ils sont principalement utilisés pour la séparation de

biomolécules telles que les peptides et les protéines [204]. Les deuxièmes, les polyacrylamides, initialement introduits par Hjerten *et al* [206], ont un caractère amphiphile (chaîne polymérique hydrophobe et ramifications hydrophiles) et sont également utilisés majoritairement pour la séparation de protéines, de peptides et d'oligosaccharides [207]. Enfin, les derniers, les polyacrylates, développés par Svec, Fréchet *et al* [208], sont utilisés dans des applications diverses, notamment en électrochromatographie capillaire [176]. La mise en œuvre de ces monolithes dans les différents modes chromatographiques requiert quelquefois une étape de fonctionnalisation chimique ou radicalaire du support de façon à disposer d'une chimie de surface adaptée [207]. Tout comme les PS-DVB ou les polyacrylamides, ces monolithes ont fait l'objet d'un très grand nombre d'études pour des séparations en échange d'ions, en phase inverse ou en HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) [204] voire également en chromatographie d'affinité impliquant l'immobilisation de biomolécules diverses [47, 49, 50, 209].

Toutefois, du fait de leur structure purement organique, les monolithes organiques présentent l'inconvénient majeur de subir un effet de gonflement lorsque de fortes teneurs de solvant organique sont utilisées, contrairement aux supports inorganiques [50, 204]. En effet, les déformations élastiques mais irrégulières qui en résultent conduisent souvent à des problèmes de répétabilité de rétention.

#### *b Les monolithes inorganiques*

Les monolithes inorganiques regroupent l'ensemble des monolithes dont le squelette est à base de silice ( $\text{SiO}_2$ ) ou d'oxydes de métaux de transitions, issus du groupe IV du tableau périodique, tels que l'oxyde de zircon (ZrO<sub>2</sub>), l'oxyde de hafnium (HfO<sub>2</sub>) et l'oxyde de titane (TiO<sub>2</sub>). Les monolithes à base de silice ont été jusqu'à maintenant les plus utilisés pour des applications chromatographiques [210]. Comme il est visible en Figure 28-B, ils sont moins compacts que les monolithes organiques et leur squelette est plus homogène avec une structure co-continue et tubulaire. Ils présentent surtout une micro-/mésoporosité plus importante qui leur confère une surface spécifique plus élevée que les monolithes organiques et permettant la diffusion des petites molécules. Ces monolithes sont généralement préparés à partir de précurseurs tels que le tetraméthoxysilane (TMOS), tetraéthoxysilane (TEOS) par voie sol-gel. Le lecteur est invité à se reporter au chapitre 2 pour une description plus exhaustive de l'ensemble de ce procédé qui a fait l'objet d'une partie de ce projet de thèse.

Si ces monolithes sont compatibles avec des phases hydro-organiques, ils présentent néanmoins un inconvénient majeur en termes de répétabilité. En effet, très peu d'études font mention de la répétabilité du protocole de synthèse et il semble avéré que cette répétabilité est moins bonne, à l'heure actuelle, que pour les synthèses de monolithes organiques du fait du grand nombre de paramètres à contrôler lors du procédé sol-gel [211].



## 4.2 Miniaturisation des supports de SPE conventionnels

Partant des stratégies présentées ci-avant, plusieurs systèmes ont été développés ces dernières années de manière à intégrer l'étape de SPE dans des systèmes miniaturisés. L'intégration de cette étape dans des microsystèmes est néanmoins, encore aujourd'hui, relativement rare et peu d'études ont fait référence à cette approche.

Certaines études ont décrit des systèmes où l'étape d'extraction est réalisée sur le même capillaire ou canal que l'étape de séparation. Le support de SPE peut ainsi faire partie du capillaire de séparation en CE et le potentiel est alors appliqué sur l'intégralité du système au cours de la séparation en utilisant un capillaire recouvert du support de SPE, un lit de particules ou billes retenu par des frittés ou des aimants, une membrane imprégnée ou des monolithes [212]. Plusieurs applications ont récemment été proposées en utilisant notamment des monolithes pour l'analyse de méthionine encéphaline dans du liquide cébrospinal [213], de neurotransmetteurs (dopamine, adrénaline, histamine et sérotonine) ou de la caféine dans l'urine [214, 215]. L'intégralité de l'éluat issu de la procédure de SPE est analysée en CE. Néanmoins, les rendements dépendent grandement de la nature et du volume de solvant d'élution [212]. De plus, du fait du transfert direct de l'éluat, la séparation peut être affectée par l'adsorption de certains composés interférents de la matrice sur les parois du capillaire qui peuvent même obstruer le capillaire [212, 216, 217] puisque le système de séparation est exposé à l'ensemble du contenu des étapes d'extraction. Une étude réalisée au LSABM par G. Proczek en 2009 [218] a également permis de montrer qu'il était possible de préconcentrer en tête du canal de séparation d'un microsystème contenant un monolithe à base d'hexacrylate, trois composés (le fluoranthène, le benzoanthracène et le benzofluoranthène), leur injection étant effectuée sous contrôle électrocinétique. Ceci a permis d'augmenter grandement la sensibilité du signal puisque les volumes injectés ont pu être augmentés par rapport à une injection normale. Malheureusement, comme beaucoup d'autres, l'application pré-citée n'a été réalisée qu'en milieu pur. De plus, l'augmentation des volumes d'échantillons percolés entraîne un élargissement des pics puisqu'il n'y a pas de système de refocalisation de la bande de solutés [218]. Avec cette approche il est donc nécessaire de trouver un compromis sur les volumes injectés de façon à ne pas perdre en sensibilité.

L'intégration d'une étape de SPE indépendante de l'étape de séparation paraît plus appropriée de manière à pouvoir réaliser un protocole de SPE complet comprenant notamment des étapes de lavage indispensables à l'élimination des composés interférents de la matrice. Cette dissociation de l'étape de séparation de l'étape d'extraction présente également un autre avantage qui est de pouvoir percoler des volumes d'échantillons plus importants sans perte en efficacité par refocalisation de la bande de soluté. Une interface (flacon, vanne ou connectique en T) peut être utilisée pour connecter directement la sortie d'un capillaire de SPE et un capillaire de séparation en CE. La procédure de SPE est alors réalisée indépendamment de la séparation en CE, ce qui a

l'avantage de ne pas perturber le procédé électrophorétique. Elle a notamment été utilisée par Tempels *et al* [219] pour l'analyse de peptides dans le liquide cérébro-spinal. Une extraction sur un support greffé C18 au format capillaire (500  $\mu\text{m}$  i.d.) a été réalisée et une partie de l'éluat injecté en CE au moyen d'une interface à base de vannes de commutations. Le gros désavantage de la technique employée ici réside dans le faible ratio de l'éluat finalement injecté en CE (de l'ordre de 4 à 5% seulement dans cette étude [219]), ce qui limite le gain en sensibilité. Un autre exemple séparant l'extraction de la séparation, cette fois intégré dans un microsysteme, est présenté en Figure 29.

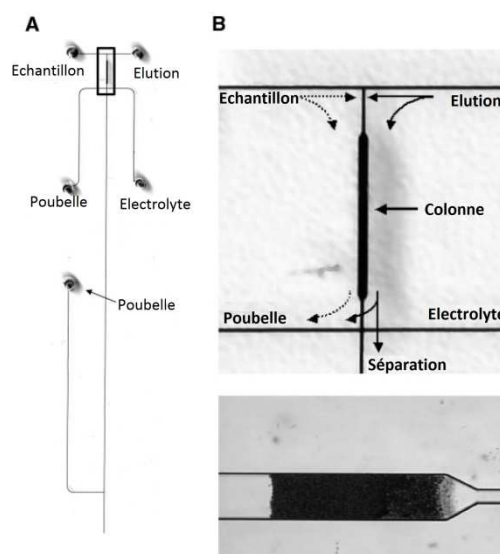


**Figure 29 :** Représentation schématique d'un système microfluidique à contrôle électrocinétique intégrant une étape de SPE sur particules et une étape de séparation. (A) Disposition du système complet, (B) vue agrandie du canal d'extraction, les lignes en pointillés représentant la direction du flux lors de l'étape d'extraction et les lignes en trait plein le flux durant l'étape d'éluat/injection. Les canaux les plus fins font environ 55  $\mu\text{m}$ , le canal d'extraction environ 210  $\mu\text{m}$ . Adapté de [220].

Ce microsysteme a été utilisé pour le couplage d'une étape de SPE à la chromatographie micellaire électrocinétique (MEKC) [220]. Des piliers poreux faits de polyméthacrylate (de 200  $\mu\text{m}$  de longueur) ont été fabriqués dans les canaux de la puce par irradiation aux ultraviolets. Des particules greffées C18 de 3  $\mu\text{m}$  ont été conditionnées dans ce microsysteme, les piliers permettant l'immobilisation de celles-ci dans le canal. Les analytes sont ainsi préconcentrés sur ce canal de SPE, élués par un solvant non aqueux puis injectés sur le canal de séparation. Ce système a été appliqué à l'extraction quantitative de la rhodamine B, permettant d'atteindre des facteurs de préconcentration dépassant 200 avec une étape d'extraction de seulement 90 secondes [220]. En utilisant ce type de système, une séquence d'extraction, éluat, injection, séparation et détection complètement automatisée a pu être réalisée en quelques minutes. Cependant, ce système constitue davantage une preuve de principe puisqu'outre le fait que cette étude porte sur un composé modèle fluorescent, aucun rendement d'extraction n'a été mesuré et que l'application à des matrices réelles n'a pas été envisagée. Les principales limites de ce type de système restent aussi la compatibilité des étapes d'éluat et de séparation par MEKC.

De manière à améliorer la compatibilité des étapes d'élution et séparation, la dissociation du canal de SPE du canal de séparation peut être réalisée *via* un système similaire à celui présenté en Figure 30 et proposé par Liu *et al* en 2009 [178].

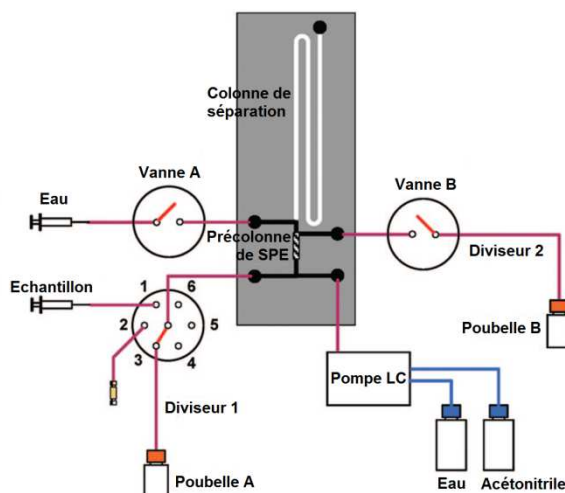


**Figure 30 :** Système expérimental de préconcentration et purification par SPE (monolithe de 5 mm) couplé en ligne avec une séparation en HPLC. La longueur totale du serpentin de séparation est de 17 cm. Adapté de [178].

Une puce intégrant une étape de SPE sur un monolithe à base de méthacrylate de 5 mm de longueur et un canal de séparation contenant lui aussi du polyméthacrylate a été appliquée à la concentration puis la séparation de peptides marqués à la fluorescéine. Dans cet exemple, l'échantillon est percolé à travers le canal de SPE à l'aide d'un pousse-seringue (4  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). L'étape de lavage est ensuite réalisée (4  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) au moyen d'une pompe LC, un pousse-seringue délivrant en parallèle de l'eau de manière à isoler le canal de séparation. Enfin, l'élution et la séparation sont réalisées grâce à la pompe LC dont le débit est fixé à 0,7 mL/min, des diviseurs de débit permettant alors d'obtenir un débit effectif de l'ordre de 200 nL/min dans le canal de séparation. L'étape d'extraction sur SPE a permis ainsi un gain en sensibilité de 150. Comme souvent, ce système constitue surtout une preuve de principe, les rendements d'extraction n'ayant en effet pas été mesurés, tout comme la répétabilité de la synthèse du monolithe et donc du support de SPE.

Outre ces développements très académiques, un système de puce assez proche nommé chip-MS d'Agilent est, lui, commercialement disponible [182]. Le principe de fonctionnement de cette puce est décrit en Figure 31.

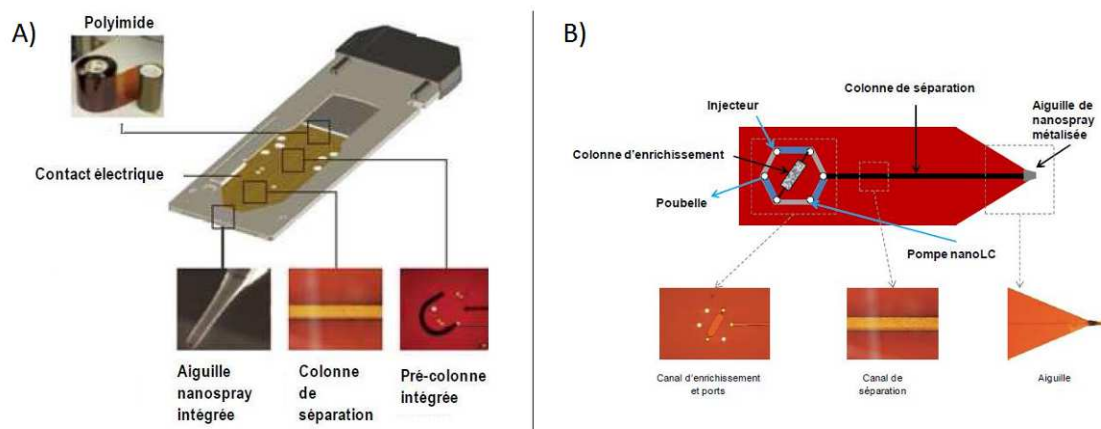


Figure 31 : A) Vue globale de chip-MS d'Agilent. B) Schéma de la puce.

Il intègre une vanne de commutation sur un principe similaire à celui décrit en partie 2.3.2 en page 27. Cette puce se compose d'une zone d'enrichissement, d'un canal de séparation et d'une nano-aiguille métallisée permettant d'obtenir un nano-électrospray et donc a pour principal avantage de pouvoir être couplée à un spectromètre de masse au moyen d'une interface, nommée « *chip cube* ». Au sein du « *chip cube* » la puce est intercalée entre un rotor et un stator d'une vanne rotatoire permettant de placer la puce à l'entrée du spectromètre de masse et de faire les connexions étanches entre la puce et les pompes. L'étape d'enrichissement est alors réalisée de manière tout à fait similaire à un montage comprenant des vannes 6 voies et des capillaires. Différentes puces sont disponibles avec des tailles et des chimies différentes. Trois phases existent actuellement : la silice greffée C8, C18 et du PGC (carbone graphite poreux) avec des porosités allant de 80 Å à 300 Å. D'autres systèmes, tels que celui développé par Eksigent et nommé *chiPLC Nanoflex* permettent également de coupler une puce et une micro-pompe LC mais là encore avec des phases de SPE conventionnelles (C18). Ce système a fait ses preuves pour des applications en milieu réel surtout en protéomique [221].

Malgré ces développements prometteurs, l'utilisation de phases de SPE conventionnelles n'apporte pas une sélectivité suffisante à l'analyse, ce qui est limitant dans le cas de l'analyse de traces dans des milieux environnementaux ou biologiques. De ce fait, de plus en plus d'études envisagent aujourd'hui la miniaturisation des outils sélectifs, dont les outils bioanalytiques.

#### 4.3 Miniaturisation des outils bioanalytiques

Pour améliorer la sélectivité de l'extraction, la miniaturisation des outils sélectifs basés sur l'utilisation de biomolécules, *i.e.* anticorps ou aptamères, a fait l'objet d'un certain nombre d'études. Cependant, comme nous venons de le voir la miniaturisation peut être effectuée sous un grand nombre de formats différents. De plus, devant la difficulté de cette miniaturisation ainsi que du couplage avec des techniques séparatives, la caractérisation des outils développés peut s'avérer

incomplète. Cette partie sera ainsi consacrée à la description des outils bioanalytiques miniaturisés basés sur l'immobilisation d'anticorps ou d'aptamères. Les supports d'immobilisation utilisés, ainsi que les caractérisations en termes d'efficacité d'immobilisation seront tout particulièrement discutés. Les systèmes partiellement ou intégralement miniaturisés recensés dans la littérature et utilisant des anticorps ou des aptamères pour l'extraction sélective et la purification d'échantillons sont regroupés respectivement dans le Tableau 6 et le Tableau 7.

Comme décrit dans ces tableaux, plus de la moitié des supports a été appliqué à des milieux purs [69, 152, 164, 179-181, 222-229]. De plus, certains paramètres quantitatifs tels que l'efficacité du piégeage de la cible ou l'efficacité du greffage [180, 181, 222, 223, 230-233] ne sont pas toujours étudiés ce qui peut s'expliquer par la difficulté à quantifier de faibles quantités d'anticorps, d'aptamères et/ou de molécules cibles. D'autre part, lorsqu'elles sont mesurées, les quantités de biomolécules immobilisées le sont par des méthodes diverses pouvant consister en des approches indirectes de dosage des solutions de greffage [152, 224, 234-237] ou des approches directes de mesure de la densité d'amines surfaciques (ADECA) [69]. Les mesures de capacités sont également réalisées de manières diverses, soit par analyse frontale et détermination de volumes de fin de fixation [236, 238], soit par application du protocole d'extraction et dépassement de la capacité [69, 164, 237, 239]. D'autre part, si certaines études s'attardent vraiment à caractériser leurs supports en termes de répétabilité de synthèse et de greffage [69, 237], la très grande majorité constitue encore des preuves de principe réalisées sur un support unique.

- *Immobilisation en surface*

Un champ de recherche consiste en l'intégration des biomolécules dans des laboratoires sur puce [240], notamment par fonctionnalisation des canaux. La surface en PDMS d'une puce a été modifiée avec de l'avidine ou de la streptavidine pour envisager l'immobilisation d'aptamères. La possibilité de retenir sélectivement des cellules, dont la taille importante doit être prise en compte lors de la conception de la zone de piégeage, a ainsi été démontrée en mesurant le signal de fluorescence généré par des cellules marquées directement sur la puce [241-243]. Une plateforme nanostructurée à base de silicone a également été conçue pour favoriser le contact des aptamères avec les cellules [244]. Le potentiel de cette approche a été démontré en mesurant le signal de fluorescence généré par des cellules marquées sur puce. Une élévation de la température grâce à l'introduction d'un micro-four dans la puce pour réaliser l'élution est souvent décrit [225-227, 241]. L'avantage est que ces conditions, qui sont principalement basées sur un changement de la conformation de l'aptamère, sont hautement compatibles avec les systèmes de détection. En retour, la stabilité de la cible, telle qu'une détérioration de la cellule [241], doit être prise en compte lors du développement d'un tel système.

*Tableau 6 : Miniaturisation des systèmes à base d'anticorps*

| Cible                             | Immobilisation            | Support                                              | Format                                        | Q <sup>té</sup> greffée (Q) /<br>Capacité (C)                                     | Elution                                                                       | Echantillons | Séparation /<br>Détection          | Ref.  | Année |
|-----------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------|------------------------------------|-------|-------|
| IgG de lapin<br>marqué FITC       | Covalente non<br>orientée | Monolithe GMA-<br>SR454                              | Capillaire 100 µm<br>d.i. (fenêtre = 3<br>mm) | n.d.                                                                              | aucune                                                                        | Milieu pur   | Microscope<br>Epi-<br>fluorescence | [222] | 2010  |
| Fluorescéine                      | Encapsulation             | Matrice sol-gel à<br>base de silice                  | Capillaire 10 cm x<br>250 µm d.i.             | C : 200 fmol soit 41<br>fmol/µL                                                   | 20% MeOH                                                                      | Milieu pur   | Capillaire<br>connecté au<br>LIF   | [179] | 2005  |
| Fluoxétine                        | Covalente non<br>orientée | APTES-surface<br>interne capillaire<br>silice fondue | Capillaire 70 cm x<br>250 µm d.i.             | C : 0,46 pmol soit<br>13,4 fmol/µL                                                | Acétate d'ammonium (20<br>mM)/ACN (40/60) + 1% Ac.<br>Formique (phase mobile) | Sérum humain | LC-MS                              | [239] | 2007  |
| Interféron α-2a                   | Covalente non<br>orientée | APTES-surface<br>interne capillaire<br>silice fondue | Capillaire 60 cm x<br>250 µm d.i.             | n.d.                                                                              | TFA (0,1% pH 2,5) /ACN<br>(86/14) (phase mobile)                              | Plasma       | LC-Fluo                            | [233] | 2013  |
| Ochratoxine A                     | Covalente non<br>orientée | Monolithe GMA-<br>EDMA                               | Capillaire 8,5 cm x<br>75 µm d.i.             | n.d.                                                                              | MeOH/ tampon phosphate<br>(5mM), pH 2,0 (1/1)                                 | Milieu pur   | Capillaire<br>connecté au<br>LIF   | [180] | 2007  |
| Ochratoxine A                     | Covalente non<br>orientée | Monolithe GMA-<br>EDMA                               | Capillaire 75 µm<br>d.i. (monolithe 5<br>cm)  | Q : 1,6 ± 0,1<br>pmol/cm soit 36,2<br>pmol/µL (18<br>µg/mg)<br>C : 0,6 pmol ab/cm | MeOH                                                                          | Milieu pur   | CE -UV et LIF                      | [69]  | 2012  |
| Testostérone<br>(mode compétitif) | Covalente non<br>orientée | Monolithe VDA-<br>HEMA- EDMA                         | Capillaire 100 µm<br>(monolithe = 1<br>cm)    | n.d                                                                               | MeOH/eau (80/20)                                                              | Milieu pur   | Capillaire<br>connecté au<br>LIF   | [181] | 2009  |
| IgG humain (type<br>sandwich)     | Covalente non<br>orientée | Monolithe APTES-<br>TEOS                             | Capillaire 10 cm x<br>530 µm d.i.             | n.d                                                                               | Ac. formique pH 2,0                                                           | Sérum humain | ICP-MS                             | [232] | 2010  |

| Cible                                   | Immobilisation                         | Support                      | Format                                               | Q <sup>te</sup> greffée (Q) / Capacité (C)                                  | Elution                                                                | Echantillons                      | Séparation / Détection | Ref.  | Année |
|-----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|-------|-------|
| TSH, testostérone, LH, FSH              | Non covalente<br>Biotine-streptavidine | Coating APTES                | Insert en fibre de verre dans l'injecteur d'une puce | n.d.                                                                        | Tampon phosphate (100 mM), pH 1,5                                      | Sang humain, salive, urine        | CE-LIF sur puce        | [230] | 2008  |
| FITC-biotine                            | Covalente non orientée                 | Particules de silice (7 µm)  | Capillaire 1 cm x 150 µm d.i.                        | Q : $3,3 \times 10^{-7}$ mol Ac./g<br>Capacité : $6,7 \times 10^{-7}$ mol/g | IPr./ Tétraborate de sodium (4 mM), pH 9,2 (20/80)                     | Urine et sérum bovin reconstitués | CE-LIF                 | [236] | 1999  |
| cTn1 humaine                            | Covalente non orientée                 | Particules de silice (10 µm) | Capillaire 75 µm d.i. (précolonne 5 mm)              | n.d.                                                                        | 35 mM Tris-acétate, 7 mM β-mercaptoéthanol, 5 mM EDTA, 2M urée, pH 3,5 | Sérum humain                      | CE-UV                  | [231] | 1998  |
| HSA marquée FITC, IgG marquée FITC      | Covalente non orientée (anti-FITC)     | Monolithe GMA-EGDMA          | Puce de PMMA                                         | n.d.                                                                        | Ac. acétique (200 mM)                                                  | Milieu pur                        | CE-LIF sur puce        | [223] | 2008  |
| Acides aminés marqués FITC              | Covalente non orientée (anti-FITC)     | Monolithe GMA-EDMA           | Puce de PMMA (monolithe 0,5 cm)                      | Q : $250 \pm 70$ mg Ac./g                                                   | Tampon phosphate (10 mM), pH 2,1                                       | Milieu pur                        | CE-LIF sur puce        | [224] | 2008  |
| AGP                                     | Covalente non orientée                 | Billes magnétiques           | Capillaire 75 µm i.d.                                | Q : 27,8 µg Ac./mg MB                                                       | MeOH/eau                                                               | Sérum humain                      | CE-UV                  | [234] | 2013  |
| Peptides Opioides (endomorphine 1 et 2) | Covalente orientée                     | Particules de silice         | Capillaire 7 mm x 250 µm d.i.                        | Q : $1,23 \times 10^{-4}$ µmol Ac./ 0,01g silica                            | Ac. Acétique (50 mM) et ac. Formique (50 mM), pH 2,3                   | Plasma humain                     | CE-MS                  | [235] | 2012  |
| GnRH                                    | Covalente orientée                     | Billes de verre              | Capillaire 10 mm x 150 µm d.i.                       | n.d.                                                                        | Tampon glycine-HCl (0,3 M), pH 2,5                                     | Sérum, Urine                      | CE-UV ou MS            | [245] | 2000  |

n.d.: non déterminé, ACN : acétonitrile, AGP: alpha-1 glycoprotéine acide, AMP: Adénosine monophosphate, APTES: aminopropyltriéthoxysilane, cTn1 : troponine cardiaque 1, EGDMA : éthylène glycol diméthacrylate, FITC : isothiocyanate de fluorescéine, FSH : hormone folliculostimulante, GMA : Glycidyl méthacrylate, GnRH : hormone de libération des gonadotropines, HEMA : 2-hydroxyéthyl méthacrylate, HSA : albumine de sérum humain, IPr. : Isopropanol, LH : hormone lutéinisante, MeOH : Méthanol, PDMS: polydiméthylsiloxane; PMMA: poly(méthylméthacrylate); SR454 : Ethoxylated trimethylolpropane triacrylate, TEOS: tetraéthoxysilane; TSH : hormone de stimulation de la thyroïde, VDA : 2-vinyl-4,4-diméthylazlactone

*Tableau Z : Miniaturisation des systèmes à base d'aptamères*

| Cible                             | Modification de l'aptamère /Espaceur | Support                                 | Format                                      | Q <sup>té</sup> greffée (Q) / Capacité (C) | Elution          | Echantillons                          | Séparation/Détection                  | Ref.       | Année        |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------|--------------|
| Adénosine                         | Biotine/triéthylène glycol           | Billes de verre poreuse - streptavidine | Capillaire 150 µm d.i., frittés             | n.d.                                       | Ni <sup>2+</sup> | Dyalisat de cortex de rat             | UV connecté au capillaire             | [156]      | 2003         |
| AMP(marquée)                      | Biotine/-                            | Bille - streptavidine                   | Puce de PDMS avec restriction               | n.d.                                       | T°               | Milieu pur                            | Fluo sur puce                         | [225, 226] | 2009<br>2011 |
| Arginine vasopressine             | Biotine/-                            | Billes-avidine                          | Puce de PDMS                                | n.d.                                       | T°               | Milieu pur                            | MALDI-MS                              | [227]      | 2011         |
| Cellules CCRF CEM                 | Biotine/-                            | PDMS- Streptavidine                     | Puce de PDMS                                | n.d.                                       | T°               | Suspension de cellules dans du tampon | Fluo sur cellules marquées (off-line) | [241]      | 2012         |
| Cellules CCRF CEM                 |                                      | Silicone activée                        | Nanostructure de silicone                   | n.d.                                       | exonucléase      | Suspension de cellules                | Fluo sur puce sur cellules marquées   | [244]      | 2011         |
| Cellules CCRF CEM et autres       | Biotine/-                            | PDMS-avidine                            | Puce de PDMS                                | n.d.                                       | aucune           | Suspension de cellules                | Fluo sur puce sur cellules marquées   | [242, 243] | 2008<br>2009 |
| ACE (protéine marqueur du cancer) | NH <sub>2</sub> /                    | Billes de polystyrène                   | Puces de PDMS ou silicone avec micropiliers | n.d.                                       | T°               | Sérum humain                          | MALDI-TOF                             | [246]      | 2012         |
| Cytochrome C                      | Biotine/                             | Monolithe GMA-TRIM - Streptavidine      | Capillaire 8,5 cm x 100 µm d.i.             | C : 164 pmol apt./µL                       | NaCl             | Sérum (x 10 dilution)                 | UV connecté au capillaire             | [238]      | 2008         |



| Cible              | Modification de l'aptamère /Espaceur   | Support                                | Format                           | Q <sup>te</sup> greffée (Q) / Capacité (C) | Elution              | Echantillons           | Séparation/Détection                                       | Ref.  | Année |
|--------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------------------------------------------|-------|-------|
| HCV ARN réplicase  | Streptavidine/liaison photoclivable    | Billes-Biotine                         | Puce de silice avec micropiliers | n.d.                                       | UV                   | Milieu pur             | Fluo (protéines marquées)                                  | [228] | 2005  |
| HCV ARN polymérase | NH <sub>2</sub> /liaison photoclivable | NH <sub>2</sub> -Billes magnétiques    | Puce de PDMS - aimant            | n.d.                                       | UV                   | Sérum                  | MALDI après digestion trypsique                            | [247] | 2004  |
| Thrombine          | Biotine/                               | Monolithe GMA-TRIM - Streptavidine     | Capillaire 8,5 cm x 100 µm d.i.  | Q : 170 pmol apt.                          | NaClO <sub>4</sub>   | Milieu pur             | UV ou LIF (avec thrombine marquée) connectés au capillaire | [152] | 2008  |
| Thrombine          | SH/-                                   | APTES-surface capillaire silice fondue | Capillaire 47 cm x 100 µm d.i.   | C : 5,6 pmol/µL                            | Urée, Tris, 50°C     | Milieu pur             | MALDI-TOF                                                  | [164] | 2006  |
| Thrombine          | NH <sub>2</sub> /C6                    | Monolithe APTES/TEOS                   | Capillaire 250 µm d.i.           | Q : 568 pmol/µL<br>C : 1,15 µg/µL          | NaClO <sub>4</sub>   | Plasma (x 20 dilution) | UV connecté au capillaire                                  | [237] | 2012  |
| Thrombine          | NH <sub>2</sub> /C12                   | Monolithe GMA/PEGDA (2 mm)             | Puce de PMMA 60*22*20 µm         | n.d.                                       | Acide Acétique, NaCl | Milieu pur             | Electrophorèse /fluo (sur puce)                            | [229] | 2013  |

ACE : antigène carcino-embryonnaire, AMP: Adénosine monophosphate, APTES: aminopropyltriéthoxysilane; GMA : Glycidyl méthacrylate; HCV : Virus de l'Hépatite C, PDMS: polydiméthylsiloxane; PEGDA : polyéthylèneglycoldiacrylate; PMMA: poly(méthylméthacrylate); TEOS: tétraéthoxysilane; TRIM: triméthylolpropane triméthacrylate.

Néanmoins, ces études ne constituent que des preuves de concept car la sélectivité et l'évaluation des effets de matrices n'ont pas été étudiés. De plus, tout comme les études précédentes en SPE, ces études ne fournissent aucunes données sur des aspects quantitatifs tels que la répétabilité de la préparation du support et les rendements ou facteurs d'enrichissement.

Les capillaires en tube ouvert correspondant, tout comme pour les puces, à un simple recouvrement de la surface interne des capillaires ont aussi été utilisés pour séparer des protéines ou de plus petites molécules après l'immobilisation d'anticorps ou d'aptamères sur la surface interne de capillaires [162, 164, 233, 239, 248-252]. Si de nombreuses études en tube ou canal ouvert ne font pas mention du taux de greffage ou de la capacité [241-244], une étude en particulier mentionne que la principale limitation de cette approche réside dans la faible capacité due à la surface spécifique limitée des parois internes des capillaires, ici dans le cas d'un greffage covalent d'aptamères [164]. De ce fait, pour augmenter le nombre de biomolécules immobilisées et donc de sites actifs, certains auteurs ont utilisé des longueurs de capillaire très importantes (60 ou 70 cm) pour développer des IS spécifiques de la fluoxétine ou de l'interféron  $\alpha$ -2a couplés de plus avec des techniques d'analyse non miniaturisées de LC-fluo ou LC-MS [233, 239]. L'approche en tube ouvert va ainsi être rapidement limitée en termes de surface de greffage accessible pour rester dans des échelles miniaturisées.

- *Immobilisation sur particules*

Pour améliorer la quantité de biomolécules immobilisés qui est particulièrement importante pour obtenir une capacité élevée favorisant ainsi des facteurs d'enrichissement élevés, des approches particulières ont aussi été envisagées. Des particules greffées avec des aptamères ont été conditionnées dans des capillaires pour l'extraction et la purification de l'adénosine à partir du dialysat de cortex de rat, l'élution de l'adénosine étant suivie par une détection UV directement connectée au capillaire [156]. Une approche particulière a également été mise en oeuvre pour le développement d'IS miniaturisés, mais cette fois couplés avec une étape de séparation par conditionnement des IS dans une portion d'un capillaire de séparation en CE [231, 235, 236, 245]. L'extraction sélective en ligne d'un marqueur clinique de l'infarctus du myocarde, la troponine cardiaque humaine (cTn1) a été développée [231]. Cette approche consiste à utiliser une courte zone (environ 5 mm) du capillaire de séparation pour y introduire des particules de silice sur lesquelles des anticorps ciblant cette protéine ont été immobilisés. Après l'étape de percolation, l'ensemble du capillaire est lavé avec du tampon pour éliminer les composés interférents. Cette étape est suivie par une étape d'élution dans un tampon approprié, l'analyte est alors transféré dans ce tampon dans la zone de séparation en CE. D'une manière similaire, un analyte modèle, la biotine marquée FITC a été injectée sur un capillaire comprenant une zone de 3 à 20 mm en entrée conditionnée avec des particules greffées avec un anticorps anti-biotine [236]. Ces deux exemples ont utilisé des modes de détection simple par absorbance UV ou fluorescence. Ce système a tout de même pu être couplé à la

spectrométrie de masse et appliqué à l'immunoextraction et à l'analyse de l'hormone de libération des gonadotropines (GnRH) dans le sérum et l'urine [245] ou de peptides opioïdes dans du plasma [235]. Toutefois, ces études ne mentionnent pas les rendements d'extraction ayant pu être obtenus, tout comme la répétabilité de préparation de ces IS particulières. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, l'approche particulière en capillaire implique le plus souvent l'utilisation de frittés, ce qui est le cas ici [231, 235, 236, 245] mais dont la synthèse peut s'avérer pénible et fastidieuse dans des systèmes d'aussi faible diamètre [196, 253].

Ces particules ou billes greffées ont ainsi pu être intégrées également dans des systèmes sur puce et immobilisées en concevant des restrictions au sein de canaux [225-227], avec des micropiliers [228, 246] ou en intégrant un aimant pour maintenir des billes magnétiques [247]. Un marqueur protéique du cancer (CEA) a notamment été extrait à partir de sérum non dilué en utilisant des aptamères sur particules maintenues en place par des micropiliers dans une puce de PDMS avant son élution à partir de la puce par un accroissement de la température et son analyse par MALDI-TOF [246]. Un système d'élution consistant en l'utilisation d'un agent de liaison photoclivable pour lier l'aptamère aux particules a aussi été utilisé : l'irradiation des particules ou billes après piégeage de la cible permet l'élution de cette dernière liée aux aptamères. Ce système a été appliqué à des protéines détectées ensuite par fluorescence (marquées HCV RNA replicase) [228] ou après la digestion de la protéine piégée sur billes magnétiques (HCV RNA polymérase) par une protéase avant une détection MALDI-MS [247], l'un ou l'autre des deux modes de détection n'étant pas affectés par la présence des aptamères. Néanmoins, ce système ne peut pas être réutilisé. L'utilisation de billes magnétiques a également été récemment envisagée en capillaire pour le développement d'un IS placé en amont d'une séparation en CE [234]. Ce système est présenté en Figure 32.

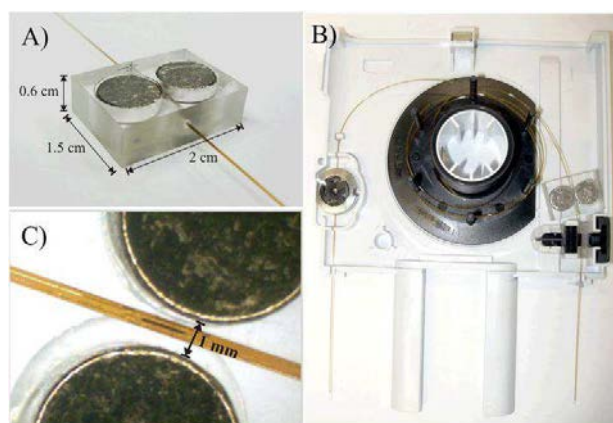


*Figure 32 : Photographie d'un système de piégeage d'un immunoadsorbant sous formes de billes magnétiques greffées dans un capillaire. (A) Détail et dimensions de l'interface. (B) Cartouche Agilent 7100 CE-UV-vis avec l'interface pour couplage à la CE. (C) Billes magnétiques piégées dans un capillaire par le champ magnétique créé par les deux aimants montrés en (A). Adapté de [234]*

Ce support d'extraction sélective est basé sur des billes magnétiques greffées avec des anticorps anti-AGP (alpha-1 acide glycoprotéine) qui sont capturées au moyen d'un champ magnétique à l'entrée d'un capillaire en utilisant des aimants placés dans la cartouche de

l'instrument de CE [234]. L'optimisation des différents paramètres liés à la purification, préconcentration, séparation en CE et détection ont permis l'extraction et l'analyse en ligne de 10 isoformes de l'AGP contenus dans des échantillons de sérum en moins d'une heure. Toutefois, cette méthode présente l'inconvénient de ne pas permettre une utilisation dans des systèmes induisant une forte perte de charge les billes étant libérées du champ magnétique par application d'une pression de 5,5 bars [234]. Si le piégeage des billes magnétiques semble répétable tout comme le greffage d'anticorps, une fois encore, ce mode de couplage ne se prête néanmoins pas à une caractérisation des rendements d'extraction qui ne sont pas explicitement mentionnés. Un changement fréquent des billes magnétiques (après chaque injection) a aussi été envisagé par les auteurs par application d'une pression élevée ce qui pose également des questions en termes de coût, les anticorps étant, comme déjà mentionné, des molécules onéreuses. Enfin, comme déjà mentionné précédemment, lorsque les capillaires d'extraction et de séparation ne sont pas dissociés, la matrice passe par la zone de séparation ce qui peut entraîner un encrassement de cette dernière. D'autres approches peuvent donc être considérées.

- *Immobilisation via la synthèse in-situ de monolithes*

Des stratégies monolithiques ont été explorées pour l'immobilisation de biomolécules dans des systèmes miniaturisés. Ces supports présentent comme nous l'avons vu beaucoup d'avantages parmi lesquels un transfert de masse rapide, une faible perte de charge, une préparation plus facile que des phases particulières conditionnées en capillaire et une grande surface spécifique disponible pour le greffage. Jusqu'à maintenant seules quelques études ont décrits l'immobilisation d'anticorps [69, 180, 181, 223, 224, 232] et d'aptamères [152, 229, 237, 238] sur monolithes en format miniaturisé. L'immobilisation a été majoritairement considérée en utilisant des monolithes organiques, principalement à base de glycidyl méthacrylate, en utilisant pour les anticorps une approche covalente non orientée via leurs fonctions amines [69, 180, 181, 223, 224, 232] et des approches non covalentes biotine-streptavidine [152, 238] ou covalente [229] pour les aptamères.

Des monolithes ont ainsi été synthétisés au format capillaire pour ensuite y immobiliser des biomolécules. Un système analytique incluant un monolithe avec des aptamères greffés couplé directement à une détection UV pour l'analyse du cytochrome C dans du sérum dilué par un facteur 10 [238]. Dans ce cas, la sélectivité a été contrôlée en étudiant l'absence de rétention de la thrombine. Des IS couplés en ligne avec la CE et basés sur un monolithe de GMA-EDMA greffés par des anticorps spécifiques de l'ochratoxine A (OTA) en entrée du capillaire de séparation ont aussi été décrits [69]. Des rendements d'extraction de l'ordre de 100 % ont été obtenus après plus de 15 analyses de milieux purs dopés sur le même IS miniaturisé mais l'analyse de matrices complexes n'a pas été étudiée. D'autres supports monolithiques en capillaire ont été directement connectés à un LIF et caractérisés par analyse frontale, le débit étant contrôlé par application d'une pression au moyen d'appareils d'électrophorèse capillaire. Chen *et al* [181] ont immobilisé de façon covalente

des anticorps polyclonaux anti-testostérone sur un monolithe organique à base de VDA-HEMA-EDMA synthétisé *in situ* dans une colonne capillaire de 100  $\mu\text{m}$  d.i et de 1 cm de longueur. L'extraction sélective de la testostérone marquée une fois encore à la fluorescéine a été démontrée grâce à des injections sur l'IS et sur un monolithe contrôle non greffé. La performance du système développé a été démontrée ensuite par l'extraction de testostérone analysée en sortie de capillaire par immunoessais en mode compétitif avec des C.V. faibles de l'ordre de 7,3% ( $n = 4$ ) montrant la réutilisabilité de l'IS. Malheureusement, encore une fois la quantité d'anticorps greffés n'a pas été mesurée tout comme la répétabilité de la préparation de l'IS. Faure *et al* [180] ont, eux, mis au point un système de préconcentration en ligne pour réaliser l'immunoextraction de petites molécules. Dans cette étude, un anticorps anti-OTA a été immobilisé sur un monolithe organique à base de GMA-EDMA synthétisé *in situ* dans un capillaire de 75  $\mu\text{m}$  d.i. L'OTA n'a été retenue que par le capillaire greffé anti-OTA et non pas un capillaire contrôle ou par un capillaire greffé par des anticorps anti-AFB1 faisant ainsi la preuve de la sélectivité. Toutefois, là encore, malgré la preuve de sélectivité, la répétabilité du greffage ainsi que les rendements d'extraction ne sont pas mentionnés.

Ces preuves de principe en capillaire sont souvent le point de départ avant l'intégration des outils bioanalytiques dans des microsystèmes. Certains systèmes ont néanmoins déjà été développés dès 2008. Sun *et al* [223] ont développé un microsystème intégrant un monolithe organique à base de GMA/EDMA préparé par photopolymérisation dans un des canaux de la puce et greffé ensuite par des anticorps anti-FITC. Le principe de cette puce est présenté en Figure 33.

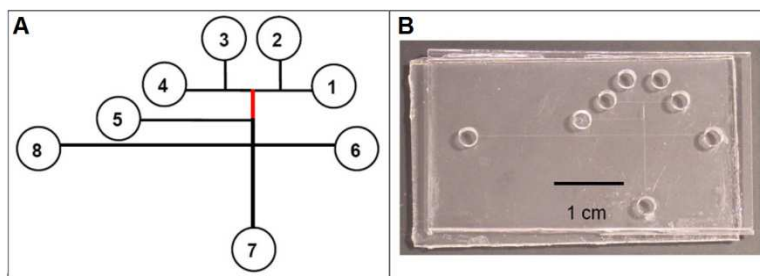


**Figure 33 :** Exemple d'IS en monolithe intégré à une puce. (A) Schéma : 1-Solution de lavage, 2- standard, 3-échantillon, 4-solution d'élution, 5-poubelle, 6-électrolyte, 7-poubelle, 8-haute tension. (B) Photographie de la puce. Adapté [223]

Cette puce a été appliquée à l'extraction et à la séparation en CE sur un second canal de protéines marquées FITC. La rétention sélective de la FITC-HSA et FITC-IgG sur le canal contenant l'IS a été démontrée grâce à une protéine interférente, la GFP, non marquée FITC et non retenue sur le support. Les rendements d'extraction après élution des protéines d'intérêt se sont avérés être supérieurs à 80 %. Le même groupe a utilisé une puce de PMMA contenant un monolithe à base de GMA greffé anti-FITC pour extraire sélectivement des acides aminés marqués FITC (glycine, phénylalanine et arginine) [224]. Encore une fois, si la répétabilité de l'extraction sur un IS unique a été démontrée, se pose la question de la répétabilité de préparation de tels IS ainsi que leur application à des matrices réelles qui n'a pas été envisagée. Ces études constituent d'autant plus une preuve de principe que l'antigène ciblé n'est pas la protéine cible mais le marqueur de fluorescence.

De ce fait, l'apport en sélectivité peut être surévalué par le mode de détection (tout composé non marqué peut être retenu non spécifiquement mais non détecté). Le système le plus intégré pour les aptamères a été proposé en 2013 par Gao et al [229]. Le design de la puce ainsi que les électrophérogrammes obtenus sont présentés en Figure 34.

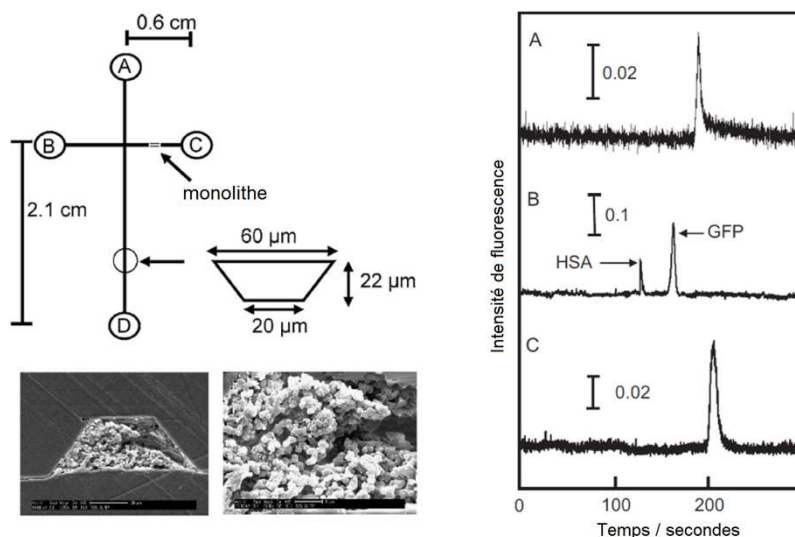


**Figure 34 :** Design d'une micropuce contenant un monolithe greffé par des aptamères au niveau du canal d'injection ; images MEB du monolithe de GMA-PEGDA synthétisé au sein du canal et électrophérogrammes des protéines éluées (A) 50  $\mu\text{g/mL}$  d'une solution pure dopée avec de la thrombine, (B) 50  $\mu\text{g/mL}$  de FITC-HSA et GFP jouant le rôle de protéines interférentes and (C) éluat de thrombine liée [229].

Une zone de piégeage faite d'un monolithe de 2 mm de longueur à base de glycidyl méthacrylate (GMA) et poly(éthylèneglycol)diacrylate (PEGDA) contenant des aptamères greffés a été préparé dans une puce et connecté à un canal de séparation par une section en croix. Après le piégeage par les aptamères de la thrombine marquée, la protéine est éluee par une solution aqueuse contenant de l'acide acétique et du NaCl sous une tension de 700 V et détectée encore une fois par fluorescence dans le canal de séparation. L'utilisation de polyéthylène glycol a permis de diminuer la contribution des interactions non spécifiques qui ont été, elles, évaluées en mesurant la fluorescence résultant de l'utilisation d'une séquence d'aptamère mélangée. Un signal dix fois moins élevé a été obtenu que lors de l'utilisation d'un aptamère anti-thrombine. La sélectivité a aussi été contrôlée en vérifiant que deux autres protéines marquées n'étaient pas retenues. Comme beaucoup d'autres, cette puce n'a cependant été appliquée qu'à des milieux purs sur des protéines modèles marquées.

Toutes ces dernières études ont développé des IS à base de monolithes organiques. Cependant, comme déjà mentionné, des problèmes de gonflement du monolithe surviennent souvent avec les monolithes organiques en présence de solvant organique [240]. Une alternative aux monolithes organiques peut consister à utiliser un monolithe hybride organique-inorganique, et donc à base de silice. Un monolithe hybride à base de TEOS et d'APTES a été synthétisé *in situ* en capillaire de 530  $\mu\text{m}$  d.i. pour immobiliser des anticorps anti-IgG humaine [232]. Une fois l'antigène piégé, cet IS a été utilisé dans un mode sandwich, *i.e.* en utilisant pour la détection un deuxième anticorps

marqué par des quantum dots (CdSe), non immobilisé, et spécifique d'une autre partie de la molécule cible. L'élution est alors réalisée par une solution d'acide formique de faible pH et un couplage avec l'ICP-MS permet la quantification des anticorps marqués et donc indirectement de la quantité d'IgG humaine piégée sur l'IS. Avec cette méthode, l'extraction de l'IgG à partir de sérum humain dilué a été réalisée avec un rendement de  $98 \pm 5\%$  ( $n = 3$ ). Si la répétabilité des extractions et du protocole d'élution ont bien été évalués, une fois encore, peu de données sont fournies sur la répétabilité inter-synthèse tout comme sur le taux de greffage des anticorps. N. Deng *et al* ont, quant à eux, récemment caractérisé, en parallèle de ce projet de thèse, un système de purification à base d'aptamères en utilisant un aptamère 5'-C6 amino-modifié spécifique de l' $\alpha$ -thrombine immobilisé sur un monolithe hybride organique-inorganique préparé dans un capillaire de 250  $\mu\text{m}$  de diamètre interne [237]. Un échantillon de plasma dilué a été injecté sur le capillaire et après lavage du monolithe en utilisant une phase mobile de faible force éluante, l'élution de l' $\alpha$ -thrombine a été directement suivie par détection UV connectée au capillaire. La sélectivité de ce système a été confirmée par l'étude de la rétention d'autres protéines (HSA, transferrine, myoglobine) qui n'ont pas été retenues. Un rendement proche de 90% a été estimé en eau pure sur trois colonnes différentes (C.V de 5,6%,  $n = 3$ ).

En définitive, la miniaturisation des outils d'extraction à base d'anticorps et d'aptamères a fait l'objet pour l'instant d'un nombre d'études limité. Les formats de miniaturisation sont très divers et surtout la caractérisation complète des supports en termes de répétabilité de l'extraction, de taux de greffage, de capacité, de répétabilité du greffage et de synthèse du support, est rarement menée à bien du fait, certainement, des difficultés de mise en œuvre de l'ensemble de ces mesures à une échelle aussi réduite. Un grand nombre d'études constituent encore de simples preuves de principe sur des supports uniques, appliqués à des milieux purs, pour l'extraction de molécules majoritairement marquées.

## 5 Conclusion

L'analyse de composés, et plus particulièrement de composés à l'état de traces, dans des matrices complexes requiert le plus souvent une étape de traitement de l'échantillon avant analyse par des méthodes chromatographiques. Cette étape permet de purifier, d'extraire et préconcentrer les analytes de manière à pouvoir atteindre une sensibilité suffisante et pallier les effets de matrices pouvant se traduire par la co-élution de composés interférents avec l'analyte cible ou par un phénomène de suppression d'ions en spectrométrie de masse gênant la quantification des molécules ciblées. Cette étape de traitement de l'échantillon est, aujourd'hui, majoritairement réalisée par extraction sur phase solide (SPE). Les phases conventionnelles de SPE mettent en jeu des mécanismes d'interactions hydrophobes, hydrophiles ou ioniques qui s'avèrent toutefois ne pas être

assez sélectifs pour éliminer l'ensemble des composants de la matrice et donc pallier intégralement les problèmes liés aux effets de matrices sus-cités. De manière à améliorer la sélectivité des supports de SPE, des outils basés sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire ont été développés, parmi lesquels des supports basés sur l'immobilisation de biomolécules, *i.e.* anticorps et aptamères, et nommés respectivement immunoadsorbants (IS) et oligoadsorbants (OS). Au format conventionnel, ces IS ou OS sont le plus souvent préparés par greffage des biomolécules sur des particules conditionnées ensuite en cartouche de manière à réaliser l'ensemble des étapes du protocole de SPE, *i.e.* percolation, lavage et élution, en différé, en amont d'une analyse chromatographique ou électrophorétique. Ces outils peuvent également être couplés en ligne avec l'étape de séparation chromatographique ce qui a pour avantage un gain en sensibilité, l'ensemble de la fraction d'élution étant injectée dans le système d'analyse. Si le couplage en ligne d'IS a déjà été envisagé avec la chromatographie en phase liquide, le couplage en ligne d'OS n'a, lui, pas encore été décrit.

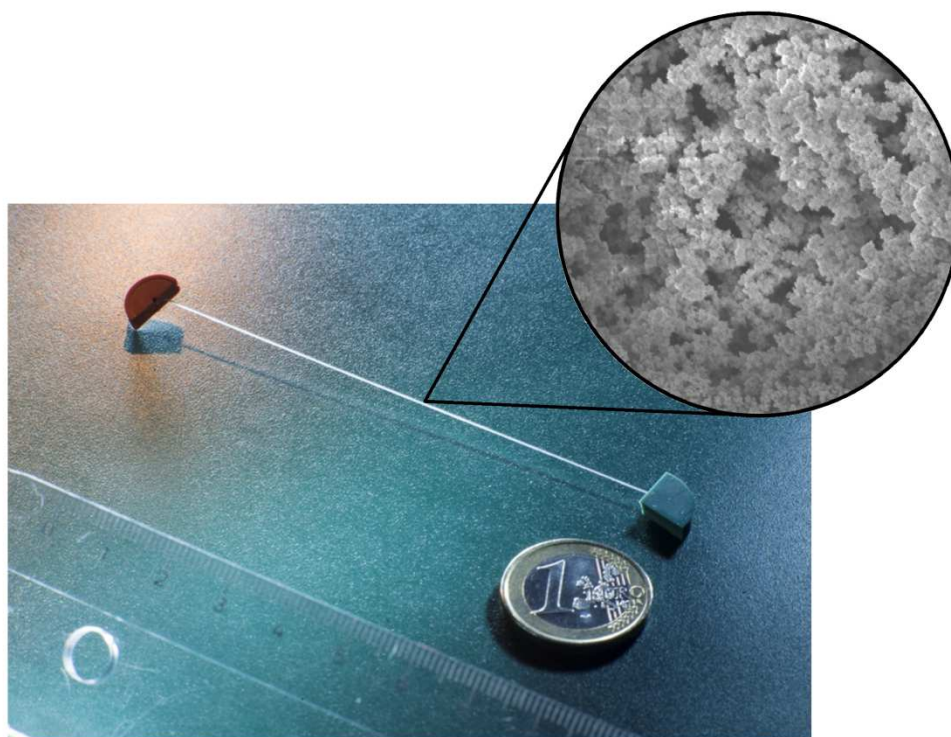
La miniaturisation de tels outils est aujourd'hui essentielle pour réduire les coûts d'analyse, permettre l'analyse de faibles volumes d'échantillons mais aussi préconcentrer les échantillons et améliorer la sensibilité des systèmes miniaturisés qui sont le plus souvent utilisés avec des modes de détection simple. Peu d'études se sont intéressées jusqu'à maintenant à la miniaturisation des outils bioanalytiques. Différentes phases ont pu être envisagées pour leur préparation parmi lesquelles des phases pelliculaires, des structures microfabriquées, des particules ou des monolithes. La capacité des deux premières s'avèrent cependant limitée et l'approche particulière peut, quant à elle s'avérer fastidieuse à mettre en œuvre dans des formats miniaturisés du fait de la difficulté d'immobilisation de particules dans des systèmes d'aussi faible diamètre. L'approche monolithique constitue donc une alternative intéressante. Des monolithes organiques, que ce soit au format conventionnel ou au format miniaturisé, ont été majoritairement utilisés pour l'immobilisation d'anticorps ou d'aptamères. Du fait de la difficulté à miniaturiser de tels outils, la caractérisation complète des supports développés en termes de répétabilité de préparation (synthèse du support et greffage), de mesure de la capacité, de rendements d'extraction ainsi que d'application à des matrices réelles n'est que succinctement décrite. D'autre part, cette caractérisation est le plus souvent mise en œuvre via un contrôle électrocinétique de l'écoulement ce qui peut poser des problèmes de compatibilité entre les phases d'élution et de séparation ainsi que rendre plus difficile la caractérisation de nouveaux outils dont les mécanismes sont mal maîtrisés en phase d'étude exploratoire. La caractérisation par un mode hydrodynamique de contrôle de l'écoulement peut alors s'avérer plus appropriée, en première approche, pour faciliter les changements de solvants ou de tampon.

L'objectif de ce projet de thèse a été de développer des outils bioanalytiques miniaturisés, basés sur le greffage d'anticorps, d'aptamères mais aussi d'enzymes, pour réaliser l'analyse de composés de faible poids moléculaire mais aussi de protéines dans des matrices complexes. Pour cela, un couplage direct des outils avec la nanoLC a été envisagé. De ce fait, l'immobilisation des biomolécules sur un monolithe en capillaire à base de silice a été considérée de manière à pallier la



faible stabilité d'un monolithe organique une fois en contact avec la phase mobile hydro-organique utilisée pour l'étape d'élution et de séparation. Tout l'enjeu a été de développer une voie de synthèse du support monolithique qui soit répétable. Une fois cette répétabilité du support acquise, l'immobilisation des biomolécules a pu être envisagée. Une attention toute particulière a été accordée à la caractérisation complète des outils miniaturisés en capillaire en termes de répétabilité de greffage, de capacités, de rendements d'extraction et à leur application à l'extraction des molécules cibles de matrices complexes.

## Chapitre 2 – Synthèse d'un monolithe organique-inorganique par voie sol-gel



# 1 Introduction

Avant de pouvoir envisager l'immobilisation de biomolécules dans un dispositif d'extraction, la première étape de ce travail expérimental a consisté à maîtriser la synthèse d'un support monolithique qui soit adapté au couplage avec la nanoLC. Ce support doit également présenter les fonctions appropriées pour l'immobilisation covalente de biomolécules. De plus, pour réaliser des extractions sélectives et minimiser les interactions non spécifiques en milieu aqueux, celui-ci ne doit pas être trop hydrophobe. Nous avons vu précédemment que des monolithes à base de glycidil méthacrylate pouvaient être utilisés pour le greffage d'anticorps et d'aptamères. Cependant, il a été montré que les interactions non spécifiques pouvaient s'avérer importantes avec ce type de monolithes [254, 255]. De ce fait, ce projet s'est orienté vers la synthèse *in situ* d'un support monolithique à base de silice. La silice est hydrophile du fait de la présence de groupements silanols Si-OH en surface. De plus, la silice au format particules et conditionnées en cartouche, a déjà fait l'objet d'un grand nombre d'études relatives à l'extraction sélective et au greffage de biomolécules en format conventionnel. Les monolithes à base de silice sont synthétisés *via* le procédé sol-gel qui permet un contrôle indépendant de la taille du squelette et des macropores. En 1998, Ishizuka *et al* ont synthétisé le premier monolithe de silice en capillaire en utilisant un procédé sol-gel à étape multiple impliquant une fonctionnalisation ultérieure avec de l'octadécyldiméthyl-N,N-diéthylaminosilane de manière à greffer à la surface du monolithe des chaînes C18 pour des séparations en phase inverse [256]. Depuis, ce type de monolithe a été largement utilisé en chromatographie [210, 257, 258]. Un type de monolithe, dit hybride, organique-inorganique, a été plus récemment développé [211, 259]. Ces monolithes sont basés sur la polycondensation de siloxanes et d'organosiloxanes et permettent ainsi d'intégrer en une étape des fonctions organiques au sein du monolithe. Ce type de monolithes a notamment été utilisé pour des séparations en CEC ou nanoLC [260-268]. Par ailleurs, une étude de Ma *et al* en 2008 a montré qu'un monolithe hybride, présentant des fonctions aminopropyl en surface, pouvait être utilisé pour immobiliser une enzyme protéolytique, la trypsine [269].

Ce chapitre présente la partie du projet consacrée à l'élaboration d'un protocole permettant l'obtention d'un monolithe en capillaire adapté à l'immobilisation covalente de biomolécules en se basant principalement sur les travaux de Yan *et al* [263] et Ma *et al* [269]. Les conditions de synthèse (activation, remplissage du capillaire, teneur en eau du mélange, ratio des précurseurs, durée du vieillissement et élimination post-synthèse du porogène) ont d'abord été optimisées par une approche monovariée de façon à obtenir une répétabilité satisfaisante et de pouvoir ensuite envisager de jouer sur d'autres paramètres tels que la quantité de porogène et la température du mélange réactionnel pour en modifier la macroporosité.

## 1.1 Le procédé sol-gel

Le procédé sol-gel, autrefois appelé « chimie douce » repose sur une succession de réactions d'hydrolyse-condensation de précurseurs d'alcoxydes de silicium ou d'alcoxydes de métaux de transition en solution, à température modérée (proche de l'ambiante). Cette appellation est une contraction des termes « solution-gélification ».

Un sol est une dispersion stable de particules colloïdales (de 1 nm à 1 µm) au sein d'un liquide. Ces colloïdes sont animés d'un mouvement brownien qui les maintient en suspension et sont principalement soumis à des forces d'interaction de Van der Waals et électrostatiques. Un gel correspond à une phase solide consistant en un réseau tridimensionnel interconnecté au sein duquel le solvant est piégé (dans les pores du réseau). Cette phase solide est un sol polymérique condensé où les particules se sont enchevêtrées pour former le réseau. Les réactions mises en jeu dans ce procédé sont présentées en Figure 35.

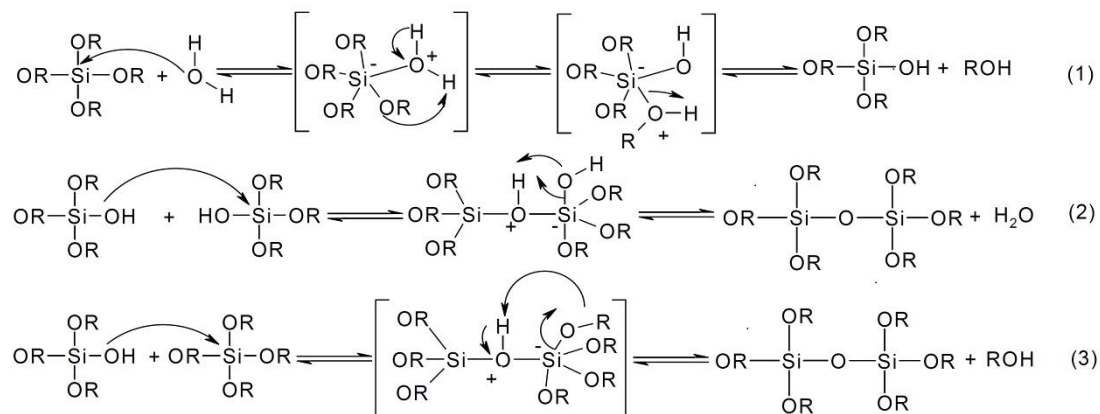


Figure 35 : Schéma de la réaction du procédé sol-gel. (1) Hydrolyse. (2) et (3) Condensation

L'ajout d'eau permet l'hydrolyse des précurseurs de silice (Figure 35-(1)). Les précurseurs d'alcoxydes de silicium commerciaux les plus répandus sont le tétraméthoxy- et tétraéthoxysilane (respectivement TMOS et TEOS). Les alcoxydes de silicium étant non miscibles à l'eau, on utilise généralement un co-solvant (le plus souvent l'alcool-parent) pour les solubiliser et ainsi effectuer la réaction. Cependant, les alcoxydes de silicium réagissent très lentement avec l'eau (et sont d'ailleurs très stables en l'absence d'eau). De ce fait, un catalyseur est très souvent ajouté au mélange de polymérisation. Ce catalyseur peut être un acide ou une base [258]. L'hydrolyse est ensuite suivie d'une étape de polycondensation des produits d'hydrolyse en oligomères avec élimination d'eau ou d'alcool (Figure 35-(2) et (3)). Ces réactions conduisent à la formation d'un gel constitué de chaînes Si-O-Si et dont la viscosité augmente au cours du temps. Ce gel contient encore des solvants et précurseurs n'ayant pas réagi. Les paramètres les plus significatifs influençant ces réactions sont le pH et le rapport  $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{alcoxydes}] = \text{eau/précurseurs (E/P)}$ , aussi appelé taux d'hydrolyse [270]. Au fur et à mesure de l'apparition d'oligomères, la composition du milieu fluctue. Des zones riches en

silice qui constitueront le squelette du monolithe et des zones riches en solvant qui en constitueront les pores apparaissent. Ce phénomène constitue la séparation de phases et est le résultat d'un mécanisme dit de décomposition spinodale [271]. Celle-ci est précédée, accompagnée ou suivie d'une étape de gélification (transition sol-gel) qui fige le matériau à un moment donné de l'évolution de la séparation de phases. Plus rigoureusement, la gélification se produit au moment où la viscosité du milieu tend vers l'infini [270]. Le temps nécessaire au « sol » pour se transformer en « gel » est alors appelé temps de gel (ou point de gel).

Une fois le temps de gel atteint, une étape de vieillissement peut être observée. La réaction qui entraîne la gélification ne s'arrête en effet pas au point de gel. Elle se poursuit et peut même durer plusieurs mois [270]. Le liquide interstitiel contient encore des monomères ainsi que des oligomères qui continuent à réagir et des réactions de réticulation peuvent se produire localement, dans le réseau gélifié, contribuant au durcissement du gel. Lorsque le gel vieillit, le phénomène de réticulation peut conduire au rétrécissement du matériau avec expulsion du solvant : on parle alors de « synérèse » [270]. Indépendamment de la synérèse, il est possible de sécher le gel, soit en conditions atmosphériques, soit en conditions supercritiques. Dans les deux cas, on obtient un réseau plus ou moins dense sans solvant, appelé « xérogel » lorsque le séchage a lieu en conditions atmosphériques, et « aérogel » en conditions supercritiques. Les xérogels sont généralement plus denses que les aérogels [270].

Utilisé comme tel, le procédé sol-gel permet l'obtention de matériaux microporeux voire mésoporeux. Cependant, pour une utilisation en nanochromatographie liquide, il est nécessaire d'ajouter un porogène de manière à obtenir un support présentant les macropores indispensables à l'écoulement des liquides et surtout à la limitation de la perte de charges du matériau, ainsi que des mésopores jouant, eux, sur la surface spécifique. Plusieurs approches peuvent être choisies pour générer des pores de grande dimension ou macropores. Parmi ces approches, des approches faisant intervenir le polyéthylène glycol (PEG) qui joue sur la séparation de phases pour générer des méso- et macropores [210, 266] et d'autres faisant intervenir un agent directeur de structure (tensioactif) [263, 269] ont été décrites.

## 1.2 Présentation du monolithe hybride choisi

De façon à greffer des biomolécules, notre objectif a été de choisir une voie de synthèse permettant d'avoir des groupements amines en surface des pores. Ces groupements amines vont pouvoir ensuite être activés grâce à un traitement au glutaraldéhyde de manière à pouvoir greffer les biomolécules. Un précurseur contenant un groupement aminopropyl, l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES,  $(\text{EtO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ) est disponible commercialement et se trouve être propice au greffage de biomolécules par cette approche [269]. Deux stratégies peuvent être envisagées lorsque l'on souhaite utiliser ce précurseur. La première approche consiste à synthétiser un monolithe à base de

silice à partir de TEOS puis de faire réagir ultérieurement les groupements silanols libres de ce matériau avec l'APTES de manière à fonctionnaliser la surface des pores. Le problème de cette méthode est qu'elle peut entraîner une répartition non homogène des groupements amine au sein du monolithe [272-274]. En effet, si les organosilanes réagissent dès l'entrée des pores, une quantité moins importante sera amenée à réagir en aval conduisant à un greffage inhomogène. Elle introduit de plus une étape supplémentaire dont le rendement et l'efficacité reste à évaluer.

L'approche que nous avons décidé de suivre dans ce projet de thèse consiste en une approche dite « *one-pot* » de co-condensation de deux précurseurs, le TEOS et l'APTES. Cette approche conduit à un monolithe dont les groupements organiques, ici aminopropyl, sont ancrés à la surface des pores du fait de l'incompatibilité de ces groupements organiques avec le réseau de silice très polaire et du fait d'un taux d'hydrolyse et de condensation moins important de l'organosilane (APTES) en comparaison du précurseur inorganique pur (TEOS) ce qui retarde sa participation dans le processus de polycondensation [272, 273]. De plus ces groupements organiques sont censés être distribués de façon plus homogène au sein du monolithe [272, 273]. Cette approche a notamment été utilisée avec succès par d'autres équipes pour la séparation de composés acides en électrochromatographie capillaire [263], pour la microextraction de métaux à l'état de traces avant analyse par ICP-MS [275], pour le greffage de trypsine comme évoqué précédemment [269] mais aussi pour le greffage d'anticorps [232] (comme évoqué dans le chapitre 1) ainsi que d'aptamères [237], travaux décrits dans la littérature après le commencement de ce projet de thèse.

Comme évoqué ci-avant, deux approches peuvent être suivies pour générer les macro- et mésopores d'un monolithe. Le porogène finalement utilisé dans ce projet est un tensioactif, le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB). Les mécanismes proposés pour la formation des méso- ou macropores au sein du monolithe par ce type d'approche sont nombreux et fortement dépendants des conditions de synthèse utilisées [272, 273, 276, 277]. La Figure 36 illustre un des mécanismes possibles proposés pour des silices mésostructurées et hautement ordonnées (matériau dit MCM-41) en présence de CTAB.

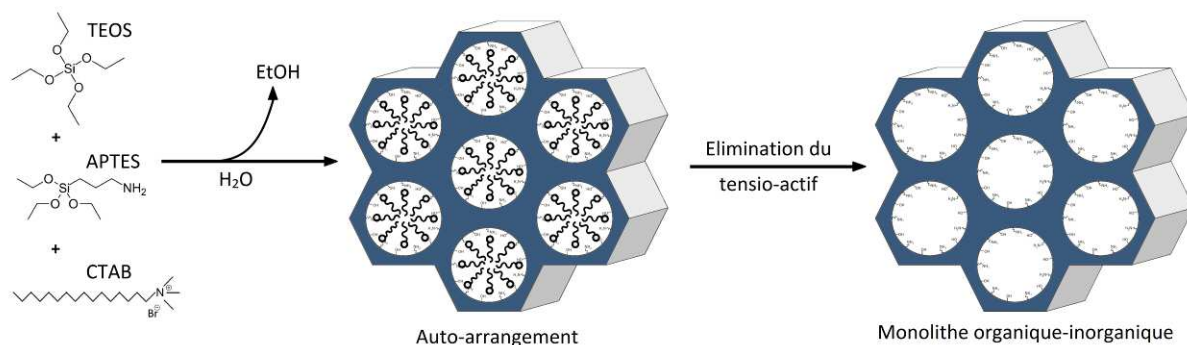


Figure 36 : Schéma de synthèse du monolithe inorganique-organique à base de TEOS et APTES en présence de CTAB.

Un matériau aussi ordonné est très difficile à obtenir, il est donc très peu probable que l'arrangement des micelles soit exactement celui proposé dans ce schéma dans le cadre de la synthèse du monolithe en capillaire présentée dans ce chapitre. Elle illustre cependant très bien le principe général de formation de pores par utilisation d'un tensioactif. Au-dessus de la concentration micellaire critique du tensioactif utilisé, des micelles se forment. Ces micelles peuvent être de forme sphérique, cylindrique (Figure 36), bicontinu ou celles-ci peuvent former des liposomes. Lors de la séparation de phases, les précurseurs de silice réagissent au niveau des zones riches en eau situées autour des micelles. De ce fait, le réseau se forme au niveau des têtes polaires des tensioactifs à la surface externe des micelles. Le réseau inorganique-organique croît donc autour de cette structure ce qui permet l'obtention d'un monolithe méso- et macroporeux [272, 273, 276, 277]. Dans notre étude, la concentration minimale en tensioactif étudiée dans un mélange réactionnel composé à 45% en volume d'éthanol est de 0,023 mol/L (pour un rapport CTAB/précurseurs de 1,1%). Cette concentration est supérieure à la concentration micellaire critique (CMC) d'environ 0,015 mol/L qu'il est possible d'extrapoler des mesures de CMC du CTAB effectuées par Wei Li *et al* en 2006 dans des mélanges eau/éthanol de diverses compositions [278].

## 2 Matériels et méthodes

De façon à faciliter la compréhension des résultats obtenus dans ce chapitre expérimental, cette partie a vocation à présenter l'ensemble des appareillages et modes opératoires appliqués pour la synthèse et la caractérisation de monolithes hybrides.

### 2.1 Procédé de synthèse *in situ* en capillaire

#### 2.1.1 Activation des parois du capillaire

Le processus de synthèse *in situ* d'un monolithe en capillaire de silice fondue (d.i. = 100  $\mu\text{m}$ ) comporte une première étape ayant pour but la modification chimique des ponts siloxanes de la paroi du capillaire en groupements silanols, dans le but de pouvoir ancrer le futur monolithe aux parois. Un des avantages de cette étape est donc de permettre la liaison covalente, uniforme et homogène du monolithe à la paroi du capillaire. De plus, si le monolithe est lié aux parois, les effets de bords devraient être minimisés. Cette modification comprend plusieurs étapes.

Le protocole appliqué est proche des protocoles décrits dans de nombreuses publications pour l'activation de capillaires préalablement à une synthèse *in situ* de monolithes à base de silice [260-263, 265, 267, 268]. Le dispositif employé pour réaliser cette étape d'activation est présenté en Figure 37.

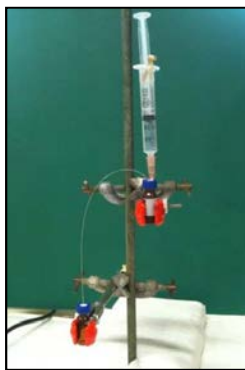


*Figure 37 : Photographie du montage permettant l'activation des capillaires de silice fondue.*

Les capillaires sont rincés en imposant une surpression dans un flacon rempli successivement par les différentes solutions permettant l'activation. Les capillaires sont ainsi rincés pendant 3 heures avec une solution de soude (NaOH) à 2 M. Cette première étape effectuée en un milieu très basique permet d'obtenir une dépolymérisation locale du réseau silicate permettant d'augmenter le nombre de groupements silanol présents, sous forme de groupements  $\text{Si-O}^-$  et d'éliminer des impuretés à la surface. Cette étape est suivie d'un rinçage avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0,2 M pendant 30 min de façon à neutraliser les groupements silanols formés sous forme  $\text{Si-OH}$ . Ces étapes sont enfin suivies d'un lavage à l'eau pendant 5 min puis d'un rinçage au méthanol (5 min). Enfin, un séchage sous flux d'azote est réalisé à  $160^\circ\text{C}$  dans un four de chromatographie en phase gazeuse pendant 3 heures.

### 2.1.2 Synthèse et remplissage des capillaires

Le remplissage des capillaires de silice est l'étape critique du protocole de synthèse du monolithe hybride dans des capillaires de faible diamètre interne ( $100\ \mu\text{m}$ ). Comme nous allons le voir, le temps de gel du monolithe hybride choisi s'est avéré être très faible. De ce fait, le remplissage doit être effectué rapidement, une fois l'ensemble des réactifs introduits dans le mélange de synthèse. Ceci nous a empêché d'utiliser un remplissage par utilisation d'une seringue contenant le mélange réactionnel tel que référencé dans certaines études [265, 279].

Pour ce faire, deux protocoles ont été envisagés. Le premier consiste à préparer le mélange réactionnel puis à le vortexer. Le flacon est ensuite scellé par un bouchon fait d'un septum au travers duquel le capillaire activé a été inséré. Le scellage du flacon entraîne une très légère surpression (visible au niveau du septum) et le capillaire est rempli à l'aide de cette légère surpression et par capillarité. Le deuxième protocole consiste à générer une surpression plus forte au moyen d'une seringue en introduisant une quantité d'air fixée dans le flacon tout en maintenant la surpression manuellement.

L'étape de gélification, très rapide, est effectuée à  $22^\circ\text{C}$ . Cette température est la même que la température du capillaire. Par contre, deux voies de synthèses ont été explorées : l'une en



équilibrant au préalable l'ensemble des réactifs à 0°C dans un bain de glace avant remplissage du capillaire, l'autre en équilibrant l'ensemble des réactifs à 22°C. Les résultats obtenus concernant ces deux voies de synthèse seront discutés ci-après.

### 2.1.3 Etape de vieillissement

Une fois remplis et scellés, les capillaires sont placés dans une étuve ou dans un bain-marie pour l'étape de vieillissement. Deux températures ont été testées : 40 et 50°C. Les capillaires étant scellés, cette étape de vieillissement est réalisée en évitant au maximum l'évaporation du solvant interstitiel (particulièrement dans le cas de l'utilisation d'un bain-marie) laissant le monolithe en formation dans un milieu humide de la même manière que présenté dans l'étude de Yan et al [263]. Plusieurs durées de vieillissement ont été étudiées : 24h, 40h et 64h. Aucune étape de séchage n'est réalisée ultérieurement à ce vieillissement.

Dans le cas des synthèses réalisées en bloc (« *bulk* ») en flacon, il est à noter que l'étape de vieillissement est légèrement différente du fait de la difficulté à conserver le gel dans un milieu humide. Le vieillissement est ainsi réalisé dans une étuve et donc également inévitablement séché sous pression atmosphérique. En effet, bien que les flacons soient scellés, ils ne sont jamais remplis intégralement avec le mélange de polymérisation. Un espace de tête reste donc présent au dessus du bloc.

## 2.2 Lavage

Le lavage (ou échange de solvants) permet d'éliminer le tensioactif faisant office de porogène lors de la synthèse du monolithe ainsi que les monomères n'ayant pas réagi. Cette élimination du porogène est une étape qui peut être délicate et peut avoir une forte influence sur les propriétés du monolithe si celle-ci est incomplète [280].

En milieu non confiné, lorsque la synthèse a été réalisée en « *bulk* » dans des flacons, le matériau une fois séché a été broyé grossièrement en particules de quelques millimètres de diamètre. Celles-ci ont ensuite été introduites dans une cartouche de SPE, entre deux frittés, afin de procéder au rinçage. La phase monolithique rincée dans chaque cas occupe un volume d'environ 2 mL. Un volume de 40 mL d'éthanol puis un volume de 40 mL d'eau a été percolé au travers de la cartouche (soit environ 20 fois le volume du monolithe lavé). Un pousse-seringue a été utilisé pour réguler le débit et faire pénétrer les différentes solutions de rinçage dans la cartouche.

Concernant le monolithe en capillaire, celui-ci est branché en sortie d'une pompe de nanoLC délivrant 100% d'éthanol. Celui-ci est alors lavé pendant une durée nécessaire au passage d'un équivalent de 20 volumes de capillaire. Ensuite le même volume d'eau est cette fois percolé à travers

le capillaire et au même débit pendant la même durée. Le capillaire est alors scellé par des bouchons en silicone et conservé sous eau.

## 2.3 Caractérisation des monolithes

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour caractériser les monolithes synthétisés.

### 2.3.1 Microscopie optique et électronique à balayage

La microscopie optique à statif inversé a été utilisée pour caractériser l'homogénéité longitudinale du remplissage des capillaires grâce à un microscope Olympus x40 équipé d'une caméra CCD (RD Vision) avec un logiciel d'interface HIRIS (RD Vision).

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée quant à elle pour caractériser la structure en coupe des monolithes synthétisés en capillaire. Il s'agit d'une technique d'observation de la topographie des surfaces. Elle est fondée principalement sur la détection des électrons secondaires émergents de la surface sous l'impact d'un très fin pinceau d'électrons primaires qui balaye la surface observée et permet d'obtenir des images avec un fort pouvoir séparateur, un grandissement efficace et une grande profondeur de champ. Le grandissement obtenu avec ce type de microscope permet une caractérisation de la morphologie du squelette ainsi que de la taille des macropores. Des caractérisations ont été menées sur des coupes de capillaires, après métallisation avec une fine couche d'or des échantillons (cf. Annexe 1). Le microscope utilisé est un Hitachi S-3600N utilisé avec une énergie de faisceau comprise entre 5 keV et 20 keV et propriété du LPEM (Laboratoire de Physique et d'Etude des Matériaux, UMR 8213 UPMC/ESPCI/CNRS). Ce MEB a pu être utilisé pour ce projet de thèse après une formation appropriée de manière à réaliser personnellement l'ensemble des observations.

Bien que la microscopie électronique à balayage permette une visualisation de la structure du monolithe synthétisé en capillaire, il s'agit plutôt d'une caractérisation qualitative du monolithe à un point donné du capillaire qui ne permet pas de déterminer l'homogénéité de la structure et de l'ancrage du monolithe sur l'ensemble de la longueur du capillaire. Cette méthode est de plus destructive, ce qui ne permet pas de réutiliser le capillaire dans sa totalité pour ensuite procéder à des étapes d'activation et de greffage.

### 2.3.2 Mesures de perméabilité

Pour pallier les limitations des caractérisations par MEB, des mesures de perméabilité ont également été systématiquement réalisées sur tous les capillaires synthétisés. La perméabilité correspond à la capacité du monolithe à laisser passer un fluide sous l'effet d'un gradient de

pression. Elle s'exprime en  $\text{m}^2$ . La perméabilité est un paramètre caractéristique du matériau qui intervient dans la loi de Darcy. Cette loi relie la perte de charge ( $\Delta P$ ) générée par le capillaire monolithique au débit appliqué ( $F$ ) selon la relation reportée ci-dessous. Cette relation fait intervenir un coefficient de proportionnalité qui dépend de la perméabilité  $K$ .

$$\Delta P = \frac{\eta \cdot L}{K \cdot S} \times F \quad \leftrightarrow \quad K = \frac{4\eta \times L}{\pi \times (d_i)^2 \times \Delta P} \times F$$

où  $\eta$  est la viscosité de la phase mobile,  $L$  la longueur du capillaire,  $S$  la section interne du capillaire et  $d_i$  le diamètre interne du capillaire.

Une fois le tensioactif éliminé, la perméabilité est déterminée en connectant le capillaire à une pompe de nanoLC. La pression résiduelle du système de nano-pompe est systématiquement retranchée aux mesures effectuées une fois un capillaire connecté. Ces mesures ont toujours été réalisées en percolant une phase mobile constituée de 100% d'eau. La perte de charge est alors mesurée après application de 4 débits différents (100, 300, 500 et 700 nL/min) et régression linéaire sur les mesures de perte de charge en fonction du débit appliqué.

Cette caractérisation donne des informations sur l'ancrage du monolithe à la paroi du capillaire ainsi que sur sa résistance mécanique à la pression. En effet, si le monolithe se désolidarise, même localement, de la paroi du capillaire, la perméabilité augmentera puisqu'une grande partie du solvant passera par les vides créés. De la même façon, si la structure du monolithe s'effondre localement après vieillissement ou du fait d'une trop forte pression, le profil hydrodynamique peut s'éloigner de la linéarité.

### 2.3.3 Analyses thermiques

Les analyses thermiques différentielle (ATD) et gravimétrique (ATG) fournissent des renseignements sur la nature du matériau.

L'ATG est une technique dans laquelle la variation de masse d'un échantillon ( $\Delta m$ ) est enregistrée en fonction du temps ( $\Delta m = f(t)$ ) ou de la température ( $\Delta m = h(T)$ ), alors que la température est elle-même programmée ( $T = g(t)$ ). Une perte de masse ( $\Delta m < 0$ ) traduit des phénomènes de désorption, d'évaporation, de sublimation, de décomposition, de corrosion avec formation d'un composé volatil, ou certaines réactions chimiques. La DTG (*Derivative ThermoGravimetry*) représente la dérivée du signal ATG par rapport au temps ( $d\Delta m/dt$ ) ou à la température ( $d\Delta m/dT$ ). Ce signal est utilisé pour mieux définir le départ de masse ou la cinétique de la réaction : les maxima et minima de la courbe DTG représentent les points de vitesse maxima et minima des phénomènes physico-chimiques associés aux variations de masse de l'échantillon (points d'inflexion de la courbe ATG). L'ATD est une technique dans laquelle la différence de température entre un échantillon et une référence ( $\Delta T$ ) est enregistrée en fonction du temps ( $\Delta T = f(t)$ ) ou de la

température ( $\Delta T = h(T)$ ), alors que la température est elle-même programmée ( $T = g(t)$ ). Les pics sur la courbe ATD nous donnent donc les variations d'enthalpie des phénomènes physico-chimiques observés :  $\Delta T > 0$  (pic vers le haut) traduit un phénomène exothermique et  $\Delta T < 0$  (pic vers le bas) traduit un phénomène endothermique. La courbe ATD permet donc d'identifier les phénomènes physico-chimiques associés aux variations de masse de l'échantillon.

L'ensemble de ces analyses ont été personnellement réalisées sur un analyseur SDT Q600 (TA Instruments), propriété du laboratoire SIMM (Sciences et Ingénierie de la Matière Molle, UMR 7615 UPMC/ESPCI/CNRS) dans les conditions suivantes :

- Masse de l'échantillon de départ : 8,710 mg pour le monolithe non rincé et 8,258 mg pour le monolithe rincé
- Variation de température : de 40 à 1200°C
- Vitesse de chauffage : 20°C/min avec un isotherme de 20 min à 105°C
- Creuset en platine
- Atmosphère : Azote à 50 mL/min

### 3 Optimisation du protocole de synthèse en capillaire

Cette partie est consacrée à la description des études réalisées pour obtenir une synthèse de monolithe hybride organique-inorganique en capillaire basée sur l'utilisation de TEOS et d'APTES qui soit répétable et compatible avec un couplage avec la nanoLC. La synthèse en capillaire s'est révélée difficile à mettre en œuvre tant du fait d'un temps de gel très court qui limite la longueur des capillaires pouvant être remplis que du fait des problèmes inhérents aux synthèses de monolithes hybrides à base de silice déjà décrits dans la littérature tels que le phénomène de rétreint dû à la synérèse, le manque d'homogénéité du monolithe obtenu, les problèmes d'ancrage aux parois ou le manque de répétabilité [257, 260-262]. D'autre part, aucune donnée relative à la répétabilité de la synthèse du monolithe à base d'APTES et de TEOS n'est disponible dans les deux principales publications de référence de ce travail de thèse [263, 269]. L'objectif de cette partie du projet a donc été de développer un protocole permettant d'obtenir un monolithe hybride homogène en capillaire, bien ancré aux parois internes de façon à limiter l'apparition de chemins préférentiels pour les solutés, présentant une perte de charge limitée et une bonne résistance mécanique de façon à pouvoir envisager un couplage direct avec la nanoLC et surtout dont la synthèse s'avère répétable pour ensuite envisager l'immobilisation de biomolécules sur des supports comparables.

Dans cette partie, les résultats de la caractérisation des monolithes de silice synthétisés en milieu confiné (capillaires) et non-confiné (flacons) seront présentés. Ces monolithes en milieu non-confiné ont été synthétisés de manière à pouvoir caractériser le support par des méthodes qui ne peuvent pas être appliquées sur capillaire. Tout d'abord, la méthode de remplissage des capillaires

avec le mélange réactionnel a dû être optimisée en jouant sur la surpression appliquée pour le remplissage ainsi qu'en essayant de retarder le temps de gel. La qualité de l'étape d'élimination du porogène après gélification et vieillissement a ensuite été contrôlée. La répétabilité du protocole de synthèse en capillaire a ensuite été démontrée permettant ensuite de faire varier des paramètres, tels que la quantité de porogène ou la température de gélification, qui se sont avérés avoir une influence sur la perméabilité du monolithe.

### 3.1 Essais préliminaires

Quatre publications, fruits du travail de deux équipes de recherche distinctes et apparues dans la littérature avant le commencement de ce projet de thèse, décrivent la synthèse d'un monolithe hybride à base de TEOS et d'APTES. Les premiers essais relatifs à la synthèse en capillaire du monolithe organique-inorganique ont donc consisté à évaluer les différentes voies de synthèse proposées par ces deux équipes. Les paramètres de synthèse utilisés dans ces travaux sont reportés dans le Tableau 8.

**Tableau 8 :** Protocoles décrits dans la littérature pour la synthèse d'un monolithe hybride organique-inorganique.

|                     |                       | Equipe de Y. Zhang     |                       | Equipe de B. Hu         |                          |
|---------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
|                     |                       | Yan <i>et al</i> [263] | Ma <i>et al</i> [269] | Chen <i>et al</i> [232] | Zhang <i>et al</i> [275] |
| Année               |                       | 2004                   | 2008                  | 2010                    | 2011                     |
| Capillaire d.i.     |                       | 75 µm                  | 100 µm                | 530 µm                  | 530 µm                   |
| Mélange réactionnel | TEOS                  | 112 µL                 | 112 µL                | 200 µL                  | 250 µL                   |
|                     | APTES                 | 118 µL                 | 118 µL                | 200 µL                  | 150 µL                   |
|                     | CTAB                  | 8 mg                   | 8 mg                  | -                       | -                        |
|                     | PEG                   | -                      | -                     | 10 mg                   | 30 mg                    |
|                     | Eau                   | 32 µL                  | 32 µL                 | 50 µL                   | 60 µL                    |
|                     | EtOH                  | 215 µL                 | 215 µL                | 200 µL                  | 300 µL                   |
|                     | [BMIM]BF <sub>4</sub> | -                      | -                     | 150 µL                  | -                        |
| Vieil.              | Durée                 | 24 h                   | 24 h                  | 6 h                     | 24 h                     |
|                     | Température           | T° <sub>amb</sub>      | 40 °C                 | 60 °C                   | 40 °C                    |
| Lavage              |                       | EtOH/Eau               | EtOH/Eau              | EtOH/Eau                | EtOH/Eau                 |
| Séchage             |                       | aucun                  | aucun                 | Azote 30 min            | 120 °C, 8h               |

d.i. : diamètre interne, Vieil. : vieillissement, T°<sub>amb</sub> : température ambiante, EtOH : éthanol, [BMIM]BF<sub>4</sub> : 1-Butyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate

La voie de synthèse proposée par l'équipe de Chen *et al* et Zhang *et al* n'implique pas l'utilisation d'un tensioactif comme porogène, mais l'utilisation de PEG (M<sub>w</sub> = 10 000). Le PEG est introduit pour favoriser la transition de phases au cours du procédé sol-gel avec création d'une phase gel riche en complexe « silice-polymère » et d'une phase riche en solvant de façon à assister la formation des macropores. D'autre part, la voie de synthèse proposée par Chen *et al* introduit, en plus, un liquide ionique, le 1-Butyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate ([BMIM]BF<sub>4</sub>) pour ensuite immobiliser des anticorps sur le monolithe formé. L'utilisation d'un liquide ionique est censée, selon les auteurs, réduire le risque de rétreint du monolithe lors du vieillissement et le liquide ionique est

également censée participer à la formation des macropores [232]. Ces deux voies de synthèse ont été étudiées succinctement. Les essais de synthèses impliquant l'utilisation de PEG se sont révélées infructueuses, le remplissage des capillaires effectués avec les mélanges réactionnels correspondant présentant une structure très éloignée de la structure particulière attendue et présentée par les auteurs [275]. Les monolithes synthétisés en utilisant du PEG ( $M_w = 10\,000$ ) et le liquide ionique précité ont, quant à eux, présenté un problème de stabilité évident. En effet, la voie de synthèse de Chen *et al* a été testée en flacon tout comme en capillaire. Si la transition sol-gel a pu être observée, le monolithe formé s'est avéré présenter, après vieillissement pendant 6 heures à 60 °C dans une étuve, une phase liquide surnageante, laissant supposer une très mauvaise stabilité des synthèses par cette approche, les monolithes préparés en flacon présentant de plus une texture « molle ». En outre, les capillaires remplis avec les mélanges réactionnels préparés *via* ce procédé de synthèse n'ont présenté qu'une perte de charge quasiment nulle une fois connectés en sortie d'une pompe de nanoLC. Ces résultats laissent des doutes sur la possibilité de greffer des anticorps sur un tel support avec les seules informations fournies par Chen *et al* [232].

Les conditions de synthèse proposées par l'équipe de Yukui Zhang (Yan *et al* et Ma *et al*) ont, quant à elles, conduit à des résultats préliminaires beaucoup plus encourageants : des monolithes « durs » ont été obtenus en flacon et les capillaires ont présenté une perte de charge non nulle une fois connectés en sortie d'une pompe de nanoLC. Le choix a donc été fait de poursuivre les études sur cette voie de synthèse en optimisant le protocole de remplissage et en faisant varier les différents paramètres pouvant affecter la structure du monolithe. Une surface spécifique de 105,3 m<sup>2</sup>/g a notamment été mesurée par Yan *et al* [263] par cette voie de synthèse. Cette valeur est de l'ordre de deux fois supérieures aux monolithes organiques ce qui laisse augurer la possibilité d'obtenir de forts taux de greffage sur ce monolithe hybride. Il est à noter que le protocole d'activation de la surface interne des capillaires présenté ci-avant s'est toujours avéré suffisant au cours de ce projet de thèse pour obtenir un monolithe correctement ancré aux parois du capillaire. Cette étape d'activation ne fera donc l'objet d'aucune optimisation particulière dans la suite de cette étude. De plus, le volume d'éthanol ajouté au mélange réactionnel a toujours été fixé à 215 µL pour un rapport molaire EtOH/Précurseurs de 3,67, *i.e.* la quantité d'éthanol initialement rapportée par Yan *et al* [263] et Ma *et al* [269] (Tableau 8).

### 3.2 Etude du temps de gel

Une des propriétés de la voie de synthèse choisie est qu'elle ne nécessite pas de catalyseur contrairement à la très grande majorité des synthèses de monolithes hybrides ou à base de silice [210, 257, 258]. En effet, la présence du groupement amine au sein du précurseur APTES suffit à catalyser la réaction comme déjà décrit par plusieurs études [263, 281, 282]. Des temps de gel très courts, de l'ordre de 2 minutes, ont été observés pour des synthèses réalisées en flacon à 22°C. Le problème de cette gélification rapide est qu'elle s'est avérée gênante pour le remplissage de capillaires

de plusieurs dizaines de centimètres. En effet, si une longueur trop importante de capillaire est utilisée, le remplissage complet du capillaire s'avère impossible. Pour ralentir la gélification, nous avons tout d'abord effectué des essais en équilibrant la température de l'ensemble des réactifs à 0°C à l'aide d'un bain de glace. Le mélange réactionnel est alors préparé à cette température puis sorti du bain de glace immédiatement après l'ajout des précurseurs.

Nous avons donc dans un premier temps étudié le temps de gel de différents mélanges de polymérisation, par cette méthode, en faisant varier le rapport molaire eau/précurseurs (E/P) mais aussi le rapport molaire TEOS/APTES, afin de choisir le mélange le plus approprié à un remplissage aisé et à l'obtention d'un monolithe présentant une structure particulière caractéristique d'une catalyse basique (telle que décrite par Ma *et al* et Yan *et al* [263, 269]), résistant mécaniquement à la pression et bien ancré aux parois.

### 3.2.1 Effet de la teneur en eau

Une étude sur le taux d'hydrolyse a été effectuée afin de déterminer son impact réel sur la cinétique de polymérisation qui peut être évaluée par le temps de gel. L'eau est en effet à la fois un réactif et un produit de la réaction par voie sol-gel. Le temps de gel est considéré comme atteint lors de l'apparition de la polymérisation, *i.e.* au début de l'opacité dans le flacon ainsi que lorsque le mélange se fige (déterminé grâce à un fin capillaire introduit dans le flacon et agité lentement). Cinq rapports molaires E/P ont ainsi été étudiés en triplicat dans des flacons de 1,5 mL. Dans le protocole de référence de Ma *et al* [269] (Tableau 8), le volume d'eau dans le mélange réactionnel est de 32  $\mu\text{L}$  pour un ratio molaire E/P de 1,77. Cette quantité d'eau suffit à faire que l'hydrolyse soit complète, *i.e.* d'hydrolyser toutes les fonctions susceptibles de l'être [269]. Quatre quantités d'eau supplémentaires en encadrant cette valeur ont été choisies en plus de celle décrite précédemment : E/P = 0,44, 0,89, 2,66 et 3,54. Les résultats provenant de ces cinq essais, sont présentés en Figure 38.

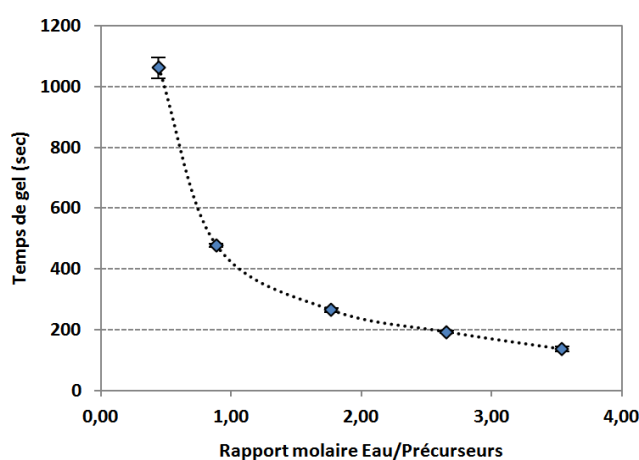


Figure 38 : Effet du rapport molaire eau/précurseurs sur le temps de gel. Mesures effectuées en flacon. La concentration totale en précurseurs est définie comme la somme des concentrations en TEOS et APTES dans le mélange de polymérisation. Synthèse à partir de 8 mg de CTAB, 118  $\mu\text{L}$  d'APTES, 112  $\mu\text{L}$  de TEOS, 215  $\mu\text{L}$  d'EtOH et de quantités variables d'eau (8  $\mu\text{L}$ , 16  $\mu\text{L}$ , 32  $\mu\text{L}$ , 48  $\mu\text{L}$  et 64  $\mu\text{L}$ ).

Il est visible que la diminution de la quantité d'eau dans le mélange de polymérisation entraîne une diminution du temps de gel. Avec un rapport molaire E/P de 0,44 un temps de gel moyen de 17 min 45 sec  $\pm$  33 sec ( $n = 3$ ) a été observé. Ce temps de gel diminue rapidement lorsque le rapport molaire se rapproche de 1 (7 min 58  $\pm$  7 sec à E/P = 0,89 ;  $n = 3$ ). Le temps de gel a donc été multiplié par un facteur 4 et 1,8 par rapport à la synthèse de référence [269]. Ce facteur est de 0,72 et 0,70 pour des rapports molaires de 2,66 et 3,54. Notre but étant d'obtenir un monolithe qui puisse également présenter une résistance mécanique suffisante pour être transposé en capillaire et surtout qui ne gélifie pas trop vite de façon à pouvoir remplir des capillaires facilement et sur toute leur longueur, il a été choisi de ne transposer au format capillaire que les méthodes de synthèse correspondant aux trois ratios E/P les plus faibles et égaux à 0,44, 0,89 et 1,77. Les autres ratios E/P, qui entraînent une diminution du temps de gel et donc diminuent la longueur de capillaire qu'il est possible de remplir aisément et de façon homogène, n'ont pas été davantage étudiés en format capillaire.

Trois capillaires de silice fondue de 20 cm chacun et préalablement activés ont été remplis par capillarité pour chacun des ratios molaires étudiés. La longueur de 20 cm a été choisie car le remplissage du capillaire avec un mélange de synthèse de ratio E/P égal à 1,77 ne permet pas de remplir une longueur plus importante par simple capillarité (avec utilisation d'un bain de glace pour maintenir les réactifs à 0°C avant remplissage). Par ces essais, la structure des monolithes synthétisés avec des ratios E/P de 0,44 et de 0,89 se trouve être très différente d'une phase particulière condensée attendue comme l'illustre la Figure 39, après observation au MEB.

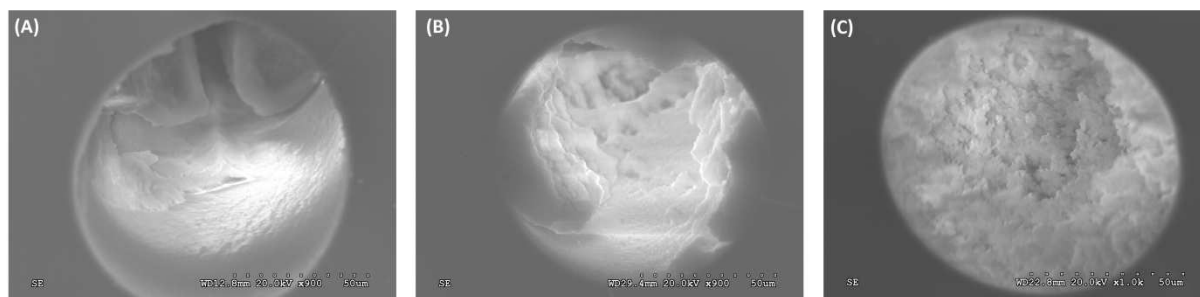


**Figure 39 :** Observations au MEB de synthèse du monolithe hybride en capillaire. Remplissage par capillarité (très légère surpression). Vieillissement à 50°C pendant 40 h. Synthèse à partir de 8 mg de CTAB, 118  $\mu$ L d'APTES, 112  $\mu$ L de TEOS, (A) 8  $\mu$ L d'eau (E/P = 0,44), (B) 16  $\mu$ L d'eau (E/P = 0,89), (C) 32  $\mu$ L d'eau (E/P 1,77), et 215  $\mu$ L d'EtOH.

Il a été observé que la phase synthétisée avec la plus faible teneur en eau ne résistait que très peu à la pression une fois connectée en sortie de la pompe de nanoLC. Une partie de la phase monolithique sort en effet du capillaire. De façon similaire, la phase synthétisée avec un rapport E/P de 0,89 s'est avérée présenter une très faible perte de charge, de l'ordre de 3 bars pour un capillaire de 10 cm (contre 1 bar pour un capillaire vide) à un débit de 0,5  $\mu$ L/min. Ces résultats peuvent s'expliquer par une réticulation moins importante lorsque la teneur en eau est diminuée, un nombre important de groupements alkoxy ne prenant pas part à la réaction ce qui fragilise globalement le réseau [267, 283]. A l'inverse, la perte de charge observée pour le capillaire synthétisé avec un ratio



E/P de 1,77 s'est avérée plus élevée, de l'ordre de 20 bars pour un capillaire de 10 cm. Les conditions de synthèse impliquant d'utiliser un ratio E/P de 1,77 égal au ratio reporté dans la publication de référence de Ma *et al* ont donc été conservées pour la suite de l'étude.

### 3.2.2 Effet du ratio TEOS/APTES

Plusieurs ratios TEOS/APTES ont été étudiés en repartant du ratio de référence de 1/1 de Ma *et al* [269]. La quantité de précurseurs (TEOS + APTES) a, quant à elle, été toujours maintenue constante dans cette étude. Le temps de gel obtenu pour un ratio 1/1 est de  $265 \pm 7$  sec contre  $284 \pm 14$  sec pour un ratio 1/2. Ces deux valeurs ne sont pas significativement différentes (t-test,  $p = 0.10 > 0.05$ ,  $n = 3$ ). L'augmentation de la quantité d'APTES ne se traduit donc pas nécessairement par un temps de gel moins important de la même façon que ce qui a déjà été rapporté dans la littérature pour des monolithes hybrides synthétisés avec des précurseurs contenant une fonction basique catalysant la réaction [281]. En revanche, la diminution de la quantité d'APTES semble augmenter le temps de gel comme attendu. Un temps de gel de  $297 \pm 8$  sec a été obtenu pour un ratio molaire TEOS/APTES de 2/1. Cette valeur est significativement différente de la valeur obtenue avec un ratio 1/1 (t-test,  $p = 0,005 < 0,05$ ,  $n = 3$ ). La différence reste néanmoins relativement faible dans ces conditions. De plus, bien que ce ratio permette d'avoir un temps de gel plus long permettant de faciliter le remplissage, la quantité de groupements amine en est relativement diminuée. De plus, un phénomène de rétreint très important a souvent été observé au MEB avec ce type de synthèse contenant plus de TEOS tel qu'illustré en Figure 40.

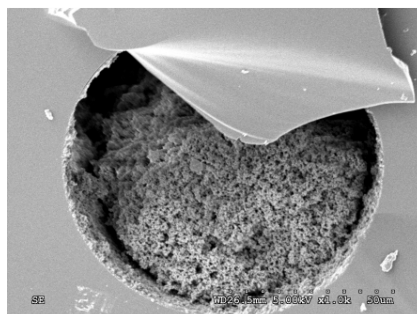


**Figure 40 :** Observations au MEB de synthèse d'un monolithe hybride en capillaire pour un ratio TEOS/APTES de 2/1. Remplissage par capillarité (très légère surpression). Vieillessement à 50°C pendant 40 h. Synthèse à partir de 8 mg de CTAB, 78  $\mu$ L d'APTES, 150  $\mu$ L de TEOS, 32  $\mu$ L d'eau et 215  $\mu$ L d'EtOH.

Ces observations corrélient avec le fait que l'incorporation de groupements organiques stabilise le monolithe et limite les contraintes résultantes de la synérèse et donc le rétreint [284]. D'autre part, l'ajout d'une plus grande quantité d'APTES est censé fragiliser le monolithe dans la mesure où le TEOS apporte la résistance mécanique au matériau puisqu'il possède quatre fonctions hydrolysables contre trois seulement pour l'APTES. Nous avons donc fait le choix, pour la suite de cette étude, de conserver un ratio TEOS/APTES de 1/1.

### 3.3 Optimisation du remplissage des capillaires

Comme déjà mentionné, le remplissage des capillaires avec le mélange réactionnel constitue l'étape délicate du procédé de synthèse du monolithe. En effet, il est nécessaire de remplir intégralement le capillaire avant que le temps de gel ne soit atteint. Or, comme nous allons le voir, ce temps de gel s'est avéré être très court à des températures proches de l'ambiante. De ce fait, la viscosité de la solution augmente rapidement ce qui peut rendre le remplissage difficile.

Deux types de remplissage ont été envisagés : l'un en exerçant une surpression au moyen d'une seringue remplie d'air et dont l'aiguille est introduite dans le flacon utilisé pour la polymérisation, l'autre en fermant simplement le flacon et en laissant la solution remplir le capillaire par capillarité. Ce deuxième mode de remplissage n'est envisageable que pour des capillaires de faible longueur (de l'ordre de 10 cm pour une polymérisation sans bain de glace et de l'ordre de 15 cm pour une polymérisation avec bain de glace). Ces deux modes de remplissage ont été testés pour une polymérisation avec bain de glace permettant de retarder la gélification. L'uniformité longitudinale du remplissage et la morphologie en coupe du monolithe ont été caractérisées respectivement par microscopie optique et microscopie électronique à balayage. Des images correspondant à des observations par microscopie optique des capillaires de silice fondue transparents une fois remplis par surpression ou par capillarité sont présentées en Figure 41.

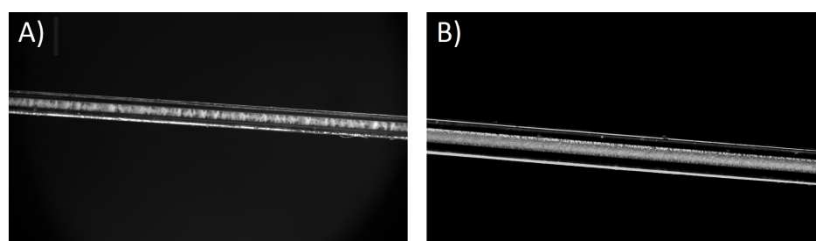


*Figure 41 : Observations par microscopie optique de synthèse du monolithe hybride en capillaire. (A) Remplissage du capillaire en exerçant une surpression. (B) Remplissage par capillarité (très légère surpression). Vieillissement à 50°C pendant 40 h. Synthèse à partir de 8 mg de CTAB, 118  $\mu$ L d'APTES, 112  $\mu$ L de TEOS, 32  $\mu$ L d'eau et 215  $\mu$ L d'EtOH.*

Il est visible qu'un remplissage avec maintien d'une surpression semble beaucoup plus inhomogène qu'un remplissage par capillarité. Il est probable que l'application d'une surpression dans le flacon contenant le mélange de polymérisation continue de pousser le mélange de synthèse au travers du capillaire alors que le réseau se forme. Ceci entraîne ainsi des zones plus denses puisque les réactifs continuent de circuler au sein des pores en formation ce qui n'est pas le cas avec un remplissage par capillarité. En effet, avec ce dernier mode de remplissage la circulation de la solution au sein du capillaire s'interrompt une fois que la viscosité du mélange dans le capillaire devient trop élevée.

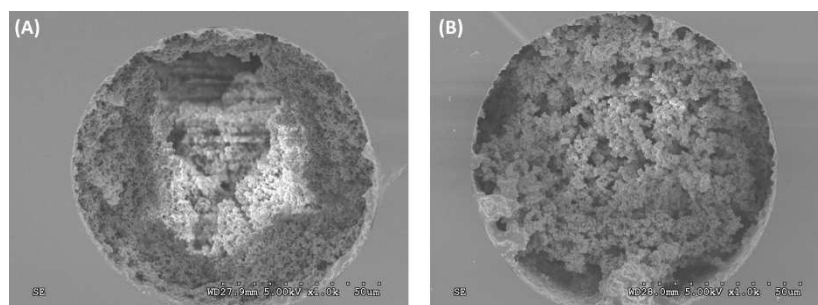


**Figure 42 :** Observations au MEB de synthèse du monolithe hybride en capillaire. (A) Remplissage du capillaire en exerçant une surpression. (B) Remplissage par capillarité (très légère surpression). Vieillissement à 40°C pendant 40 h. Synthèse à partir de 8 mg de CTAB, 118  $\mu$ L d'APTES, 112  $\mu$ L de TEOS, 32  $\mu$ L d'eau et 215  $\mu$ L d'EtOH.

D'autre part, des trous importants ont été observés au MEB au centre du monolithe sur les sections polymérisées du capillaire comme l'illustre l'exemple présenté en Figure 42. Compte tenu de la contrainte générée sur le monolithe par la surpression, il est possible que le réseau en formation soit endommagé par celle-ci créant des inhomogénéités de polymérisation et ainsi les trous observés par microscopie électronique à balayage.

Enfin, la répétabilité de chaque mode de remplissage a également été évaluée en termes de comportement hydrodynamique en mesurant la perméabilité des capillaires. Pour cela, la surface interne de deux capillaires de 40 cm a été activée. Les deux capillaires ont ensuite été découpés en quatre capillaires plus courts de 10 cm chacun. Pour chaque mode de remplissage, quatre capillaires ont été utilisés et remplis avec un mélange réactionnel initialement dans un bain de glace à 0°C. Après gélification à 22°C puis vieillissement 40h à 50°C ces capillaires ont été rincés pour éliminer le porogène et leur perméabilité a été mesurée. Une perméabilité moyenne de  $2,80 \pm 0,74 \times 10^{-14} \text{ m}^2$  ( $n = 4$ , C.V = 26,4%) a été obtenue dans ces conditions pour un remplissage sans surpression, par capillarité. Une perméabilité moyenne de  $5,02 \pm 3,0 \times 10^{-14} \text{ m}^2$  ( $n = 4$ , C.V = 59,8%) a quant à elle été obtenue avec une surpression. Il est ainsi visible au vu de ces résultats que le remplissage en exerçant une surpression conduit à des mesures de perméabilité beaucoup plus dispersées, les C.V. avec ce mode de remplissage étant de l'ordre de 2,3 fois plus élevés qu'avec un remplissage par capillarité. Ces résultats sont très probablement le fait de l'inhomogénéité observée par microscopie pour un remplissage par surpression et de la difficulté à contrôler précisément la pression appliquée.

Pour l'ensemble des raisons explicitées ci-avant, le mode de remplissage par capillarité (légère surpression) a finalement été conservé dans la suite de l'étude.

### 3.4 Vieillissement

Au cours de l'étape de vieillissement, une compression radiale du monolithe peut se produire du fait de la synérèse comme évoqué précédemment. Cette compression peut aller jusqu'à 30% en diamètre [270]. Ce phénomène de rétreint a été observé lors de la synthèse du monolithe en milieu non confiné avec une étape de vieillissement de 40 h à 40°C ou à 50°C dans des flacons en verre ou

dans des tubes en plastique, le monolithe n'étant dans ce cas absolument pas attaché aux parois. Cette étape de vieillissement est donc délicate et importante à maîtriser. La grande différence lorsque le monolithe est synthétisé *in situ* en capillaire est que la paroi des capillaires de silice fondue a été activée de telle façon que les précurseurs réagissent avec les fonctions Si-OH à la surface de manière à ancrer le monolithe. De plus, comme déjà évoqué dans la partie 2.1.3 en page 120, le monolithe reste dans un environnement humide au format capillaire et commence à sécher très lentement grâce aux bouchons de silicone. Les contraintes dues à l'évaporation du solvant interstitiel sont donc largement atténuées [258].

Tout d'abord, en capillaire, aucune différence en termes de structure (observations de coupes au MEB) n'a été observée entre un vieillissement de capillaires scellés 40h à l'étuve à 50°C ou à 40°C. De plus, aucune différence en termes de perméabilité mais aussi de structure n'a été observée entre un vieillissement au bain-marie ou en étuve. Deux capillaires monolithiques scellés par des bouchons en silicone et ayant subi un vieillissement à 40°C pendant 40h respectivement dans un bain-marie ou dans une étuve ont présentés des perméabilités moyennes très proches de  $2,75$  et  $2,65 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ .

Trois durées de vieillissement à 40°C ont par ailleurs été testées : 24h, 40 h et 64 h. Pour ce faire, trois capillaires ont été activés, remplis avec le mélange réactionnel puis laissés à l'étuve pour l'étape de vieillissement. Après 24 h, chaque capillaire est coupé en deux parties. Une partie est remise à l'étuve pour poursuivre le vieillissement tandis qu'une autre partie a été lavée pour éliminer le CTAB puis caractérisée par des observations au MEB. Le même protocole a été appliqué après 40 h et 64 h. Des images issues d'observations par microscopie électronique à balayage de coupes de ces capillaires après les trois durées de vieillissement étudiées sont présentées en Figure 43.

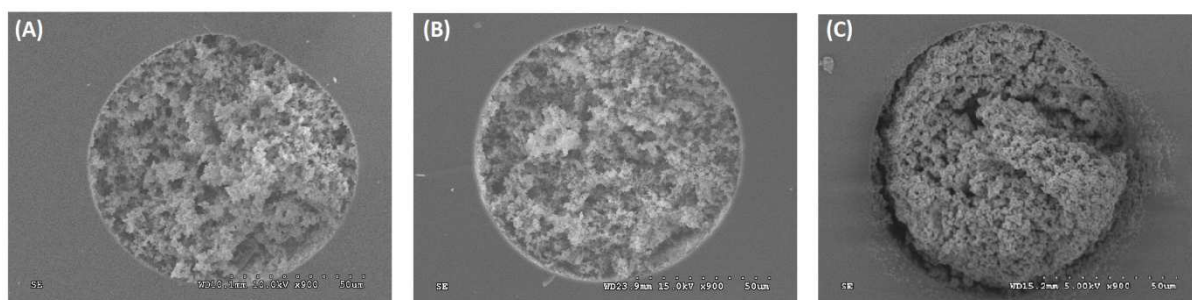


**Figure 43** : Images MEB de synthèse du monolithe hybride en capillaire. Vieillissement à 40°C pendant (A) 24 h, (B) 40 h, (C) 64 h. Synthèse à partir de 8 mg de CTAB, 118  $\mu\text{L}$  d'APTES, 112  $\mu\text{L}$  de TEOS, 32  $\mu\text{L}$  d'eau et 215  $\mu\text{L}$  d'EtOH.

Après 24 et 40 h, seules deux coupes sur quinze ont présenté un phénomène de rétreint. Le monolithe s'avère dans la majorité des cas bien ancré aux parois. En revanche, après 64h, la grande majorité des coupes réalisées (treize sur quinze) ont permis d'observer une compression du monolithe qui se détache de ce fait de la paroi comme observé en Figure 43. Cette faible compression radiale du monolithe constaté de façon générale en capillaire est le fait tout d'abord d'un bon ancrage aux parois internes du capillaire et ensuite d'un vieillissement entraînant un faible

séchage du monolithe du fait du scellage des capillaires, ce qui limite l'évaporation du solvant interstitiel et diminue les contraintes sur le matériau [258]. Ce procédé limite ainsi les effets de la synérèse comme déjà observé sur des monolithes en capillaire [263]. La faible rétraction du monolithe peut également être attribuée à la présence des groupements amines qui limitent les réactions de réticulation pouvant se produire lors du vieillissement et qui entraînent généralement une diminution du volume de monolithes inorganiques [259, 284].

### 3.5 Efficacité de l'élimination du porogène

L'élimination efficace du porogène est un pré-requis au greffage par la suite de biomolécules. Cependant, il a été montré, notamment dans le cas du PEG que cette élimination peut s'avérer difficile [280]. Il existe deux méthodes pour éliminer le CTAB du monolithe hybride à base de silice.

La première méthode est une étape de calcination consistant à exposer le monolithe à une température supérieure à 400°C. Cette étape de calcination permettrait d'éliminer par combustion (pyrolyse) toutes les molécules organiques contenues dans l'échantillon. Les risques de cette étape de calcination sont la rétraction du monolithe et l'apparition de craquelures (fissures) au sein du matériau. D'autre part, en vue de l'intégration de ces monolithes dans des capillaires de silice fondue, se pose la question de la résistance à la température des capillaires. En effet, les capillaires choisis pour cette étude ne présentent pas de couche protectrice de polyimide, opaque, de manière à pouvoir réaliser des caractérisations optiques sur le remplissage des capillaires. Cette absence de polyimide, limite la stabilité thermique du capillaire qui est plus fragile à des températures dépassant 160 °C selon les spécifications du fabricant.

La deuxième possibilité consiste en une étape de lavage (ou échange de solvant). L'équipe de Yukui Zhang a utilisé une étape de lavage à l'éthanol suivi d'un lavage à l'eau [263, 269]. Nous avons donc choisi de suivre les mêmes conditions. Il a ainsi été décidé de caractériser le lavage effectué. Le lavage choisi arbitrairement depuis le début de l'étude consiste à percoler à l'aide d'une pompe de nanoLC l'équivalent de 20 volumes de capillaires (volume de capillaire vide,  $V_{\text{total}}$ ) en éthanol puis le même volume d'eau. Par exemple, pour un capillaire de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre interne et de 10 cm de longueur,  $V_{\text{total}}$  est égal à 785 nL et le lavage est réalisé avec 15,7  $\mu\text{L}$ . Au vu des débits appliqués, la récupération des solutions en sortie du capillaire pour quantifier le CTAB dans les solutions de lavage s'avère difficile. Une caractérisation du monolithe synthétisé en milieu non-confiné, *i.e.* dans des flacons (synthèse en "*bulk*") a été envisagée, en émettant l'hypothèse que ce dernier a globalement la même structure que le monolithe synthétisé en milieu confiné, *i.e.* dans les colonnes capillaires. Pour réaliser cette étude, nous avons décidé d'utiliser une analyse thermogravimétrique. Cette analyse permet de soumettre un échantillon à une rampe de température puis de mesurer les pertes de masse subies par celui-ci au cours de cette rampe. Un matériau non lavé doit présenter une perte de masse caractéristique du CTAB ainsi que des précurseurs n'ayant pas réagi.

La Figure 44 rassemble les résultats d'analyses thermogravimétriques réalisées sur des monolithes résultant de deux synthèses faites en flacon puis lavés après vieillissement 40h à l'étuve à 40°C. La courbe ATG a été tracée en fonction de la température T (signal expérimental), sur laquelle les courbes DTG et ATD ont été superposées. Une vitesse de montée en température assez rapide (20°C/min) a été utilisée afin d'avoir une analyse rapide (80 min). Les résultats présentés ci-dessous servent donc uniquement à avoir une idée des variations de masse des échantillons en fonction de la température. Les résultats pourraient être affinés en réalisant l'analyse avec une vitesse de montée en température plus lente ( $\leq 10^\circ\text{C}/\text{min}$ ).

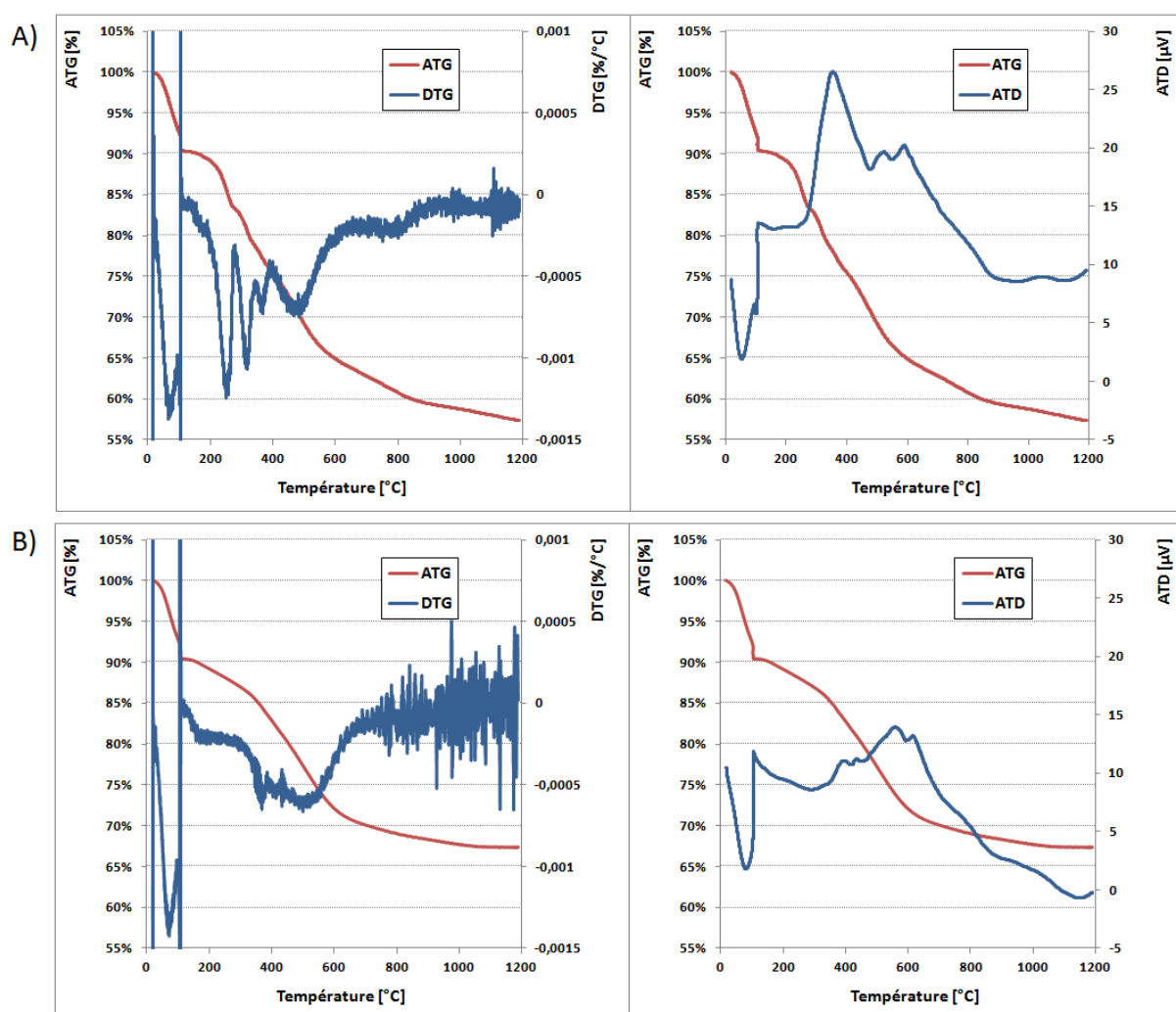


Figure 44 : Thermogrammes représentant les courbes ATG, DTG et ATD du monolithe organique-inorganique synthétisé en bulk. A) Monolithe non lavé. B) Monolithe lavé.

Au vu des thermogrammes correspondant au monolithe non rincé en Figure 44-A, il est possible de réaliser plusieurs observations. Avant 105°C, une importante perte de masse en ATG, de l'ordre de 10%, associée à un pic endothermique dans la courbe ATD est observable. Cette perte de masse est attribuée à la désorption de l'eau physiquement adsorbée (physisorption) en surface du monolithe ainsi que de l'éthanol résiduel. Ensuite, deux à trois pertes de masses successives sont

observées entre 105°C et environ 450°C. Ces pertes correspondent en partie à la décomposition du porogène (CTAB) sous plusieurs états tel que déjà observé par plusieurs équipes étudiant des synthèses faisant intervenir du CTAB [285-288]. La première, située entre 105°C et 275°C, a une amplitude d'environ 7% en ATG et a une vitesse maximale autour de 250°C d'après la courbe DTG. Cette perte correspond à la combustion et à la perte du surfactant simplement adsorbé à la surface de la silice [287, 288]. Cependant, cette perte de masse importante, alors que le CTAB ne représente que moins de 5% de la masse des précurseurs dans le mélange réactionnel initial, laisse à penser qu'il ne peut pas être exclu que cette perte de masse corresponde en partie à la décomposition de l'APTES et du TEOS n'ayant pas réagi [289]. Ensuite une deuxième perte de masse d'environ 4% est visible entre 275°C et 340°C avec une vitesse maximale autour de 315°C. Cette perte de masse peut s'expliquer par la décomposition du CTAB intercalé dans les pores du monolithe ou sous forme cristalline [285-288]. Entre 340°C et 390°C on observe également un petit pic, présent également sur le signal ATG du monolithe lavé et présentant une vitesse maximale à 360°C. La perte de masse associée est de 2,5%. Cette perte de masse est difficile à interpréter. Elle peut potentiellement correspondre à la perte de molécules de CTAB les plus fortement liées aux pores du monolithe. Globalement, ces deux dernières pertes conduisent à un pic exothermique qui s'étale de 250 à environ 430°C. Il est visible que la courbe ATD du monolithe une fois lavé ne présente plus de pic exothermique aussi intense. Seul un pic peu intense dont le maximum se situe autour de 350°C reste observable sur le signal ATD. Ceci semble confirmer la bonne élimination du CTAB présent dans les pores du monolithe. Enfin, une fois lavé le monolithe ne présente une perte de masse qui n'est que de 3,2% en ATG entre 105 et 275°C. Ces résultats montrent que le lavage est relativement efficace. On peut estimer qu'au moins 60% du CTAB est éliminé par un lavage avec 20 volumes de phase d'EtOH et 20 volumes d'eau percolés.

Pour le monolithe lavé, on remarque, sur la courbe DTG, une perte de masse dont la vitesse maximale se situe entre 460 et 500°C. Cette perte de masse peut être attribuée à la décomposition des fonctions aminopropyl [290]. En effet, sur la courbe ATG la perte de masse entre 390°C et 650°C est de l'ordre de 12,5% (soit 13,8% de la masse sèche). En comparaison, les groupements aminopropyl initialement introduit représentent environ 26% de la masse de l'APTES, soit environ 13% de la masse des deux précurseurs ce qui peut correspondre à la perte des fonctions aminopropyl d'autant plus que cette perte de masse est observée à la fois sur le monolithe non lavé et sur le monolithe lavé.

Au-dessus de 600°C, aucun pic n'est observé sur la courbe ATD et une légère perte de masse se produit jusqu'à 1000°C (1% de perte de masse). Au-dessus de 1000°C, le système évolue à masse constante. Enfin, autour de 1160°C, une légère cassure dans la ligne de base du signal ATD est enregistrée. Cette transformation du second ordre est reliée à la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) de la silice [291].

En conclusion, la principale information que nous apporte l'ATG est que l'étape de lavage, *i.e.* l'élimination du CTAB de notre échantillon, est efficace. En effet, si la perte de masse entre 105 et 400°C, zone où le CTAB adsorbé et intercalé dans les pores va se dégrader, est d'environ 15% avant rinçage, elle n'est plus que de 6,5% sur le même intervalle après lavage. On peut donc dire que dans ces conditions, près de 60% du CTAB a bien été éliminé. Il est même probable qu'en capillaire le lavage soit plus efficace. En effet, ici nous avons réalisé l'étape de lavage principalement par échange de solvant en percolant des solutions au travers d'un monolithe réduit en particules et introduit entre deux frittés dans une cartouche. Or, dans le cas d'un monolithe en capillaire, la nanoLC permet de mouiller l'ensemble des pores du matériau et faire circuler les solutions directement au travers de ces derniers ce qui doit certainement augmenter l'efficacité de cette étape de lavage.

### 3.6 Conclusion

Cette première étape a permis de mettre en place un protocole de synthèse de monolithe en capillaire. La meilleure répétabilité de remplissage a été obtenue pour des mélanges de synthèse introduits au sein du capillaire par capillarité. Le temps de gel très court de la synthèse envisagée nous a obligé à considérer le remplissage de capillaires de seulement 10 à 15 cm. Cette longueur est néanmoins largement suffisante pour envisager par la suite l'immobilisation de biomolécules et le développement d'IS ou d'OS miniaturisés, dont la longueur devra être de toute façon inférieure à la longueur de colonne de nanoLC (en général 15 cm) pour assurer une bonne qualité de couplage. La gélification et l'ensemble des synthèses sont toujours réalisés en atmosphère thermostatée à 22°C. La durée du vieillissement avant élimination du CTAB peut être conduite pendant 40h à 40°C voire à 50°C. Un ratio APTES/TEOS de 1/1 a finalement été choisi. Enfin, l'élimination du tensioactif par percolation de l'équivalent de 20 volumes de monolithe en éthanol puis en eau semble être efficace avant d'utiliser le monolithe.

## 4 Caractérisation du monolithe obtenu

Nous avons vu précédemment que les C.V. sur les mesures de perméabilité des synthèses les plus répétables se sont avérées être de l'ordre de 26%. De manière à améliorer encore cette répétabilité, un chronométrage précis de l'ensemble des étapes de préparation du mélange réactionnel a été envisagé. Nous allons voir que le protocole de remplissage développé dans la partie précédente ainsi que ce chronométrage ont permis d'optimiser davantage la répétabilité de la valeur de perméabilité des monolithes préparés ce qui a permis ensuite de caractériser plus amplement l'effet de la température de gel mais aussi de la quantité de porogène sur la perméabilité du monolithe. Cette maîtrise de la perméabilité est une étape importante pour pouvoir étudier à



l'avenir (même au-delà de ce projet de thèse) l'effet de la macroporosité sur le taux de greffage des biomolécules.

## 4.1 Répétabilité de la synthèse

De façon à caractériser quantitativement la répétabilité de la synthèse en capillaire, nous avons choisi de mesurer la perméabilité des monolithes. Si le monolithe est mal ancré aux parois du capillaire ou si de grandes cavités se forment au sein du matériau du fait d'une résistance mécanique insuffisante, la perméabilité en sera affectée. Le profil hydrodynamique peut par ailleurs s'écarter de la linéarité. Quatre capillaires de 10 cm, dont la surface interne a été activée, ont été remplis avec le mélange réactionnel (E/P = 1,77, TEOS/APTES = 1/1 et CTAB/Précurseurs = 2,2%) maintenus préalablement à 0°C. L'ensemble des étapes sont dans ce cas chronométrées. Après vieillissement pendant 40h et lavage, la perméabilité de chaque capillaire a été mesurée en étudiant l'évolution du rapport  $\frac{\Delta P}{L}$  en fonction du débit d'eau appliqué. Les résultats sont présentés en Figure 45.

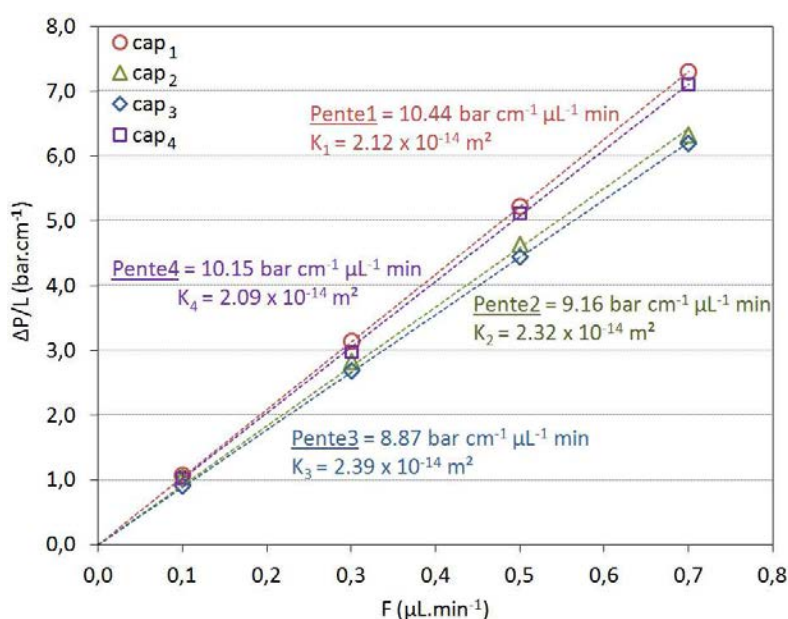


Figure 45 : Perte de charge de quatre monolithes en capillaire ( $cap_1, 2, 3$  et  $4$ ) synthétisés sur quatre jours successifs en fonction du débit d'eau appliqué et valeurs de perméabilités résultantes ( $K_1, 2, 3$  et  $4$ )

Comme il est visible sur la Figure 45, les pentes obtenues pour les quatre capillaires sont très similaires et comprises entre 8,87 et 10,44 bar.cm<sup>-1</sup>.μL<sup>-1</sup>.min. La pente moyenne est égale à  $9,66 \pm 0,76$  bar.cm<sup>-1</sup>.μL<sup>-1</sup>.min (C.V. = 7,8%) ce qui conduit à une valeur moyenne de perméabilité de  $2,23 \pm 0,15 \times 10^{-14}$  m<sup>2</sup> (C.V. = 6,6%, n = 4) pour ces quatre synthèses. Cette valeur est du même ordre de grandeur que la valeur rapportée par Ma *et al* [269] qui ont mentionné une perte de charge de 54 bar.cm<sup>-1</sup> à 5 μL.min<sup>-1</sup> permettant de calculer une perméabilité égale à  $1,96 \times 10^{-14}$  m<sup>2</sup>. Considérant la faible répétabilité des synthèses par voie sol-gel généralement décrites [210, 211], des C.V. de 6,6% se sont avérés comme étant très satisfaisants pour ces synthèses avec le protocole optimisé. A

un débit de  $200 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ , la perte de charge attendue est ainsi de l'ordre de  $8,6 \pm 0,6$  bars pour un capillaire de 4,5 cm et de l'ordre de  $13,3 \pm 0,9$  bars pour un capillaire de 7 cm dans 100% d'eau ou de tampon aqueux (typiquement du PBS ou un tampon de liaison) ce qui est très satisfaisant pour ensuite envisager le couplage de ce type de capillaire avec la nanoLC.

## 4.2 Paramètres jouant sur la macroporosité

L'un des objectifs de ce projet, comme déjà mentionné, est d'optimiser un support monolithique pour ensuite l'appliquer aux greffages de biomolécules. Les biomolécules étant des molécules de taille importante, la taille des pores peut être un facteur limitant pour envisager leur immobilisation [55]. Un de nos objectifs a donc été d'envisager plusieurs méthodes possibles pour faire varier la perméabilité de notre monolithe et jouer sur la taille des macropores sans modifier drastiquement les conditions de synthèse.

### 4.2.1 Influence de la température du mélange réactionnel

La température à laquelle l'ensemble des réactifs et le mélange réactionnel sont fixés s'est avérée avoir une forte influence sur la perméabilité. Pour évaluer son effet, cinq capillaires de 20 cm ont été activés. Chaque capillaire a ensuite été découpé en deux morceaux de longueur identique (10 cm). Pour chacun, l'un des capillaires est rempli avec une solution maintenue préalablement au remplissage à  $0^\circ\text{C}$  dans un bain de glace, l'autre étant lui rempli avec un mélange maintenue à température de la pièce :  $22^\circ\text{C}$ . La Figure 46 reporte la perte de charge moyenne obtenue sur chaque capillaire en fonction du débit appliqué.

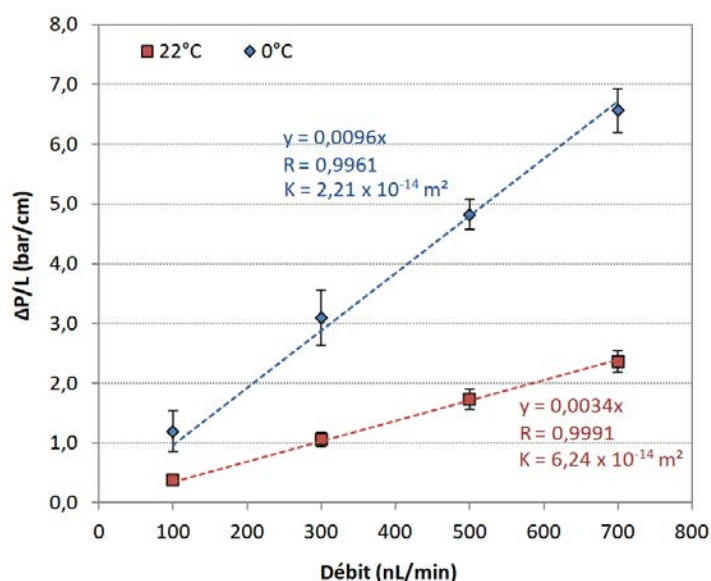


**Figure 46 :** Perte de charge de monolithes en capillaire synthétisés à partir de mélanges réactionnels maintenus à deux températures différentes ( $0^\circ\text{C}$  et  $22^\circ\text{C}$ ) en fonction du débit d'eau appliqué. Synthèse :  $118 \mu\text{L}$  d'APTES,  $112 \mu\text{L}$  de TEOS,  $32 \mu\text{L}$  d'eau,  $215 \mu\text{L}$  d'EtOH et  $8 \text{ mg}$  de CTAB. Vieillessement à  $40^\circ\text{C}$  pendant  $40 \text{ h}$ .  $n = 5$  synthèses pour chaque température.

Il est visible que la température initiale de conditionnement du mélange de polymérisation a une influence sur la perméabilité. Ici, un mélange maintenu dans un bain de glace à 0°C puis sorti du bain de glace juste avant le remplissage présente une perméabilité beaucoup plus faible et donc engendre une perte de charge beaucoup plus importante qu'un monolithe préparé en maintenant l'ensemble du mélange de polymérisation à 22°C avant remplissage. Un facteur 2,6 entre les valeurs de perméabilité a été observé. La perméabilité est en effet de  $2,21 \pm 0,32 \times 10^{-14} \text{ m}^2$  pour un conditionnement à 0°C contre  $6,24 \pm 0,55 \times 10^{-14} \text{ m}^2$  pour une mise en solution des réactifs à 22°C. Pour un même rapport massique de (précurseur alkoxyde)/(solvants), cet écart de perméabilité est le résultat d'une différence de macroporosité du matériau, qui serait induite par une modification des cinétiques de séparation de phases *in situ* [260, 292]. Lorsque le mélange de polymérisation est d'abord équilibré à 0°C, la cinétique de séparation de phases est ralentie et inhomogène puisqu'un gradient de température s'établit entre les parois et le centre du capillaire (thermostaté à 22°C). A l'inverse si les capillaires sont remplis avec un mélange initialement thermostaté à 22°C, les cinétiques de séparation de phases sont homogènes et plus rapides. Lors de l'étape de gélification très rapide qui s'en suit, réalisée à 22°C, le système se fige au début de l'évolution de la séparation de phases, ce qui réduit la macroporosité du matériau dans le cas d'un mélange initialement à 0°C et explique les différences de perméabilité des capillaires remplis avec un mélange maintenu préalablement à 0°C ou à 22°C.

Les deux types de capillaires ont également été caractérisés qualitativement par des observations en coupe réalisées au MEB. Il est visible en Figure 47 que les deux structures sont très proches.

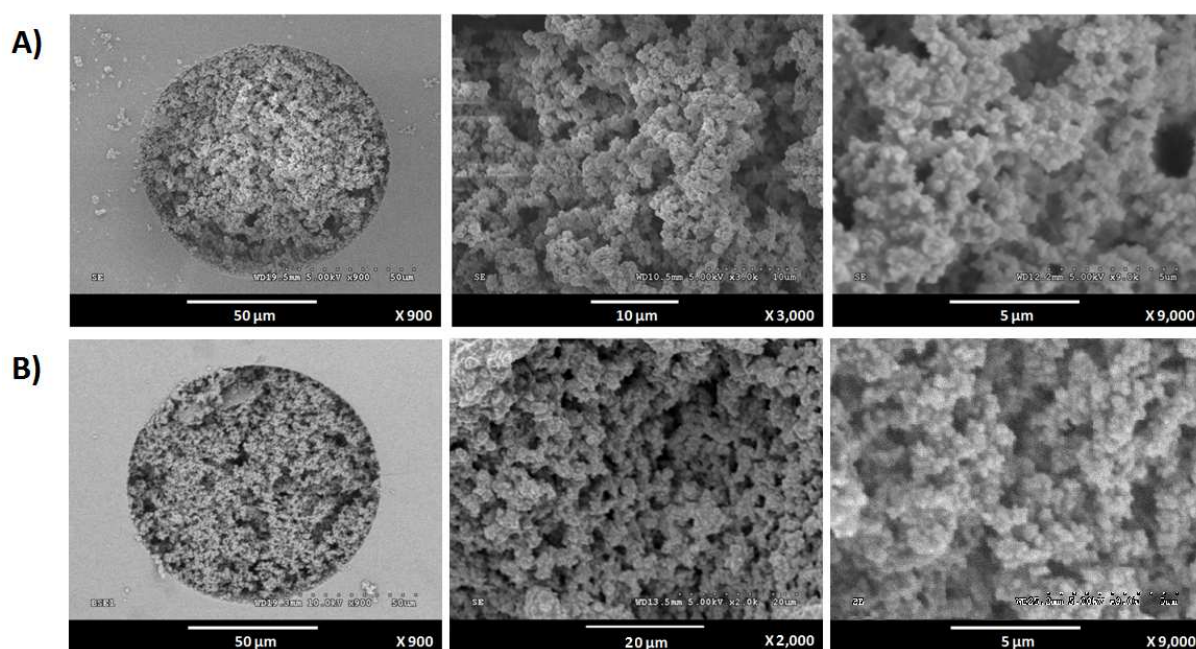


**Figure 47** : Observations en coupe au MEB de monolithes en capillaire synthétisés en maintenant le mélange réactionnel avant remplissage à une température de : A) 0°C et B) 22°C.

Peu de différences notables sont visibles avec les grossissements les plus élevés. Dans chacun des cas, la structure globale est une structure faite de particules agrégées. Cependant, le grossissement le moins fort (x 900) laisse entrevoir une différence principalement au niveau des macropores. Des macropores de taille maximale autour de 5  $\mu\text{m}$  sont observés pour une température de mélange de 0°C, par contre des macropores allant jusqu'à 8-9  $\mu\text{m}$  sont visibles sur le monolithe synthétisé à 22°C. On remarque que quel que soit le procédé utilisé, le remplissage s'avère de plus répétable avec des écart-types relativement faibles pour chaque mesure de perte de charge. Ces monolithes peuvent donc être utilisés pour des traitements ultérieurs.

#### 4.2.2 Influence du tensioactif

Un autre paramètre important sur lequel il est possible de jouer pour modifier la macroporosité est la quantité de porogène. Nous avons donc fait varier la quantité de CTAB ajouté dans le mélange de polymérisation avant le remplissage du capillaire pour en mesurer ensuite la perméabilité résultante.

Il a tout d'abord été observé en flacon que la présence du CTAB ne jouait que très peu sur le temps de gel. En effet, un temps de gel de  $313 \pm 11$  sec a été mesuré pour une synthèse en flacon réalisée sans CTAB (le mélange étant d'abord maintenu à 0°C puis sorti du bain de glace dans une atmosphère à 22°C). Le rapport molaire CTAB/précurseurs a ensuite été augmenté. Pour des ratios en CTAB/précurseurs de 1,1%, 2,2%, 3,3%, 4,4% et 8,7% des temps de gel non significativement différents (ANOVA,  $p = 0.46 > 0.05$ ) et dont la moyenne est égale à 262 sec ont été obtenus, soit une chute du temps de gel de seulement 16,3% par rapport à une synthèse sans le porogène. Le tensioactif joue donc très légèrement sur la transition de phase du procédé sol-gel une fois ajouté et par la suite, l'augmentation du ratio CTAB/précurseurs ne conduit pas à une modification du temps de gel et ne nécessite donc pas de procéder à un remplissage différent en fonction de la quantité de CTAB.

Nous avons ensuite envisagé le remplissage de capillaires avec des mélanges réactionnels contenant des quantités croissantes de CTAB de manière à en étudier l'influence sur la macroporosité et la perméabilité. Cette étude a été réalisée pour un capillaire maintenu à 22°C et un mélange de polymérisation lui aussi maintenu à 22°C sans bain de glace. Quatre rapports molaires CTAB/précurseurs ont été envisagées : 1,1%, 2,2%, 6,6% et 8,7% correspondant à des masses de 4, 8, 24 et 32 mg de tensioactif ajoutées dans un mélange de polymérisation préparé à partir de 32  $\mu\text{L}$  d'eau, 112  $\mu\text{L}$  de TEOS et 118  $\mu\text{L}$  d'APTES. Il est à noter qu'une masse de CTAB supérieure à 32 mg ne peut pas être utilisée puisqu'il a été observé que le CTAB précipitait en solution au-delà de cette concentration lors de l'ajout des deux alkoxysilanes (TEOS et APTES). Les mesures de perméabilité effectuées sur les monolithes en capillaire préparés avec les différentes quantités de CTAB étudiées sont reportées en Figure 48 en fonction du rapport molaire CTAB/précurseurs.

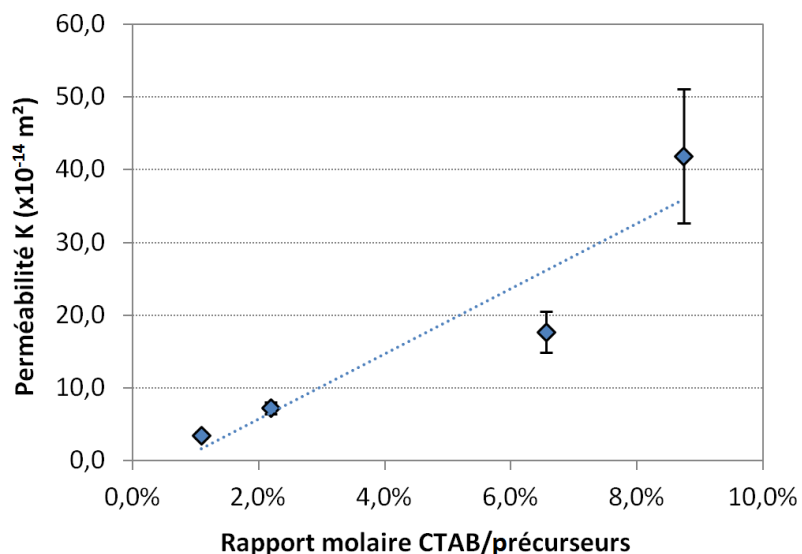


Figure 48 : Perméabilité de monolithes en capillaire en fonction du rapport molaire CTAB/précurseurs utilisés pour réaliser la synthèse du monolithe hybride. Synthèse à partir de 118  $\mu\text{L}$  d'APTES, 112  $\mu\text{L}$  de TEOS, 32  $\mu\text{L}$  d'eau, 215  $\mu\text{L}$  d'EtOH et de quantités variables de CTAB (4, 8, 24, 32 mg). Vieillessement à 40°C pendant 40 h.  $n = 3$  synthèses pour chaque point.

Il est visible sur la Figure 48 que la perméabilité augmente lorsque l'on augmente la quantité de CTAB ajoutée au mélange réactionnel. Cette observation corrèle avec les observations faites par Yan *et al* [263] en 2004 sur le même monolithe et par Zhang *et al* [293] en 2012 sur un monolithe hybride présentant des groupements phényle en surface. En effet, la perméabilité dans ces conditions passe d'une valeur de  $3,51 \pm 0,40 \times 10^{-14} \text{ m}^2$  (C.V. = 11,4%,  $n = 3$ ) pour un rapport molaire CTAB/précurseurs de 1,1% à une valeur 12 fois plus élevée de  $41,9 \pm 9,2 \times 10^{-14} \text{ m}^2$  (C.V. = 22,0 %,  $n = 3$ ) pour un rapport molaire huit fois plus grand. Ces valeurs correspondent à des pertes de charge de l'ordre de 30 bars et de 2,6 bars respectivement pour un capillaire de 10 cm soumis à un débit d'eau pure de 500 nL/min. Les C.V. plus élevés observés pour les rapports molaires élevés sont en grande partie dus à la plus forte incertitude de mesure de la perte de charge de ces capillaires. En effet, l'incertitude sur chaque mesure effectuée à l'aide des pompes de nanoLC est de l'ordre de 0,2 bars. De ce fait, la mesure de la perte de charge générée par des capillaires très perméables (et ne générant donc qu'une très faible perte de charge) s'avèrera beaucoup plus imprécise.

La dernière valeur de 2,6 bars pour un capillaire de 10 cm paraît trop faible, un capillaire vide à ce débit induisant déjà une perte de charge de l'ordre de 1 bar. Un tel monolithe risque ainsi de ne pas présenter une surface spécifique suffisante pour augmenter significativement le taux de greffage de biomolécules en capillaire par rapport à des approches en tube ouvert. La valeur de perméabilité et donc de perte de charge générée par l'utilisation d'un rapport CTAB/précurseurs de 1,1% (30 bars) se situe quant à elle dans une gamme qui paraît cohérente avec une utilisation en SPE en ligne tout comme la valeur pour un rapport molaire de 2,2% qui est de l'ordre de 15 bars ( $K = 7,26 \pm 0,81 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ , C.V = 11,2%,  $n = 3$ ). Cette influence du CTAB sur la perméabilité ainsi que sur la porosité a été confirmée qualitativement par observations au MEB. Des exemples de telles observations pour les quatre rapports molaires CTAB/Précurseurs étudiés sont regroupés en Figure 49.

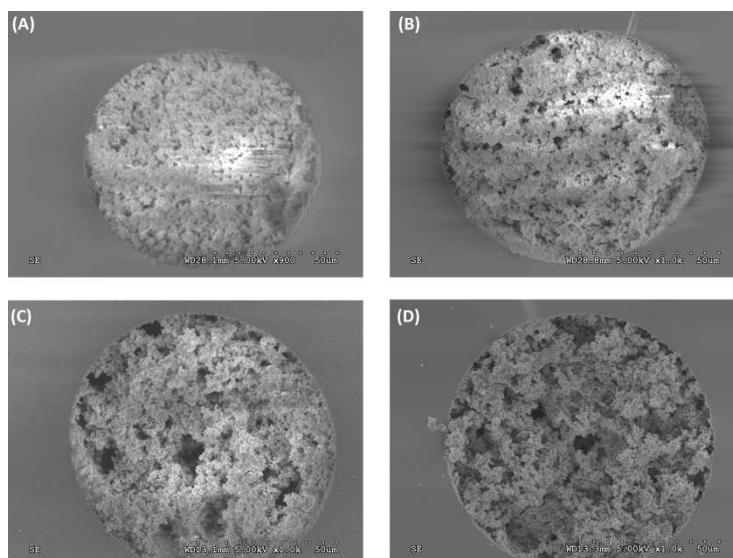


**Figure 49 :** Images MEB en coupe de synthèse du monolithe hybride en capillaire pour différents rapports molaires CTAB/Précurseurs utilisés pour réaliser la synthèse : (A) 1,1%, (B) 2,2%, (C) 6,6%, (D) 8,7%. Synthèse à partir de 118  $\mu\text{L}$  d'APTES, 112  $\mu\text{L}$  de TEOS, 32  $\mu\text{L}$  d'eau, 215  $\mu\text{L}$  d'EtOH et de quantités variables de CTAB (4, 8, 24, 32 mg). Vieillissement à 40°C pendant 40 h.

Il est visible que le monolithe préparé avec seulement 4 mg de CTAB (rapport CTAB/Précurseurs de 1,1%) paraît très dense tandis que la taille des macropores augmente lorsque la quantité de porogène dans le mélange de polymérisation augmente. La taille maximale des macropores observés sur ces coupes peut être estimée à environ 3  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$  et 26  $\mu\text{m}$  respectivement pour des rapports molaires CTAB/Précurseurs de 1,1%, 2,2%, 6,6% et 8,7%. L'ensemble des tailles de macropores mesurées semblent ne pas être incompatible avec la percolation de solutions de biomolécules, la taille d'un anticorps étant par exemple inférieure à 15 nm [294]. La taille des mésopores restent quant à elle difficile à évaluer par simple observation MEB. Il reste à déterminer les synthèses pouvant s'avérer difficile à utiliser pour l'immobilisation covalente de biomolécules, un compromis devant être trouvé entre perméabilité, surface spécifique et taux de greffage. Un rapport CTAB/précurseurs de 2,2% a finalement été conservé pour la suite de ce projet de thèse et les essais de greffage de biomolécules. La maîtrise acquise des paramètres jouant sur la perméabilité reste un atout pour la suite de cette étude ou d'études futures.

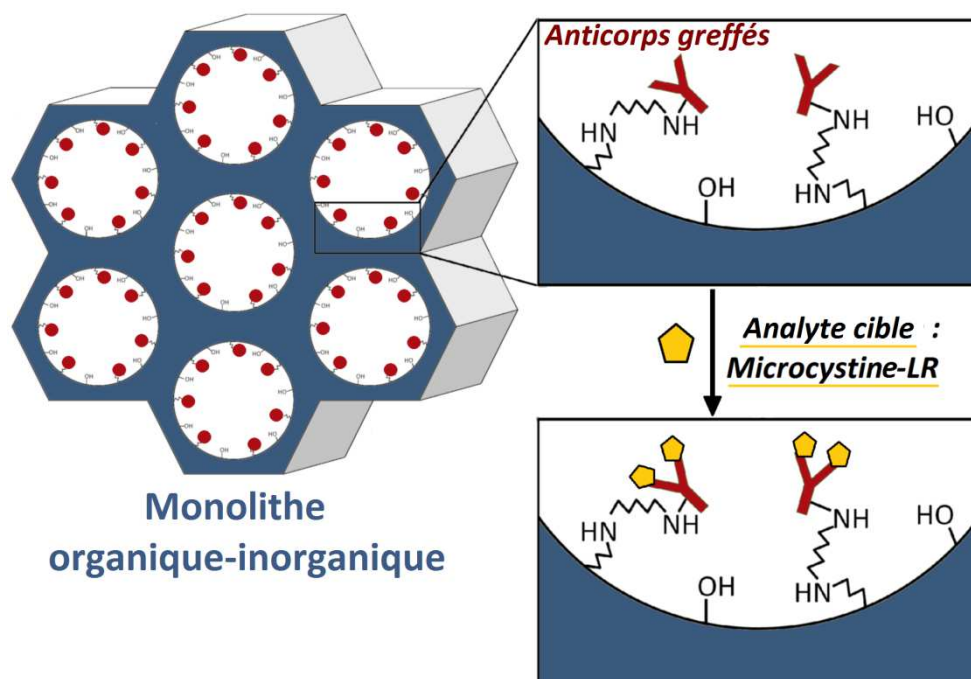
## 5 Conclusions

En conclusion, dans la première partie de ce projet de thèse, nous avons déterminé les conditions de synthèse en capillaire d'un monolithe hybride organique-inorganique présentant à la surface de ses pores des groupements amines permettant d'envisager ensuite le greffage de biomolécules après une étape d'activation. Une attention particulière a été accordée à trouver des conditions expérimentales de synthèse et de remplissage du capillaire par un monolithe présentant

une structure de morphologie répétable. Cette répétabilité a principalement été mise en évidence grâce à des mesures hydrodynamique de la perméabilité du monolithe. La meilleure répétabilité a été obtenue pour des synthèses avec un rapport Eau/précurseur de 1,77, CTAB/précurseurs de 1,1 ou 2,2%, un rapport APTES/TEOS de 1/1, la quantité d'éthanol ajoutée étant quant à elle fixée au départ. Ces conditions se rapprochent fortement des conditions initialement décrites par Ma *et al* [269] et Yan *et al* [263] qui ne donnaient cependant aucune information sur la façon dont ils avaient fixé ces valeurs et également aucune donnée en termes de répétabilité de synthèse. Il a été montré qu'il était possible de faire varier la macroporosité du monolithe en capillaire en jouant sur deux paramètres : la quantité de CTAB ainsi que la température initiale du mélange de synthèse avant remplissage des capillaires. Cette variation de la macroporosité, s'est avérée avoir une influence sur des séparations en CEC avec ce monolithe [263] et pourrait également influencer sur la surface du monolithe effectivement accessible aux biomolécules lors du greffage tel que décrit précédemment pour des monolithes organiques [55].

Maintenant qu'un support monolithique a pu être développé, l'immobilisation de biomolécules peut être envisagée et notamment l'immobilisation dans un premier temps d'anticorps, ce qui a fait l'objet du chapitre 3.

## Chapitre 3 – Développement d'un immunoadsorbant miniaturisé (mIS)





# 1 Introduction

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'un monolithe hybride organique-inorganique présentant des groupements aminopropyl en surface pouvait être synthétisé de manière répétable dans des capillaires de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre interne. L'objectif de ce chapitre est maintenant de mettre à profit le support développé, présentant une surface spécifique élevée, pour immobiliser des biomolécules et développer des supports d'extraction sélective. Les premières biomolécules qui ont été considérées dans ce projet de thèse sont les anticorps. Il a été mentionné au chapitre 1 que l'immobilisation d'anticorps avait été largement étudiée en utilisant des monolithes organiques. Des monolithes à base d'acrylate ont en effet été utilisés pour immobiliser des anticorps au format disques [51-55, 295, 296], précolonnes [35, 37, 56] mais aussi dans des canaux de puces [223, 224] et des capillaires (75-100  $\mu\text{m}$  d.i.) [69, 180, 181, 222]. Le glycidil méthacrylate, qui présente un groupement époxy facilitant le greffage covalent d'anticorps, est de loin le précurseur le plus utilisé pour ce type d'approche [35, 37, 56, 69, 180, 222, 223, 295, 296]. En parallèle, il a été mentionné que le greffage d'anticorps sur des monolithes à base de silice avait été, lui, très peu étudié. Une seule publication, parue en 2011, fait en effet état du greffage d'un anticorps anti IgG humain sur un monolithe hybride organique-inorganique dans un capillaire de 530  $\mu\text{m}$  d.i. dans le cadre du développement d'un immunoessai en sandwich couplé à l'ICP-MS [232], ce qui s'éloigne fortement d'une application en extraction sur phase solide telle que nous allons la mener. De plus, aucune information en termes de taux de greffage et de capacités n'y est expressément donnée.

Dans le présent chapitre, l'immobilisation d'anticorps a été envisagée après une étape d'activation au glutaraldéhyde sur des monolithes hybrides synthétisés *in situ* en capillaire pour ensuite coupler les immunoabsorbants miniaturisés (mIS) avec la nanoLC. Cette étude se focalise tout particulièrement sur la caractérisation complète des supports. Une attention toute particulière a été portée à l'évaluation de la répétabilité de la procédure d'immobilisation mais aussi d'extraction. Le succès de l'immobilisation a également été confirmé en évaluant le taux de greffage des anticorps ainsi que la capacité des supports. La réactivité croisée a été également évaluée avant d'envisager l'extraction de la molécule modèle choisie à partir d'échantillons complexes. Avant d'envisager l'extraction de molécules de haut poids moléculaire, telles que des protéines, ce projet s'est orienté vers l'extraction de molécules de faible poids moléculaire plus simples à analyser. L'analyse des protéines nécessite en effet le plus souvent une étape de digestion enzymatique et une détection par spectrométrie de masse complexes à mettre en œuvre à ce stade du projet. La molécule modèle choisie est la microcystine-LR (MC-LR), une molécule de petite taille qui sera décrite ci-après et dont les anticorps ont déjà fait l'objet de nombreuses caractérisations.

## 2 Une molécule modèle : la microcystine-LR

La microcystine-LR (MC-LR) est la molécule choisie comme modèle pour cette étude. Elle a fait l'objet d'un grand nombre d'études au LSABM [44, 297-299]. Elle fait partie de la famille des microcystines.

### 2.1 Origine

A certaines périodes de l'année et dans de nombreuses régions du globe, des efflorescences algales (en anglais « algal bloom », *i.e.* l'augmentation très rapide de la concentration en algues dans un système aquatique), peuvent souvent être observées dans les eaux douces utilisées pour produire de l'eau potable (après traitement) et des eaux d'aires récréatives (pour la baignade, voile, etc...). Ces « blooms » peuvent constituer un réel problème de santé publique dans la mesure où certaines espèces phytoplanctoniques, telles que les cyanobactéries, peuvent présenter une forte toxicité. Les cyanobactéries sont des microorganismes procaryotes dont la pigmentation est généralement de couleur bleu-verte, d'où leur dénomination en anglais « blue-green algae ». Elles peuvent produire différents types de toxines intracellulaires, appelées cyanotoxines, dont la nature chimique et le mode d'action sur les organismes vivants sont variables. Les principales sont des dermatotoxines, des neurotoxines et des hépatotoxines [300]. Les hépatotoxines regroupent la famille des microcystines (plus de 100 variantes identifiées à ce jour [301]) et les nodularines. Ces microcystines sont particulièrement dangereuses car celles-ci se retrouvent dans l'eau après la lyse cellulaire des cyanobactéries. Environ 70 souches de cyanobactéries toxiques ont été recensées [300]. Les microcystines en sont les toxines majoritaires et sont produites par de très nombreuses souches (plusieurs souches de genre *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*) [302-304]. Par ailleurs, environ 70% des blooms observés de par le monde sont toxiques et même majoritairement hépatotoxiques [300].

### 2.2 Structure

Les microcystines sont des heptapeptides monocycliques de faible masse moléculaire, comprise entre 800 et 1100 Daltons, et constituées de 5 acides aminés invariables et de 2 acides L-aminés variables. Leur structure générale est présentée en Figure 50. Les microcystines sont nommées en fonction de leurs acides L-aminés, notés X et Z en position 2 et 4 [305]. Par exemple, la molécule modèle choisie dans ce projet, la microcystine-LR, possède un groupement leucine (L) et un groupement arginine (R), tandis que la microcystine-RR (MC-RR), qui sera également étudiée, possède deux groupements arginine (R). Deux acides aminés inhabituels sont caractéristiques des microcystines : la N-méthyl-déhydroalanine (Mdha) en position 7 et l'acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-

triméthyl-10-phényl-4,6-diéniq (Adda) en position 5. La séquence des microcystines est la suivante : D-Ala<sup>1</sup>-L-X<sup>2</sup>-D-Masp<sup>3</sup>-L-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-Glu<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>. D et L représentent les formes dextrogyre et lévogyre des acides aminés. Ala représente l'alanine, Masp, l'acide méthyle aspartique et Glu, l'acide glutamique.

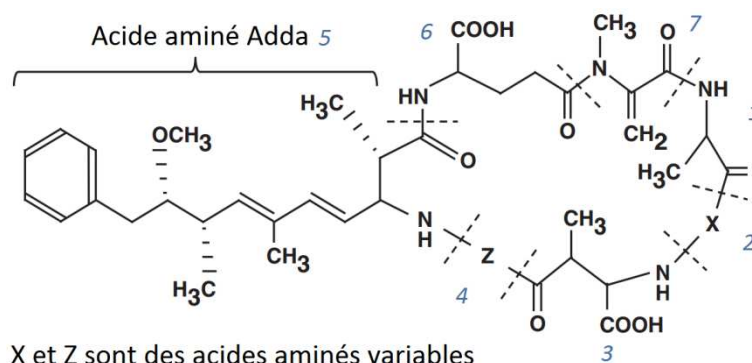


Figure 50 : Structure des microcystines. Adapté de [305]

C'est cette grande variabilité de structure qui est à l'origine du très grand nombre de variantes de microcystines identifiées à ce jour, la MC-LR restant la plus toxique.

## 2.3 Propriétés physico-chimiques

Les microcystines sont solubles dans l'eau. Une étude menée par Rivasseau et al au LSABM a montré que la solubilité de la MC-LR était supérieure à 1 g/L [297]. Elles sont physiquement et chimiquement stables [306] et peuvent persister dans l'eau des jours voire des semaines après un bloom [307]. Des études ont également montré que la MC-LR était stable dans l'eau dé-ionisée pendant 27 jours et qu'elle pouvait persister dans un réservoir d'eau stérile pendant 13 jours [308]. Les microcystines possèdent en générale deux fonctions de type acide carboxylique et, de par leurs groupements variables, peuvent posséder des groupements basiques. Leur état d'ionisation est donc variable d'une microcystine à une autre en fonction du pH [298]. Le pKa de la MC-LR serait ainsi égal à 3,3 et celui de la MC-RR à 3,4 [298]. D'autres études font référence à des valeurs de pKa de 2,09, 2,19 et 12,48 pour la MC-LR [309]. Des valeurs de coefficient de partage octanol-eau sont également disponibles dans la littérature. Une étude menée au LSABM a permis de mesurer un log P de 4,2 pour la MC-LR et de 4,4 pour la MC-RR à un pH de 7 [298] traduisant le caractère hydrophobe de ces molécules.

## 2.4 Toxicité

La toxicité des microcystines a largement été étudiée [301, 310]. Il est clairement établi que les microcystines induisent une toxicité ciblée sur les hépatocytes en s'accumulant dans celles-ci et

en provoquant ainsi des tumeurs. Des études réalisées sur des souris et des cellules de rats montrent clairement que les microcystines affectent principalement le foie [311-313]. Elles peuvent également affecter les reins et les intestins [314]. La bioaccumulation des microcystines a également été démontrée sur des moules et sur des poissons [315, 316], ainsi que sur leurs œufs [317]. La MC-LR est considérée comme la plus toxique des microcystines [301]. Elle peut causer des nécroses, des accumulations de sang dans le foie mais aussi des tumeurs et peut conduire à la mort [310]. La dose létale médiane ( $DL_{50}$ ) des microcystines varie entre 50  $\mu\text{g/kg}$  et 11  $\text{mg/kg}$ . La dose maximale de MC-LR administrée sans observation d'effets nocifs est de 40  $\mu\text{g/kg/jour}$  pour des souris, 100  $\mu\text{g/kg/jour}$  pour des cochons et 50  $\mu\text{g/kg/jour}$  chez le rat [301]. En se basant sur ces résultats et devant l'augmentation notable de la détection d'efflorescences toxiques au niveau mondial, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a fixé une consommation journalière maximale de 0,04  $\mu\text{g/kg/jour}$  pour l'homme en appliquant un facteur d'incertitude de 1000 sur les valeurs rapportées ci-avant pour différentes espèces [301]. Elle a également émis en 1999 une recommandation concernant la concentration maximale d'hépatotoxines dans les eaux. Une limite de 1  $\mu\text{g}$  en équivalent en MC-LR par litre d'eau potable a ainsi été fixée [301, 318]. Outre cette recommandation, l'Union Européenne a elle émis une directive réglementant uniquement la concentration en MC-LR dans les eaux potables, avec une concentration maximale admissible de 1  $\mu\text{g/L}$ . De ce fait des techniques d'analyses performantes et rapides pour son suivi dans les eaux sont nécessaires.

## 2.5 Extraction et analyse

Les microcystines sont majoritairement présentes dans le milieu intracellulaire des cyanobactéries avant d'être libérées dans le milieu aqueux environnant. Ainsi, la concentration d'un échantillon est le résultat de deux contributions : la concentration intracellulaire et la concentration dans le milieu extracellulaire [319]. Diverses méthodes permettant d'extraire les microcystines avant analyse doivent donc être développées.

### 2.5.1 Extraction et purification des échantillons

#### 2.5.1.1 Extraction des microcystines du milieu intracellulaire

Les microcystines sont des solutés moyennement polaires, divers mélanges de solvants relativement polaires peuvent être utilisés pour leur extraction du milieu intracellulaire. Le mélange butanol/méthanol/eau (5/20/75) est souvent rapporté car il est très utilisé classiquement, vu son aptitude à extraire des toxines appartenant à une large gamme de polarité. Ce mélange extrait correctement les microcystines mais le méthanol pur s'est révélé être d'une meilleure efficacité pour les variantes de microcystines LR, LY, LW et LF plus hydrophobes [320]. D'autres études mentionnent

uniquement un mélange d'eau et de méthanol pour extraire les microcystines du milieu intracellulaire. L'eau permet de solubiliser les microcystines les plus hydrophiles, tandis que le méthanol est nécessaire à l'extraction des microcystines hydrophobes, d'où le compromis avec des mélanges contenant 70 ou 75% de méthanol [319-321]. Un protocole simple et robuste expérimenté par Rivasseau et al [298] consiste, après filtration, à sécher le filtre à 40°C pendant 12 heures, le peser et le conserver à -20°C jusqu'à l'étape d'extraction. Les microcystines sont ensuite extraites, par deux fois avec du méthanol par simple trempage et agitation. Une dernière extraction est alors réalisée sous ultrasons avant la filtration et l'évaporation du solvant. C'est un protocole très proche qui a notamment été appliquée dans ce chapitre à l'extraction de la MC-LR à partir de culture de cyanobactéries (partie 5.1 en page 163).

#### 2.5.1.2 Extraction et purification des échantillons aqueux

Une purification ou préconcentration des toxines dans les échantillons d'eau environnementales est généralement nécessaires, puisque les toxines sont souvent présentes à l'état de traces dans ces milieux plus ou moins complexes. La plupart des étapes de purification et préconcentration utilisent des supports hydrophobes de type silices greffées octadécyles [319]. Leur utilisation est simple que ce soit pour le traitement d'extraits d'algues [322] ou d'eaux très contaminées [298]. Cependant des étapes plus sélectives peuvent être nécessaires. L'utilisation d'immunoabsorbants a permis d'obtenir une grande sélectivité par rapport aux supports conventionnels de type C18 [44, 323, 324] ou polymérique [325]. Kondo et al ont été les premiers à développer un immunoabsorbant anti-microcystine-LR à partir d'anticorps monoclonaux en 1996 [326]. Depuis d'autres études ont fait référence à l'immobilisation d'anticorps polyclonaux pour des applications en immunoextraction [44, 46]. Les supports utilisés pour le greffage des anticorps anti-microcystine sont principalement la sépharose [323-329] ou la silice [44, 46, 323] sous forme de particules conditionnées dans des cartouches de SPE. Les applications des immunoabsorbants ont été principalement réalisées sur des eaux de lac et des extraits cellulaires de cyanobactéries, mais aussi des extraits de poissons [301, 323, 328, 330].

#### 2.5.2 Méthodes séparatives et détection

De par leur hydrophobie et leurs propriétés acido-basiques, les microcystines sont principalement séparées par chromatographie liquide à polarité de phase inversée à l'aide de colonnes greffées C18 [319, 330]. Cette séparation est généralement suivie d'une détection UV car la majeure partie des microcystines possède un spectre UV similaire avec un maximum d'absorbance à 238 nm [330]. Cette détection est possible grâce au chromophore situé sur le groupement Adda commun aux microcystines (cf. Figure 50 en page 146) et permet d'atteindre des limites de détection inférieures à 1 µg/L. Cependant, du fait du faible nombre d'étalons disponibles et bien que ce type de

détection reste aujourd'hui très utilisé dans le cadre de l'analyse des microcystines, il ne permet pas toujours de différencier les différentes variantes de microcystines présentes dans un échantillon. C'est particulièrement le cas pour les variantes pour lesquelles aucun étalon n'est disponible, dont les temps de rétention ne sont pas connus et qui peuvent potentiellement être co-éluées avec d'autres variantes de microcystines de structure très proche [330]. Comme les microcystines ont des sensibilités similaires en UV, une concentration exprimée en équivalent de MC-LR peut alors être déterminées en quantifiant chacun des pics observées [330]. Pour accroître la sensibilité et la spécificité, le couplage de la LC avec la spectrométrie de masse peut être envisagé lorsqu'une identification précise de chaque variante est nécessaire. Cette méthode permet notamment de détecter chaque variante par l'indication de sa masse moléculaire, surtout dans le cas où aucun étalon n'est disponible [319, 330]. Des limites de détection beaucoup plus basses qu'en UV peuvent très généralement être obtenues ce qui augmente grandement la sensibilité [330].

### 3 Protocole expérimental

#### 3.1 Immobilisation des anticorps monoclonaux

Comme mentionné précédemment, il a été décidé de débiter cette étude de greffage de biomolécules par l'immobilisation d'anticorps monoclonaux de type MC10E7 dirigés contre la MC-LR. Ces anticorps ciblent les microcystines présentant une arginine en position 4 et s'avèrent être les anticorps les plus sensibles à la MC-LR [331]. Cette immobilisation a été envisagée sur des monolithes en capillaire présentant une perméabilité proche de celle référencée par Ma *et al* dans leur étude sur l'immobilisation de trypsine [269] et qui est de l'ordre de  $1,96 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ . Quatre capillaires dont la perméabilité moyenne est de  $2,23 \pm 0,15 \times 10^{-14} \text{ m}^2$  (C.V. = 6.6%,  $n = 4$ ) ont donc été utilisés dans cette partie pour immobiliser ces anticorps. Ces capillaires, dont la perméabilité a été présentée en Figure 45 (page 136), ont été synthétisés via la méthode de synthèse requérant de thermostatier le mélange réactionnel à 0°C avant remplissage du capillaire (cf. Chapitre 2). Ceux-ci seront nommés cap<sub>1</sub>, cap<sub>2</sub>, cap<sub>3</sub> et cap<sub>4</sub> dans la suite de ce chapitre.

La première étape du protocole consiste à activer les fonctions amines présentes à la surface interne du monolithe par du glutaraldéhyde pendant 16 heures (10% (w/w) dans du tampon phosphate 100 mM, pH 8,0). Cette étape permet d'obtenir une surface présentant les groupements aldéhyde nécessaires au greffage de biomolécules. Brièvement, les groupements aldéhyde sont capables de réagir avec les nombreuses fonctions amines présentes à la surface des anticorps (au niveau des résidus lysine et à l'extrémité N-terminale de chaque chaîne polypeptidique) et ainsi former une liaison covalente entre le support monolithique et l'anticorps. La stratégie adoptée consiste donc en une immobilisation covalente non orientée puisqu'aucun contrôle de la position du

groupement amine réagissant effectivement avec l'aldéhyde ne peut être réalisé. La longueur de chaque capillaire, initialement de 10 cm, a été réduite à 4,5 cm. Le capillaire cap<sub>1</sub> a, quant à lui, été découpé en deux capillaires plus courts (de 4,5 cm chacun). Les anticorps monoclonaux spécifiques de la MC-LR choisis pour être immobilisés sur le monolithe hybride à base de silice contenu dans ces capillaires de 45 mm de longueur ont été greffés en suivant la procédure illustrée en Figure 51.

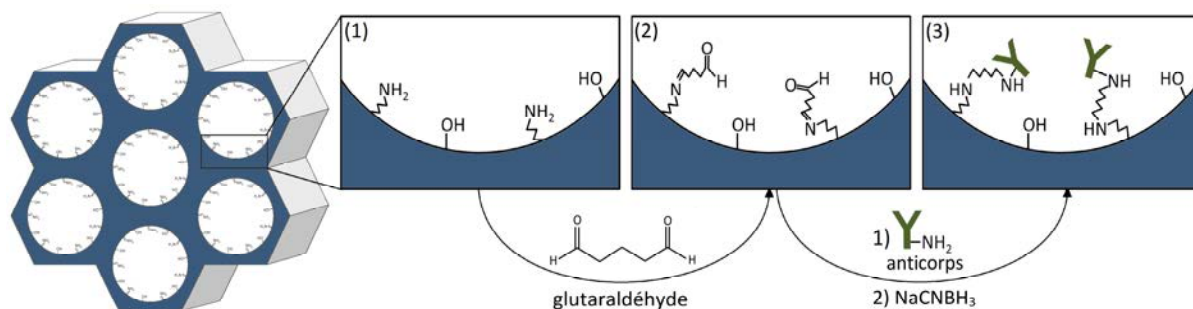


Figure 51 : Principe général du greffage d'anticorps monoclonaux sur le monolithe organique-inorganique synthétisé en capillaire.

Ainsi, 20  $\mu$ L d'une solution d'anticorps monoclonaux spécifiques de la MC-LR à 1 g/L a été percolée à travers le monolithe en capillaire préalablement activé (*i.e.* 20  $\mu$ g d'anticorps) pendant 24 heures à température ambiante. Le capillaire est ensuite rincé successivement avec du tampon PBS 10 mM (pH 7,4), du tampon Tris-HCl 0,5 mM (pH 8,0), de manière à désactiver les groupements aldéhyde n'ayant pas réagi, puis du tampon PBS contenant 0,1% de NaN<sub>3</sub> et 0,2 mg/mL de NaCNBH<sub>3</sub> de manière à réduire les imines formées en amines et stabiliser la liaison covalente de l'anticorps au monolithe. Cette procédure est plus largement détaillée en Annexe 3 en page 281. Cette même procédure a également été appliquée au deuxième fragment issu du capillaire cap<sub>1</sub> pour le greffage d'anticorps dirigés contre une autre molécule : l'ochratoxine A (OTA). Ces derniers ne présentent donc aucune affinité pour la MC-LR. Le lecteur est invité à se reporter au chapitre 4 pour plus de détails sur la structure et les propriétés de l'OTA. Quatre immunoabsorbants miniaturisés (mIS) dirigés contre la MC-LR (45 mm x 0,1 mm d.i.) ont ainsi été obtenus ainsi qu'un support contrôle consistant en un mIS dirigé contre l'OTA (45 mm x 0,1 mm d.i.). Ce deuxième support a donc été synthétisé de façon à contrôler la sélectivité de l'extraction.

Chaque immunoabsorbant miniaturisé (mIS) ainsi obtenu a ensuite été scellé par des bouchons en silicone et conservé dans du PBS contenant 0,1% de NaN<sub>3</sub> à 4°C dans un environnement humide de façon à éviter que la phase ne sèche avant utilisation.

### 3.2 Méthode d'analyse et étalonnage

Avant d'envisager le couplage des mIS avec la nanoLC-UV il a été nécessaire de développer une méthode d'analyse de la MC-LR. Devant la difficulté à utiliser un gradient avec la nano-pompe utilisée au début de ce projet de thèse (pompe DGP-3600M/FLM-3100, Dionex, cf. Annexe 2 en page

278) du fait de volumes morts trop importants retardant grandement l'arrivée du gradient en tête de colonne, une analyse en mode isocratique a été préférée et conservée par la suite pour les analyses réalisées avec d'autres nano-pompes. La phase mobile utilisée est ainsi composée d'eau/acétonitrile (60/40, v/v) et la colonne analytique est une Chromolith® CapRod® RP-18 (15 cm x 100 µm d.i., Merck). La détection a été réalisée grâce à un détecteur UV avec une cellule de détection de 3 nL à une longueur d'onde de 238 nm. Ces conditions ont été choisies de manière à pouvoir réaliser des analyses rapides ( $t_r \approx 6,4$  min pour la MC-LR) et à avoir un pic fin et une bonne limite de quantification ( $S/N = 10$ ) située autour de 80 ng/mL. Les gammes d'étalonnage ont été réalisées à chaque fois en connectant directement une nano-vanne comprenant une boucle d'injection de 150 nL à la nano-pompe analytique et à la colonne analytique de manière à réaliser des analyses directes en nanoLC-UV et pouvoir étalonner le système. Ces gammes ont été refaites plusieurs fois au cours de l'étude. Un exemple de chromatogramme obtenu et de courbe d'étalonnage est reporté en Figure 52.

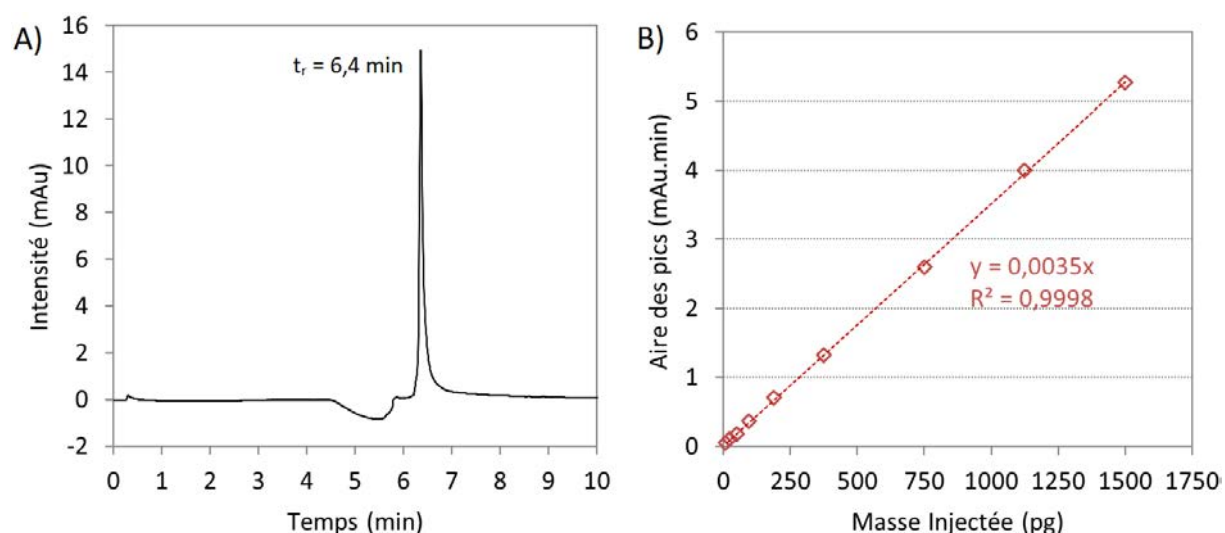


Figure 52 : A) Exemple de chromatogramme correspondant à l'analyse par nanoLC-UV de 150 nL d'eau pure dopée avec 375 pg de MC-LR ( $C^0 = 2,5$  µg/mL). B) Exemple de courbe d'étalonnage réalisée par analyse d'échantillons d'eau pure dopée à des concentrations croissantes de MC-LR par nanoLC-UV (238 nm).

### 3.3 Montage expérimental

Chaque mIS préparé a ensuite été intégré dans un montage permettant son couplage avec la nanoLC-UV. Le montage utilisé est schématisé en Figure 53. Celui-ci est constitué de deux nano-vannes six-voies. La première nano-vanne comprend une boucle d'injection de 150 nL et est reliée à une nano-pompe de préconcentration (nano-pompe 1) et à une deuxième nano-vanne. La deuxième nano-vanne est reliée, quant à elle, au mIS (4,5 cm x 100 µm d.i.), placé en lieu et place d'une boucle d'injection, à la colonne analytique et à une nano-pompe analytique (nano-pompe 2) délivrant la phase mobile nécessaire à la séparation chromatographique. L'ensemble des connexions ont été



réalisées au moyen de capillaires de très faible diamètre interne (20  $\mu\text{m}$  d.i.) de manière à minimiser au maximum les volumes morts du système.

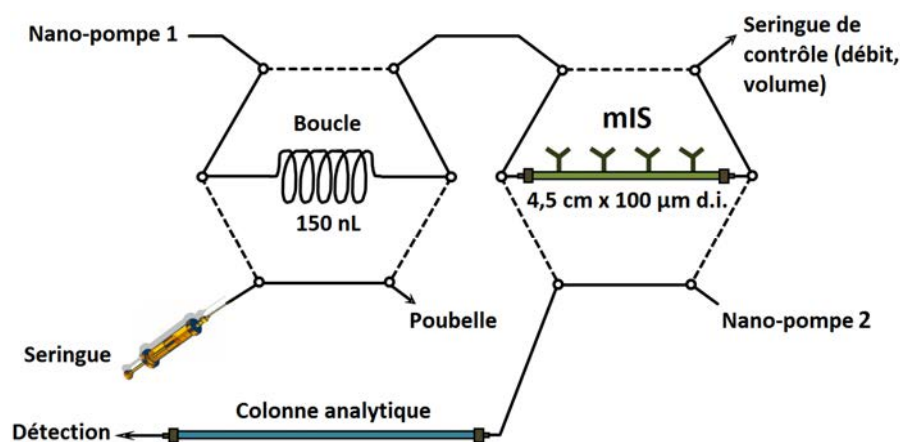


Figure 53 : Schéma du montage d'immunoextraction miniaturisée couplée à une analyse par nanoLC-UV ou LIF.

La nano-pompe 1 délivre le tampon nécessaire à l'étape de lavage à un débit fixé à 200 nL/min et permet de pousser l'échantillon depuis la boucle d'injection de 150 nL vers le mIS lors de l'étape de percolation. Les volumes morts dus aux connectiques entre la boucle d'injection et le mIS ont été évalués à environ 50 nL (16 cm x 20  $\mu\text{m}$  d.i.). De manière à ce que l'échantillon soit intégralement introduit dans le mIS il est donc nécessaire de pousser 200 nL de tampon (150 nL de la boucle d'injection + 50 nL de connectiques). Nous avons défini l'étape de lavage comme débutant dès que l'intégralité de l'échantillon se trouve être dans le mIS, *i.e.* une fois que l'échantillon a été poussé avec 200 nL de tampon. La percolation des volumes adéquats est à chaque fois contrôlée en sortie du mIS au moyen d'une seringue de 10  $\mu\text{L}$  sans piston présentant les graduations nécessaires au contrôle de faibles volumes. Après que le volume de tampon adéquat pour l'étape de lavage a été percolé au travers du mIS, la deuxième nano-vanne (nano-vanne 2) est basculée permettant ainsi à la phase mobile hydro-organique de passer au travers du mIS (débit = 300 nL/min) et rompre ainsi les interactions spécifiques entre l'analyte cible, dans ce cas la MC-LR, et son anticorps. L'analyte est alors transféré vers la colonne analytique puis le détecteur. Après chaque analyse *via* ce couplage mIS/nanoLC, les anticorps sont régénérés en percolant du tampon PBS 10 mM (pH 7,4) pendant au moins 1 heure à travers le mIS à 100 nL/min. Cette régénération est de l'ordre de 16 heures entre des injections menées sur deux jours différents.

## 4 Immunoextraction sélective en eau pure

La première étape de l'étude a été d'optimiser le protocole d'immunoextraction en ligne de la MC-LR en eau pure avant d'évaluer la répétabilité de la synthèse des mIS ainsi que le taux de greffage et la capacité des supports.

## 4.1 Essais préliminaires

Les premiers essais de couplage d'un mIS avec la nanoLC-UV ont eu pour but de déterminer la faisabilité du couplage en ligne tel que décrit dans la partie précédente.

Le couplage en ligne d'un support de SPE avec la LC implique en générale que la longueur et le volume mort de ce support soient bien inférieurs à la longueur et au volume de la colonne analytique utilisée pour l'étape de séparation chromatographique de manière à limiter les élargissements de pics. Or, comme mentionné dans la partie précédente, la longueur choisie pour les mIS (ou contrôle) est de 4,5 cm, c'est-à-dire une longueur seulement 3,3 fois moins élevée que la longueur de la colonne analytique pour un diamètre identique. Cette longueur a été choisie principalement pour des raisons techniques, l'utilisation d'une longueur moins importante étant rendue impossible par les ferrules et manchons utilisés pour connecter ces capillaires au montage présenté dans la partie précédente. D'autre part, une colonne trop courte aurait pu ne présenter qu'une très faible rétention, ce paramètre étant dépendant du taux de greffage, non connu à ce stade du projet. Outre l'élargissement de pic pouvant être causé par la longueur importante des mIS, l'utilisation d'un tampon lors de l'étape de lavage a aussi été vu comme une cause potentielle de difficulté. En effet, la crainte était de causer une précipitation de sels dans les capillaires lors du basculement de la seconde nano-vanne et arrivée de la phase mobile hydro-organique dans le mIS. L'ensemble de ces paramètres a donc été évalué dès les premières injections sur les mIS. Un exemple de chromatogramme résultant d'une préconcentration sur le mIS<sub>1</sub> d'eau pure dopée avec 1,25 µg/mL de MC-LR avec un volume de lavage de 1,8 µL de PBS 10 mM (pH 7,4) est reporté en Figure 54.

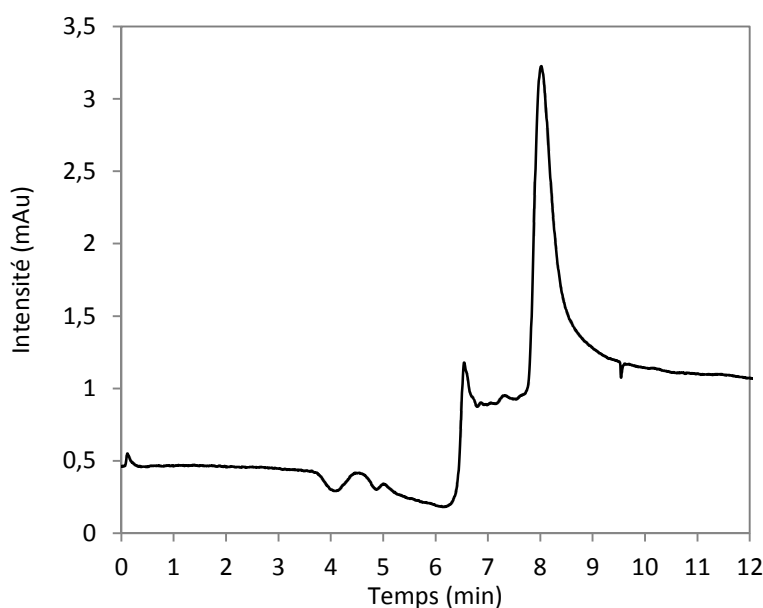


Figure 54 : Chromatogrammes correspondant à la percolation de 150 nL d'eau pure dopée à 1,25 µg/mL de MC-LR sur le mIS<sub>1</sub> (45 mm x 0,1 mm d.i.). Volume de lavage de PBS (10 mmol/L, pH 7,4) = 1,8 µL.

Il est visible que le couplage d'un mIS avec la nanoLC-UV entraîne un décalage du temps de rétention qui passe de 6,4 min pour les injections directes à 8,1 min une fois le mIS couplé du fait du volume plus grand du mIS comparé à la boucle d'injection utilisée pour les injections directes ( $\approx 280$  nL contre 150 nL respectivement) et du volume mort des capillaires de connexions entre le mIS et la nano-vanne. Ces volumes entraînent également un élargissement du pic et une diminution de sa hauteur. De ce fait la LOQ est augmentée à environ 130-150 ng/mL pour ce couplage. Cette LOQ est apparue malgré tout comme suffisante pour envisager une caractérisation des supports développés. En outre, l'ensemble des premières injections a montré que l'utilisation d'un tampon tel que le PBS pour l'étape de lavage n'entraîne pas de problèmes de précipitation lors du basculement de la deuxième nano-vanne, ce qui facilite de ce fait le couplage direct du mIS avec la nanoLC-UV.

## 4.2 Développement d'un protocole d'extraction sélective

Après ces essais préliminaires, le premier objectif a été de déterminer la nature et le volume du solvant de lavage nécessaire à l'élimination des interactions non spécifiques pouvant potentiellement se développer entre la MC-LR et le support de greffage ou les immunoglobulines en dehors du site de reconnaissance spécifique. De ce fait, de l'eau pure dopée à  $1,25 \mu\text{g/mL}$  de MC-LR a été injectée sur le mIS (boucle d'injection = 150 nL) en utilisant un tampon, le PBS (10 mM, pH 7,4), comme solvant de transfert puis de lavage. Il a été montré sur de nombreux immunoabsorbants conventionnels qu'un lavage avec un simple tampon pouvait suffire à l'élimination des composés interférents sans rompre l'interaction spécifique anticorps-antigène [11, 40]. Des volumes croissants de PBS ont de ce fait été percolés à travers le mIS à un débit de 200 nL/min avant de basculer la deuxième nano-vanne en position « *inject* » pour transférer l'analyte du mIS vers la colonne analytique afin de le détecter et de le quantifier. La quantité de MC-LR extraite a ensuite été déterminée en mesurant les aires des pics obtenues après cette étape et en utilisant les courbes d'étalonnage préalablement réalisées en connectant directement la boucle d'injection de 150 nL à la colonne analytique et à la nano-pompe analytique (nano-pompe n° 2) comme décrit précédemment. Connaissant la quantité initiale de MC-LR percolée, il est alors possible de calculer le rendement d'extraction. Pour estimer les interactions non spécifiques entre la MC-LR et le monolithe hybride organique-inorganique greffé par les anticorps, les mêmes expériences ont été réalisées en parallèle sur le support contrôle. Il est ainsi attendu que le contrôle (mIS constitué d'anticorps dirigés contre l'OTA) ne permette pas la rétention de la MC-LR malgré l'hydrophobie relative de cette molécule. Les rendements d'extraction de la MC-LR obtenus sur les deux supports en fonction du volume de PBS utilisé lors de l'étape de lavage préalable au basculement de la deuxième nano-vanne et transfert de la MC-LR vers la colonne analytique sont présentés en Figure 55.

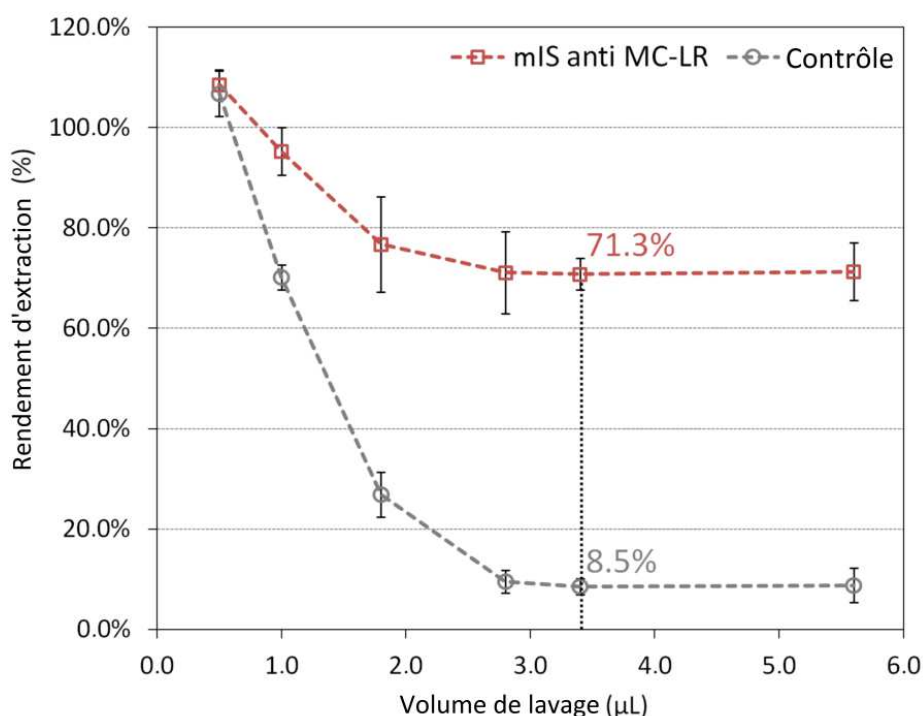


**Figure 55** : Comparaison des rendements d'extraction de la MC-LR sur un mIS (45 mm x 0,1 mm d.i.) spécifique de la MC-LR et sur un capillaire contrôle (mIS spécifique de l'ochratoxine A, 45 mm x 0,1 mm d.i.) en fonction du volume de lavage de PBS (10 mmol/L, pH 7,4). Percolation de 150 nL d'eau pure dopée à 1,25 μg/mL de MC-LR (n = 3).

Les profils obtenus en utilisant le mIS et le contrôle sont clairement différents. Les rendements d'extraction de la MC-LR sur le support contrôle chutent très rapidement à  $70,2\% \pm 2,4\%$  (n = 3) dès le passage d'un volume de lavage de 1,0 μL alors que la rétention sur le mIS ne diminue que très lentement avec un rendement d'extraction égal à  $95,3\% \pm 4,7\%$  (n = 3) avec ce même volume de lavage. Au-dessus d'un volume de lavage de 2,8 μL de PBS, correspondant à 10 fois le volume du mIS (en supposant une porosité d'environ 0,8 comme précédemment décrit pour des monolithes à base de silice [332]), presque aucune rétention de la MC-LR n'a été obtenue sur le contrôle (rendement inférieur à 9,5%), tandis que plus de 70% de la quantité initiale de MC-LR injectée est toujours retenue sur le mIS. Ce rendement d'extraction élevé reste constant jusqu'à un lavage effectué avec 20 volumes de capillaire (5,6 μL de PBS). Cette différence de rétention constitue une preuve de la spécificité du mIS pour la MC-LR. Ces résultats indiquent qu'un volume de lavage de PBS supérieur à 2,8 μL semble suffisant pour éliminer les interactions non-spécifiques résiduelles. L'étape de lavage étant réalisée à 200 nL/min, le choix d'un lavage avec 5,6 μL correspond à une durée de 28 minutes contre seulement 17 minutes avec 3,4 μL pour des performances équivalentes en termes de sélectivité. En conséquence, un volume de 3,4 μL de PBS a été retenu pour les expériences ultérieures. Dans ces conditions, des rendements d'extraction de  $71,3\% \pm 3,1\%$  (n = 3) de MC-LR sur le mIS contre seulement  $8,5\% \pm 1,6\%$  (n = 3) sur le contrôle sont obtenus (Figure 55). La sélectivité de la procédure d'extraction en eau pure s'avère donc très bonne. Les faibles écart-types indiquent également que la procédure d'immunoextraction présente une bonne répétabilité. Cette

sélectivité est notamment illustrée par les chromatogrammes de la Figure 56 qui compare deux percolations d'eau dopée à 1,25 µg/mL de MC-LR sur le mIS et sur le capillaire contrôle.

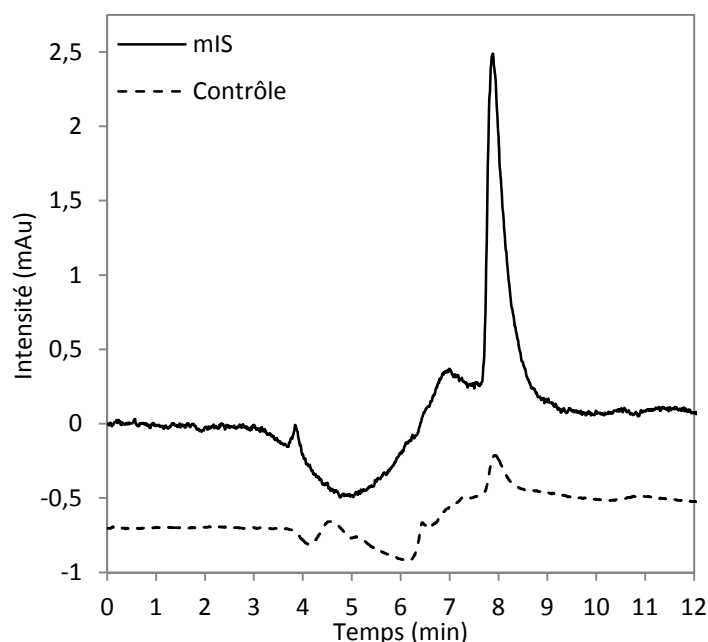


*Figure 56 : Chromatogrammes correspondant à la percolation de 150 nL d'eau pure dopée à 1,25 µg/mL de MC-LR sur un mIS (45 mm x 0,1 mm d.i.) spécifique de la MC-LR et sur un capillaire contrôle (mIS spécifique de l'ochratoxine A, 45 mm x 0,1 mm d.i.). Volume de lavage de PBS (10 mmol/L, pH 7,4) = 3,4 µL.*

Il est clairement visible que l'aire et la hauteur du pic sur le mIS sont bien plus importantes sur le mIS que sur le contrôle.

### 4.3 Evaluation de la répétabilité

Pour évaluer la répétabilité de la procédure d'immobilisation des anticorps sur les capillaires monolithiques, une procédure en tout point identique à celle appliquée sur cap<sub>1</sub> pour la préparation du premier mIS (mIS<sub>1</sub>) a été appliquée aux capillaires cap<sub>2</sub>, cap<sub>3</sub> et cap<sub>4</sub>. Les rendements d'extraction obtenus grâce à la procédure d'immunoextraction développée ci-avant sur le mIS<sub>1</sub> et impliquant un lavage avec 3,4 µL de PBS sont reportés en Figure 57 et comparés au rendement obtenu sur le mIS<sub>1</sub>. Des rendements de 70,4% ± 4,5%, 77,6% ± 15,4% et 79,4% ± 1,8% (n = 3) ont été respectivement obtenus sur le deuxième (mIS<sub>2</sub>), troisième (mIS<sub>3</sub>) et quatrième mIS (mIS<sub>4</sub>) lorsque des préconcentrations de 150 nL d'eau dopée à 1,25 µg/mL de MC-LR ont été réalisées. Les trois valeurs ainsi obtenues ne sont pas significativement différentes avec une valeur seuil α de 5%. En effet, une ANOVA réalisée sur l'ensemble des quatre groupes de données relatifs aux rendements d'extraction sur chacun des mIS renvoie une p-valeur égale à 0,48. Cette valeur est strictement plus grande que la valeur seuil de 0,05. La possibilité de greffer des anticorps sur un monolithe hybride organique-

inorganique en capillaire et d'appliquer une procédure d'extraction sélective répétable sur des supports indépendants a donc été démontrée avec la méthode que nous avons développée.

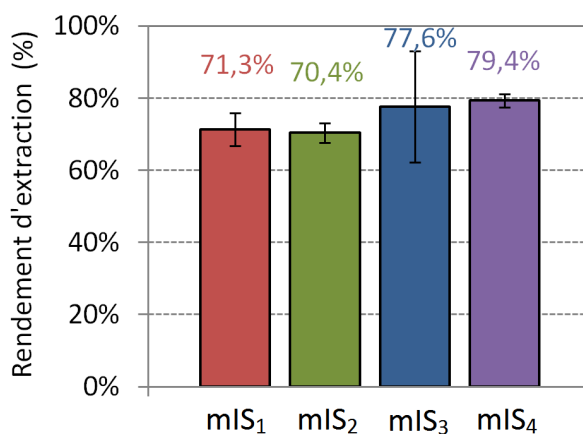


*Figure 57 : Répétabilité de la procédure d'immunoextraction sur quatre mIS (mIS<sub>1</sub>, mIS<sub>2</sub>, mIS<sub>3</sub> et mIS<sub>4</sub>) spécifiques de la MC-LR. Injection de 150 nL d'eau pure dopée à 1,25 µg/mL de MC-LR. Lavage avec 3,4 µL de PBS 10 mmol/L, pH 7,4 (n = 3).*

## 4.4 Détermination de la capacité et du taux de greffage

### 4.4.1 Capacité des mIS

Les hauts rendements obtenus laissent présager un greffage satisfaisant des anticorps mais ne permettent pas de savoir si les capacités et les taux de greffage sont similaires. De ce fait, l'ensemble des mIS synthétisés a ensuite été caractérisé en termes de capacité. Pour rappel, la capacité correspond à la quantité maximale de MC-LR pouvant être retenue par le mIS. Elle est donc directement liée au nombre d'anticorps greffés, actifs et accessibles à la surface des pores du monolithe. L'immobilisation covalente *via* une approche non orientée implique en effet, de par son caractère aléatoire, qu'une partie des anticorps greffés n'est pas active et donc disponible pour participer à la rétention de la MC-LR. Des échantillons d'eau pure (inj = 150 nL) dopés avec des quantités croissantes de MC-LR (de 23,4 pg à 1,5 ng) ont été préconcentrés en ligne à la fois sur les mIS et sur le support contrôle. Pour chaque point de concentration, trois réplicats ont été réalisés. Les courbes obtenues sont représentées en Figure 58.

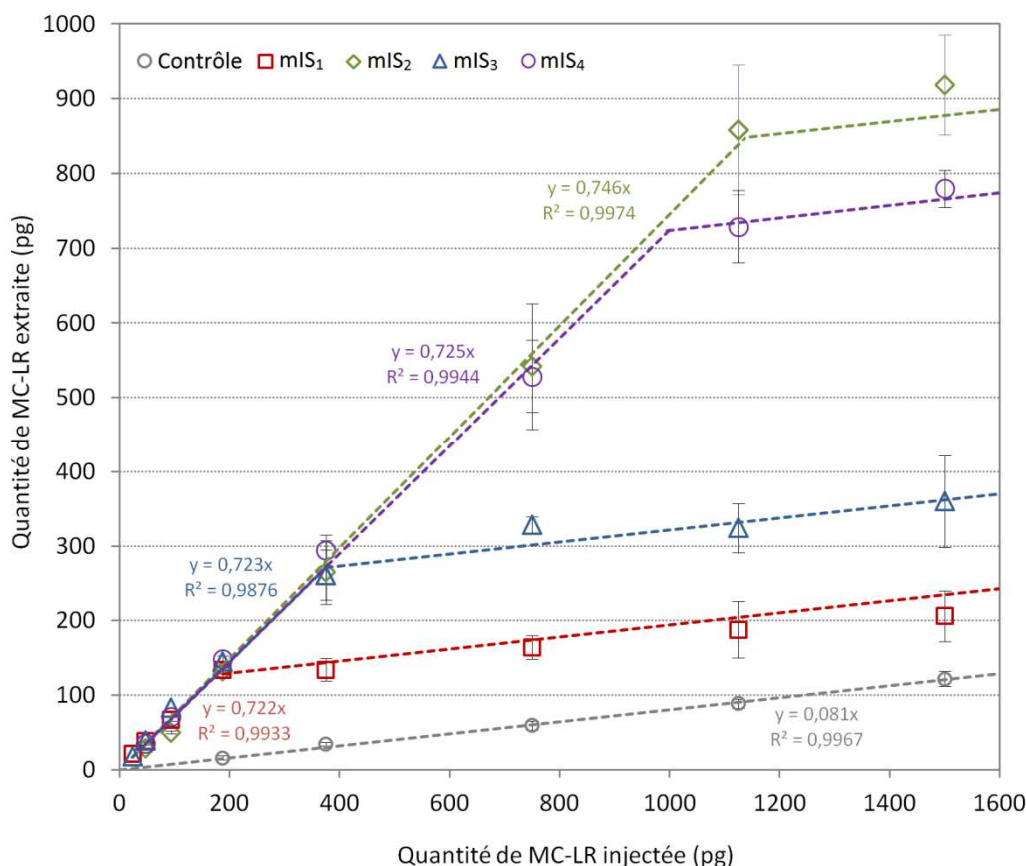


**Figure 58 :** Courbes obtenues en reportant la quantité de MC-LR retenue sur chacun des mIS et sur le support contrôle (mIS spécifique de l'ochratoxine A) après percolation de quantités croissantes de MC-LR (150 nL,  $n = 3$ ). Etape de lavage avec 3,4  $\mu$ L de PBS 10 mmol/L, pH 7,4.

La courbe obtenue sur le support contrôle présente une pente de 8,3% qui correspond au rendement de la MC-LR sur ce mIS contrôle. Ceci met à nouveau en lumière la faible contribution des interactions non spécifiques développées entre la MC-LR et le support contrôle greffé avec des anticorps dirigés contre une autre molécule. Ensuite, les courbes correspondant aux quatre mIS spécifiques de la MC-LR présentent, quant à elles, deux parties, une partie linéaire à pente forte suivie d'une rupture de pente et d'une partie linéaire à pente beaucoup plus faible. Il est visible que les premières parties des courbes d'étalonnage de chaque mIS présentent des pentes très similaires. Les pentes sur cette première partie correspondent à la valeur moyenne des rendements d'extraction qui restent constants entre 23,4 pg et la valeur de capacité à laquelle une rupture de pente est attendue. Dans cet intervalle, l'analyse qualitative est possible. Une pente moyenne de  $72,9\% \pm 1,1\%$  (C.V. = 1,6%) a été obtenue sur les quatre mIS. Ce résultat est cohérent avec les résultats de la Figure 57. Le C.V. très faible illustre à nouveau la grande répétabilité de la procédure d'extraction appliquée sur des mIS synthétisés indépendamment les uns des autres. La pente pour chaque mIS chute ensuite de manière similaire à environ 8% (pente similaire à celle observée sur le contrôle) ce qui correspond à la contribution des interactions non-spécifiques dans le procédé de rétention quand la capacité du mIS pour la MC-LR est dépassée. Il est visible cependant que la rupture de pente pour chacun des mIS intervient pour des quantités injectées de MC-LR différentes.

Ces ruptures de pente nous ont permis d'estimer les valeurs de capacité de chaque mIS. Ces valeurs sont répertoriées dans le Tableau 9.

**Tableau 9 :** Valeurs de capacités estimées pour 4 mIS, quantités d'anticorps immobilisés et densités volumétriques d'anticorps dans les capillaires correspondantes.

|                  | Capacité<br>(pg de MC-LR) | Q <sup>te</sup> d'anticorps<br>actifs (fmol) | Densité d'anticorps<br>(pmol/μL) |
|------------------|---------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------|
| mIS <sub>1</sub> | 188                       | 94                                           | 0,267                            |
| mIS <sub>2</sub> | 1125                      | 565                                          | 1,599                            |
| mIS <sub>3</sub> | 375                       | 188                                          | 0,543                            |
| mIS <sub>4</sub> | 1000                      | 502                                          | 1,422                            |

Des capacités de 188 pg, 1,125 ng, 375 pg et 1 ng ont été respectivement obtenues pour les mIS<sub>1</sub>, mIS<sub>2</sub>, mIS<sub>3</sub> et mIS<sub>4</sub>. Il existe donc un facteur 6 entre la capacité la plus faible (mIS<sub>1</sub>) et la capacité la plus élevée (mIS<sub>2</sub>). La grande variabilité observée trouve en partie son explication dans la grande difficulté rencontrée à pousser les solutions d'anticorps à un débit constant à ce stade du projet de thèse. En effet, tel que décrit en Annexe 3 en page 281, après activation d'un capillaire monolithique au glutaraldéhyde, le capillaire est connecté en sortie d'une boucle d'injection de 20 μL. Cette boucle est remplie d'une solution d'anticorps monoclonaux MC10E7. Après basculement de la vanne, une pompe de nanoLC permet de pousser cette solution au travers du capillaire pendant 24 h à un débit extrêmement faible (de l'ordre de 14 nL/min). Cependant, dans cette partie du projet, la seule pompe qui a pu être utilisée est une pompe à diviseur de débit et à débit rétrocontrôlé (Dionex, Ultimate 3000 DGP-3600M, cf. Annexe 2). Le bon contrôle du débit de cette pompe est grandement dépendant de la perte de charge du système connecté en sortie. Or, dans notre cas, une boucle d'injection de 20 μL avec un diamètre interne de 320 μm et une longueur de 25 cm entraîne une perte de charge importante pour le système. La vanne chargée de réguler le diviseur de débit se révèle alors rapidement ne plus pouvoir jouer correctement son rôle. Il s'est avéré que la nano-pompe rencontrait des difficultés à conserver un débit constant au cours du greffage. De plus, la percolation des anticorps dans les capillaires entraîne souvent une augmentation de la perte de charge qui influe grandement sur le débit. Le greffage étant réalisé sur 24 heures, le débit n'a pas pu être compensé manuellement pendant la nuit. En définitive, il semblerait que le débit de percolation des solutions d'anticorps ait un effet important sur le taux de greffage et donc sur la capacité. Malgré cette variabilité, la valeur minimale de capacité obtenue correspond à une concentration de MC-LR de 1,25 μg/mL pour un volume d'échantillon de 150 nL. Cette valeur est largement suffisante pour l'analyse de la MC-LR à l'état de traces et d'ultra-traces puisque les concentrations recherchées pour cette molécule sont généralement plutôt de l'ordre de quelques ng/mL.

Pour convertir ces valeurs en termes de quantité fixée par gramme de support, la masse du monolithe dans chaque capillaire a été estimée en pesant des capillaires de 15 cm de long avant et



après synthèse *in situ* d'un monolithe hybride à base de silice et rinçage. Elle a ainsi été évaluée à environ  $40 \pm 5,4 \mu\text{g}/\text{cm}$  ( $n = 4$ ) menant à des capacités respectivement de  $6,3 \mu\text{g}/\text{g}$ ,  $5,6 \mu\text{g}/\text{g}$ ,  $2,1 \mu\text{g}/\text{g}$  et  $1,1 \mu\text{g}/\text{g}$  pour les mIS<sub>1</sub>, mIS<sub>2</sub>, mIS<sub>3</sub> et mIS<sub>4</sub>. Pour des IS à base de particules de silices conditionnés au format cartouche, des valeurs allant de quelques nanogrammes à quelques microgrammes par gramme de support ont été rapportées dans la littérature [11]. Des valeurs comprises entre  $0,45 \mu\text{g}/\text{g}$  et  $1,35 \mu\text{g}/\text{g}$  ont en effet été rapportées par J. Lawrence et al pour des IS anti MC-LR à base de silice [46]. Deux études menées au LSABM avaient en outre permis d'aboutir à des capacités de  $1,8 \mu\text{g}/\text{g}$  de silice [297] et  $7,5 \mu\text{g}/\text{g}$  de silice [333]. En conséquence, ces valeurs de capacité obtenues pour ces formats miniaturisés sont en totale adéquation avec les valeurs de capacité obtenues en format macroscopique. De plus, ces valeurs de capacité illustrent également l'intérêt d'une approche monolithique par rapport à une approche par simple fonctionnalisation de la surface interne d'un capillaire et greffage d'anticorps. En effet, en recouvrant uniquement la surface interne d'un capillaire ( $70 \text{ cm} \times 250 \mu\text{m}$  i.d.) avec de l'APTES, l'organosilane utilisé dans notre synthèse, et greffage ultérieur d'anticorps spécifiques de la fluoxétine, Queiroz et al [239] ont réussi à obtenir une capacité égale à  $0,92 \text{ pmol}$  correspondant à  $0,46 \text{ pmol}$  d'anticorps actifs et accessibles à la surface de leur support. Ceci conduit à une densité volumétrique d'anticorps actifs de  $0,013 \text{ pmol}/\mu\text{L}$  dans le capillaire. Avec la méthode développée dans ce projet de thèse en greffant des anticorps à la surface d'un monolithe préparé à partir de TEOS et d'APTES en capillaire ( $4,5 \text{ cm} \times 100 \mu\text{m}$  i.d.) nous avons obtenu des densités volumétriques allant de  $0,267 \text{ pmol}/\mu\text{L}$  d'anticorps actifs à  $1,599 \text{ pmol}/\mu\text{L}$  d'anticorps actifs, soit des valeurs de 20 à 120 fois plus élevées que celles résultant d'une simple immobilisation des anticorps à la surface d'un capillaire de silice fondue (Tableau 9).

#### 4.4.2 Evaluation du taux de greffage

Outre la capacité des supports donnant accès aux nombres d'anticorps actifs, il a également été envisagé de mesurer la quantité totale d'anticorps greffés. Cette mesure a été réalisée indirectement en dosant les anticorps restants dans les différentes solutions utilisées pour le greffage (solution d'anticorps + solutions de rinçage ultérieures au greffage). Ce dosage a été réalisé en utilisant la méthode BCA (*Bicinchoninic acid Assay*). La procédure détaillée est décrite en Annexe 5 en page 289. Ce test consiste en un dosage colorimétrique des protéines basé sur l'acide bicinchoninique. Les protéines réduisent l'ion cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique est un réactif colorigène hautement spécifique du  $\text{Cu}^+$ , qui forme un complexe pourpre. Il est alors possible de mesurer cette absorbance par spectrophotométrie et de quantifier les protéines présentes dans une solution après avoir réalisé une gamme d'étalonnage. Les anticorps étant des molécules onéreuses et disponibles en faible quantité, la gamme d'étalonnage a été réalisée avec la BSA (*Bovin Serum Albumin*) qui est un étalon très utilisé pour ce type de dosage. Un point de contrôle ne nécessitant que  $10 \mu\text{L}$  de solution d'anticorps ( $1 \text{ g}/\text{L}$ ) a été réalisé en duplicat pour s'assurer que l'utilisation de la gamme d'étalonnage avec la BSA permettait bien de quantifier

les anticorps présents dans le milieu considéré. La moyenne obtenue pour ces deux points de contrôle initialement à une concentration connue théorique de 1 g/L renvoie une valeur à 1,16 g/L soit 116% de la valeur théorique. Cette valeur semble acceptable au vu de la précision de ce type de quantification par spectrophotométrie. Il a donc été décidé d'utiliser la gamme d'étalonnage de la BSA pour quantifier les anticorps présents dans les solutions issues de la procédure de greffage sur un capillaire de dimensions 4,5 cm x 100 µm d.i. . Ce capillaire ne correspond à aucun des quatre mIS présentés jusqu'à maintenant. De plus, le greffage a été réalisé cette fois grâce à une pompe au débit parfaitement maîtrisé (Ultimate 3000 RSLC Nano, Thermo Scientific, cf. Annexe 2). Deux solutions sont récupérées : la première solution (phase 1) correspond à la solution d'anticorps percolée et à une première phase de rinçage au PBS, la deuxième solution (phase 2) correspond quant à elle aux solutions de rinçage au tampon Tris-HCl et au tampon PBS-azoture + NaCNBH<sub>3</sub>. Ces solutions sont évaporées puis reprise dans un volume connu d'eau avant dosage. Les résultats ont montré qu'aucun anticorps n'est retrouvé dans les solutions de rinçage succédant à la phase de greffage proprement dite. La quantité retrouvée dans la phase 1 est de 18,6 µg ce qui permet de calculer une quantité greffée de 1,4 µg. Ceci conduit à un taux de greffage de 7,0%. Si l'on considère que la gamme d'étalonnage au BSA entraîne une légère surestimation de la concentration en anticorps dans les solutions il est possible que ce taux de greffage soit même légèrement plus important. En utilisant ce taux de greffage, il est donc possible de calculer que si 1,4 µg d'anticorps sont immobilisés au sein du capillaire (4,5 cm x 100 µm d.i.), environ 9,3 pmol d'anticorps sont effectivement greffés sur le monolithe. Ceci permet de calculer une densité volumétrique d'anticorps dans le capillaire de 26,4 pmol/µL. Avec les valeurs de capacités rapportées dans la partie précédente, il est ainsi possible d'estimer que la quantité d'anticorps actif représente de 1% à 6% de la quantité totale greffée à la surface du monolithe. Ce faible ratio résulte certainement d'une immobilisation non orientée des anticorps. De ce fait, nombre d'entre eux sont immobilisés dans une conformation qui dénature ou rend inaccessible les sites de liaison aux antigènes.

## 4.5 Réactivité croisée

La spécificité des mIS pour la MC-LR a également été évaluée. En effet, il a été montré dans diverses études que l'anticorps anti MC-LR utilisé dans cette étude (MC10E7) présente une réactivité croisée pour d'autres types de microcystines présentant une arginine (R) en position 4 [331, 334-336]. La liaison de l'anticorps MC10E7 s'avère de plus très spécifique. De ce fait, cet anticorps ne peut pas reconnaître les microcystines ne présentant pas le résidu arginine en position 4 et ni l'acide aminé Adda commun à toutes les microcystines. Cette propriété a notamment été évaluée sur des IS préparés par greffage de cet anticorps sur des particules de silice conditionnées en cartouche au cours d'une étude réalisée au LSABM [337] en amont de ce projet de thèse. Une forte affinité de ces IS a été soulignée pour les microcystines-LR, YR, RR, HtyR et HilR qui ont pu être extraites avec de

bons rendements tandis que les microcystines-LA, LY, LW et LF n'étaient pas retenues lors de la percolation.

Pour évaluer la réactivité croisée des mIS, des préconcentrations de microcystine-RR (MC-RR), un analogue structural de la MC-LR présentant une arginine en position 4 ont été effectuées sur le mIS<sub>2</sub> (4,5 cm x 100 µm d.i.) en appliquant le protocole de lavage développé en partie 4.2 en page 154. Les résultats de ces préconcentrations sont présentés en Figure 59. En parallèle, des injections ont également été réalisées sur un capillaire non greffé et non traité au glutaraldéhyde de façon à évaluer le comportement de la MC-RR sur ce support contrôle dans les conditions d'immunoextraction appliquée.

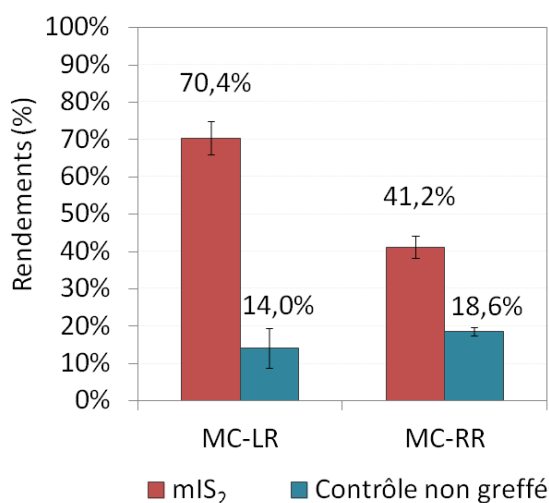


*Figure 59 : Evaluation de la spécificité d'un mIS (mIS<sub>2</sub>, 4,5 cm x 100 µm d.i.) anti MC-LR par injection d'un analogue structural de la MC-LR : la microcystine-RR (MC-RR). Comparaison des injections avec un support contrôle non greffé. Injection de 150 nL d'eau pure dopée à 1,25 µg/mL de MC-LR ou MC-RR. Lavage avec 3,4 µL de PBS 10 mmol/L, pH 7,4 (n = 3).*

Il est visible tout d'abord que le rendement d'extraction de la MC-RR sur le mIS<sub>2</sub> est de 41,2%  $\pm$  2,9% contre un rendement de 18,6%  $\pm$  1,1% sur le support contrôle. Ceci met en lumière une légère affinité du mIS pour la MC-RR du fait de la réactivité croisée. Ensuite, le rendement de 41,2% sur le mIS est inférieur au rendement observé pour la MC-LR et déjà rapporté précédemment et qui est de 70,4%  $\pm$  4,5%. Ceci semble corrélérer avec les résultats obtenus sur des IS en cartouche [337]. En effet, bien que présentant une très bonne affinité vis-à-vis de la MC-RR, le rendement d'extraction après élution de la MC-RR de l'IS à base de silice s'est toujours avéré inférieur à celui de la MC-LR. Ce rendement était de l'ordre de 80% pour la MC-RR contre 100% pour la MC-LR. Ces observations vont bien dans le sens d'une affinité moins forte de l'anticorps MC10E7 pour la MC-RR. Il est à noter que la rétention de la MC-LR sur le support contrôle est cette fois de 14,0%  $\pm$  5,3%, valeur non significativement différente de la valeur obtenue sur le support contrôle préparé précédemment en greffant des anticorps anti-OTA et qui était de 8,5%  $\pm$  1,6% ( $p > 0,05$ , t-test). Cela semble prouver que les immunoglobulines ne développent pas d'interactions non spécifiques en dehors du site de reconnaissance et permettent en plus de limiter les interactions non spécifiques pouvant être

générées par le support lui-même. La rétention légèrement plus forte de la MC-RR sur le support contrôle dans les conditions utilisées provient certainement de sa plus forte hydrophobie à un pH de 7. Comme déjà évoqué des log P de 4,2 et 4,4 ont été déterminés respectivement pour la MC-LR et pour la MC-RR à un pH de 7 [298], pH proche du pH de travail dans notre étude qui est de 7,4 lors de l'étape de lavage avec le tampon PBS utilisé. Par ailleurs, le temps de rétention de la MC-RR en phase inverse dans les conditions d'analyse utilisées s'est avéré être plus élevé que celui de la MC-LR ( $6,57 \pm 0,15$  min contre  $6,32 \pm 0,06$  min respectivement,  $n = 6$ ) confirmant la plus grande hydrophobie de la MC-RR. Il est donc plausible qu'un même volume de lavage renvoie une rétention légèrement plus forte de la MC-RR sur le monolithe contrôle.

## 5 Application à des échantillons réels

Après l'optimisation de l'étape de lavage après percolation d'un échantillon d'eau pure dopée présentée dans la partie précédente, le potentiel des mIS à extraire la MC-LR à partir d'échantillons complexes a été considéré. Pour cela, deux types de matrices correspondants aux matrices dans lesquelles la MC-LR et les microcystines peuvent être recherchées ont été choisies : des extraits du milieu intracellulaire de cyanobactéries et des eaux environnementales régulièrement contaminées par les microcystines.

### 5.1 Immunoextraction à partir d'extraits de cyanobactéries

La première matrice considérée consiste en des extraits complexes issus de cultures de cyanobactéries (algues bleu-vertes). La souche de cyanobactérie choisie est la *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Cette souche produit plusieurs composés bioactifs, principalement la MC-LR [338]. Après culture, la MC-LR a été extraite en suivant une procédure consistant en une extraction au méthanol, une évaporation d'un volume connu d'extrait et redissolution dans un volume d'eau cinquante fois plus grand. Ce protocole d'extraction est détaillé en Annexe 7. L'échantillon complexe ainsi obtenu est nommé 2% PCC 7806. Cet échantillon non dopé a été injecté sur la colonne analytique via la boucle de 150 nL mais aussi préconcentré et purifié sur le mIS<sub>3</sub> couplé à la nanoLC-UV. Les chromatogrammes résultants sont comparés en Figure 60 avec des chromatogrammes correspondant à l'injection directe d'eau pure dopée avec la MC-LR et d'eau pure non dopée (ces derniers étant reportés pour permettre des comparaisons avec la ligne de base inhérente au couplage en ligne et au système utilisé).

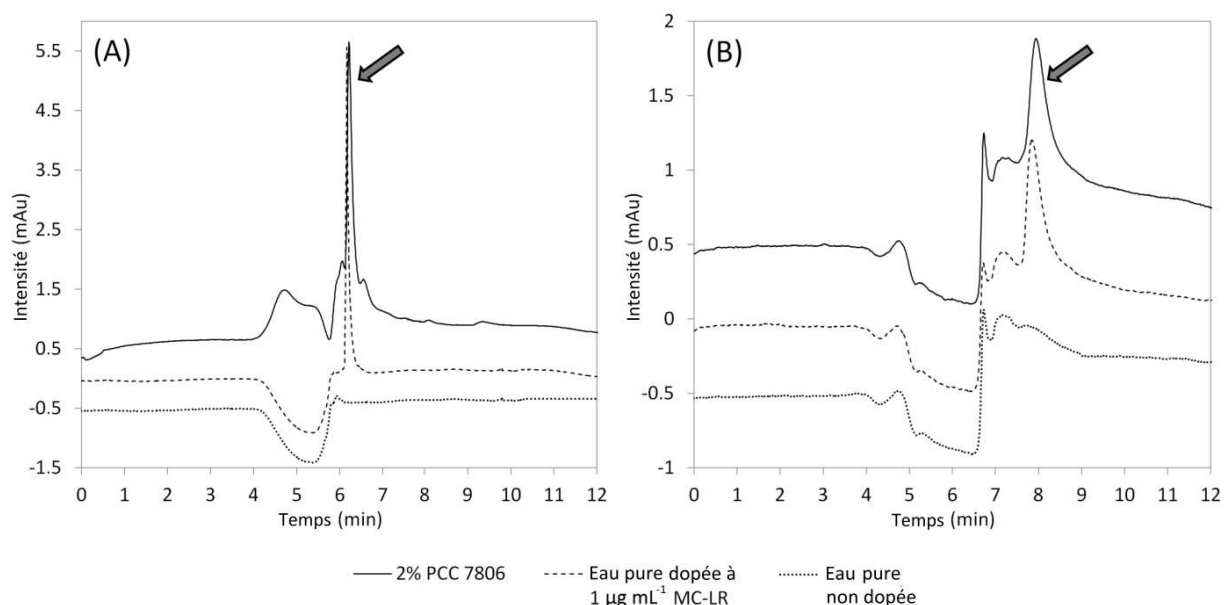


**Figure 60 :** Chromatogrammes correspondant à l'analyse d'extraits de cyanobactéries (2% PCC 7806), d'eau pure dopée à  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  et d'eau pure non dopée : (A) injection directe sur la colonne analytique ; (B) immunoextraction couplée en ligne avec la nanoLC-UV

Le chromatogramme correspondant à l'injection directe de l'échantillon 2% PCC 7806 (Figure 60-A) indique que de nombreux composés interférents sont co-élus avec la MC-LR lorsque ce chromatogramme est comparé à une injection d'eau pure dopée. Cette co-élution rend la quantification de la MC-LR très difficile. A l'inverse, la comparaison entre une injection d'eau pure non dopée et une préconcentration de l'échantillon 2% PCC 7806 sur le mIS confirme qu'aucune co-extraction et donc aucune co-élution ne se produit lorsqu'un mIS couplé en ligne à la nanoLC-UV est utilisé (Figure 60-B). De plus, le temps de rétention de la MC-LR est apparu comme étant hautement répétable et similaire aux temps de rétention observé dans l'eau pure. En effet, une valeur de  $7,95 \pm 0,03$  min (C.V = 0,33%, n = 6) a été obtenue pour l'échantillon 2% PCC 7806 comparé à une valeur de  $7,92 \pm 0,05$  min (C.V = 0,66%, n = 6) avec une injection d'eau pure dopée à  $1 \mu\text{g/mL}$  de MC-LR. Les aires de pic se sont également révélées très répétables avec une valeur de  $0,357 \pm 0,009$  mAu.min (C.V = 2,51%, n = 6). Tous ces résultats indiquent que la MC-LR contenue dans les extraits non dopés est retenue efficacement sur le mIS avec une haute répétabilité. Cette forte répétabilité, combinée à la bonne répétabilité de la synthèse du mIS, pourrait rendre la quantification de la MC-LR possible dans des échantillons réels à l'échelle micro comme c'est déjà le cas pour les immunoabsorbants en cartouche. En considérant un rendement d'extraction de 72,3% correspondant à la pente de la courbe d'étalonnage établie en Figure 58 en page 158, les aires de pics évoquées permettent de calculer une concentration de  $0,94 \mu\text{g/mL} \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$  (n = 6, C.V. = 2,51 %) de MC-LR dans l'échantillon (valeur inférieure à la capacité du mIS<sub>3</sub>). Cette méthode ne tient cependant pas compte de l'effet potentiellement négatif des nombreux composés interférents présents dans l'échantillon sur la rétention de la MC-LR par son anticorps.

Pour évaluer les pertes potentielles de MC-LR au cours des étapes de percolation et de lavage, il a tout d'abord été envisagé en parallèle des injections présentées ci-avant de brancher en sortie du mIS<sub>3</sub> un détecteur UV avec une cellule de détection de 3 nL de façon à enregistrer le signal à 238 nm en sortie de ce dernier avant basculement de la deuxième nano-vanne. L'enregistrement du signal UV débute dès l'injection (*i.e.* basculement de la première nano-vanne). Le schéma du montage ainsi que les signaux correspondant à la préconcentration des échantillons 2% PCC 7806, eau dopée à 1 µg/mL MC-LR et d'eau pure sont rassemblées en Figure 61. Le volume des connectiques entre la sortie du mIS<sub>3</sub> et la cellule de détection a été évalué à environ 400 nL. En négligeant la diffusion longitudinale, il est donc possible d'estimer qu'un échantillon percolé au travers du mIS arrivera au niveau de la cellule de détection après une durée d'enregistrement d'environ 3 min 40 sec à un débit de 200 nL/min. Ce temps tient compte du volume entre la boucle d'injection et le mIS (50 nL), du volume interstitiel du mIS (environ 280 nL) et du volume des connectiques en sortie du mIS (400 nL). Une fois l'échantillon passé (150 nL, soit 45 secondes), débute l'étape de lavage. Le début de cette étape est repérée par un trait rouge sur la Figure 61.

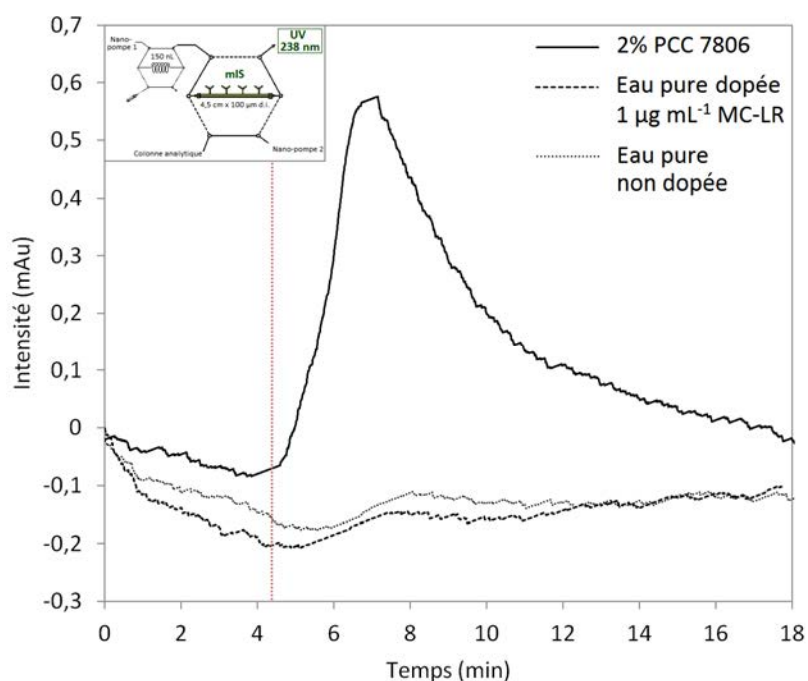


**Figure 61 :** Signal UV à 238 nm enregistré en sortie du mIS<sub>3</sub> lors d'injections de 150 nL d'échantillons puis lavage du mIS par 3,4 µL de PBS (10 mM, pH 7,4). Injection de : Extrait d'algues 2% PCC 7806, Eau pure dopée 1 µg mL<sup>-1</sup> MC-LR et eau pure non dopée. Préconcentration et lavage réalisée à 200 nL/min. Le trait en pointillé rouge correspond à l'arrivée des composés élués lors de l'étape de lavage au niveau de la cellule de détection (3 nL) en tenant compte des volumes morts des connectiques.

Il est visible que les signaux enregistrés pour les échantillons purs dopés ou non dopés présente un signal qui n'évolue que très peu et ne présente aucun pic. Concernant l'étape de percolation, il peut être tout d'abord déduit de la Figure 55 en page 155 qu'environ 100% de la MC-LR injectée dans l'eau pure est retenue sur le mIS<sub>1</sub> au cours de cette étape. Ceci semble être confirmé

en Figure 61 puisqu'aucune augmentation de signal n'est observée à 3 min 40 sec. Le signal de l'échantillon 2% PCC 7806 en sortie du mIS<sub>3</sub> présente par ailleurs un profil similaire à celui des eaux pures dopées et non dopées avant 4 min 25 sec ce qui semble indiquer que la MC-LR est bien retenue sur le mIS au cours de la percolation de cet échantillon complexe. Concernant l'étape de lavage, il a également été montré en Figure 55 qu'une légère chute d'environ 25% de MC-LR se produit sur le mIS lors du lavage entre un volume de PBS percolé compris entre 0 et 2,8  $\mu\text{L}$  ce qui correspond ici à un temps compris entre 4 min 25 sec et 18 min 25 sec. Cet intervalle est trop large pour qu'une différence entre l'eau pure non dopée et dopée soit observée. Par contre, dans le cas de l'extrait d'algues 2% PCC 7806, un large pic est observé sur le signal UV enregistré après injection. Ce pic intense correspond aux interférents de la matrice retenus par interactions non spécifiques et éliminés du mIS au cours de l'étape de lavage. Le profil obtenu rejoint les résultats de la Figure 55 en page 155 qui montrait que sur le contrôle les interactions non spécifiques étaient éliminées principalement entre des volumes de lavage compris entre 0 et 2  $\mu\text{L}$ , c'est-à-dire à des temps compris ici entre 4 min 25 sec et 14 min 25 sec. Cependant, bien que l'enregistrement du signal UV par analyse frontale au cours de l'étape de lavage nous apporte des informations sur l'élimination de composés au cours de cette étape, il n'est pas possible d'affirmer avec certitude qu'aucune perte de MC-LR plus importante que pour les échantillons purs n'a lieu.

De façon à confirmer l'absence d'effets de matrice, une détermination de la concentration en MC-LR dans l'échantillon 2% PCC 7806 a été envisagée en appliquant la méthode des ajouts dosés. Pour ce faire, des préconcentrations ont été cette fois effectuées sur le mIS<sub>4</sub>. Trois ajouts de concentrations croissantes ont été considérés : 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  et 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Pour chaque niveau de concentration, trois préconcentrations ont été réalisées sur le mIS<sub>4</sub>/nanoLC-UV. En appliquant un rendement moyen de 72,5 % correspondant à la pente de la courbe d'étalonnage reportée en Figure 58 pour le mIS<sub>4</sub> une concentration de  $0,93 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$  ( $n = 3$ , C.V = 4,5 %) peut être calculée avec les aires de pics résultant des trois injections de l'échantillon sans ajout (0  $\mu\text{g/mL}$ ). Cette concentration est similaire à la concentration mesurée sur le mIS<sub>3</sub> par la même méthode. La Figure 62 représente les aires de pics obtenus en fonction de la concentration de l'ajout. La régression linéaire sur les points expérimentaux y est représentée en bleu et les hyperboles de confiance sur cette régression en pointillés rouges. La droite représentée en pointillés noirs représentent la regression sur les points expérimentaux forcée par le point de coordonnées (-0,93 ; 0).

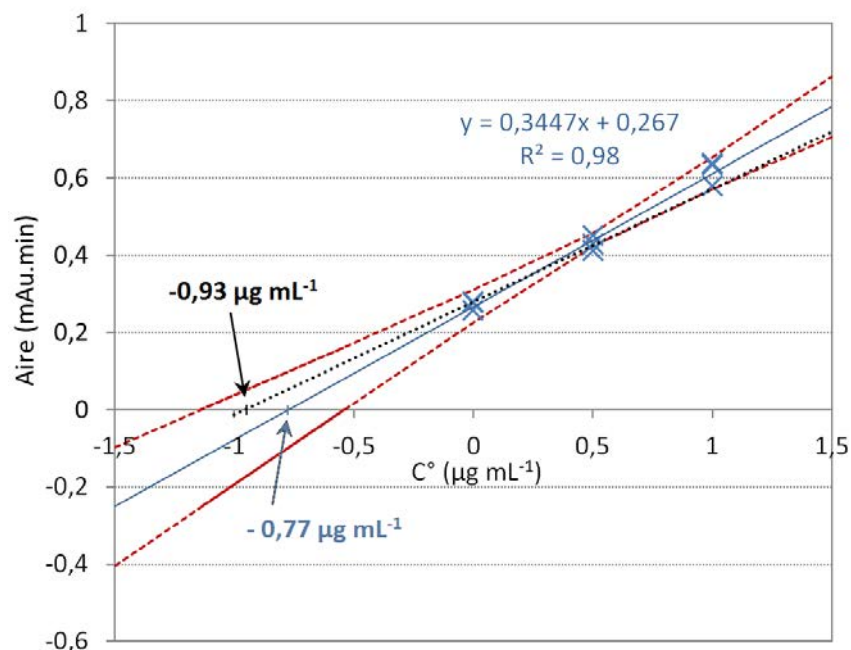


Figure 62 : Ajouts dosés sur un extrait de cyanobactéries (2% PCC 7806). Injection de 150 nL sur le mIS<sub>4</sub> couplé à la nanoLC-UV. Ajouts : 0, 0,5 et 1,0 µg/mL de MC-LR. Etape de lavage avec 3,4 µL de PBS 10 mM (pH 7,4). En bleu : droite de régression. Pointillés rouges : hyperboles de confiance avec un risque  $\alpha$  de 5%. Pointillés noirs : droite de régression forcée par le point (-0,93 ; 0).

La méthode des ajouts dosés appliquée en Figure 62 permet par extrapolation de mesurer une concentration de 0,77 µg/mL de MC-LR dans l'échantillon 2% PCC 7806. L'intervalle de confiance déterminé grâce aux hyperboles de confiance de la droite de régression avec un risque de première espèce  $\alpha$  de 5% est 0,54 µg/mL – 1,14 µg/mL. Cet intervalle large est principalement le fait de la variabilité des mesures lors d'injections sur le mIS, l'écart-type sur le rendement d'extraction pouvant être supérieur à 10% comme il est visible en Figure 57. Il est surtout visible que la concentration mesurée en utilisant la courbe d'étalonnage réalisée en eau pure se trouve dans l'intervalle de confiance déterminé par la méthode des ajouts dosés. Il semblerait donc que l'effet de la matrice de cet échantillon sur la rétention de la MC-LR soit faible.

De ce fait, tout ce système constitue un outil très puissant de purification et de préconcentration de la MC-LR à partir d'échantillons complexes en amont d'une analyse par nanoLC-UV.

## 5.2 Immunoextraction à partir d'eaux environnementales

Pour finaliser cette preuve de principe nous avons également envisagé l'extraction de la MC-LR à partir d'eaux environnementales. Il a été mentionné que les microcystines pouvaient être libérées dans des eaux stagnantes par des cyanobactéries (par lyse cellulaire notamment) et que l'OMS ainsi que l'Union Européenne avaient fixé une valeur de référence de 1 µg/mL en équivalent



de MC-LR. A ce stade du projet, seul un couplage avec un détecteur UV était envisageable. Avec ce type de détection, la limite de quantification s'est avérée être de l'ordre de 130-150 ng/mL une fois le couplage avec le mIS réalisé comme déjà évoqué. De ce fait, des eaux environnementales ont été en premier lieu dopées avec la MC-LR pour en évaluer la purification avec un mIS couplé à la nanoLC-UV.

Deux matrices ont été choisies et prélevées sur site au cours de ce projet : l'eau d'un lac situé à Viry-Châtillon en Ile de France, lieu d'implantation d'une base nautique, et un échantillon d'eau de Seine prélevée à proximité de ce même lac. Ce lac est issu d'une carrière de sable désaffectée. Il est relié à la Seine par un canal contrôlé par un barrage et a une surface de 810 ha. Ce lac a été choisi car il s'agit d'un lac eutrophe, c'est-à-dire peu profond et présentant une concentration en nutriment élevée propice au développement d'algues du fait notamment d'un temps de résidence de l'eau important. Ce temps de résidence est ainsi d'une demi-année [339]. Il a par ailleurs fait l'objet de nombreuses études relatives aux cyanobactéries et aux microcystines [339-341]. Les prélèvements ont été réalisés dans le courant du mois de novembre 2012. Une étude a montré que la concentration en microcystines en équivalent de MC-LR était la plus élevée aux mois d'octobre et novembre avec des concentrations respectives de 34,5 µg et 23,0 µg equiv. MC-LR/L (enregistré en 2001) [339]. Cette matrice peut donc bien être représentative des matrices environnementales dans lesquelles des chimistes analytiques peuvent être amené à rechercher la MC-LR ou d'autres microcystines.

Ainsi, des échantillons d'eau de lac, d'eau de Seine mais aussi d'eau pure dopés à trois concentrations (200, 300 et 500 ng/mL, *i.e.* 30, 45, 75 pg avec une boucle d'injection de 150 nL) de MC-LR ont été injectés directement sur la colonne analytique mais aussi sur le mIS<sub>3</sub> couplé à la nanoLC-UV. Un volume de lavage de 3,4 µL au PBS a été utilisé dans ce dernier cas, comme précédemment. Les chromatogrammes correspondants aux différentes matrices dopées avec 75 pg de MC-LR sont comparés en Figure 63. Les chromatogrammes correspondant à l'injection directe des eaux de lac et de Seine (Figure 63-A) mettent en évidence la présence de nombreux composés interférents lorsque ceux-ci sont comparés avec le chromatogramme d'eau pure dopée. Les temps de rétention ne sont pas affectés, ils sont respectivement de 6,13 min dans l'eau pure et de 6,07 min dans l'eau de lac et l'eau de Seine. Un pic intense est co-élué avec la MC-LR dans l'échantillon d'eau de Seine, ce qui gêne la quantification de la MC-LR. De façon similaire, un pic intense autour de 5,6 min est co-élué avec le pic de la MC-LR dans le cas de l'échantillon d'eau de lac. Un deuxième pic dont le maximum se situe autour de 6,9 min est également co-élué avec la MC-LR dans cette matrice (visible par la déformation du pic en Figure 63). L'ensemble de ces éléments rendent la quantification de la MC-LR difficile. A l'inverse, lorsque le mIS<sub>3</sub> a été couplé avec la nanoLC et les mêmes injections réalisées sur ce système avec un volume de lavage de 3,4 µL du mIS avec du PBS, il est clairement visible en Figure 63-B que les pics obtenus sont très similaires et ce quelle que soit la matrice considérée et sont surtout très similaires au pic correspondant à une injection d'eau pure dopée. Les temps de rétention sont extrêmement répétables quelle que soit la matrice. Dans ce cas, un temps

de rétention moyen sur les trois matrices de  $7,88 \pm 0,1$  min (C.V = 0,1%, n = 3) a été obtenu. Ces chromatogrammes montrent que la très grande majorité des composés interférents ont été éliminés grâce au fort pouvoir purifiant du mIS et que la MC-LR a bien été extraite des différents échantillons.

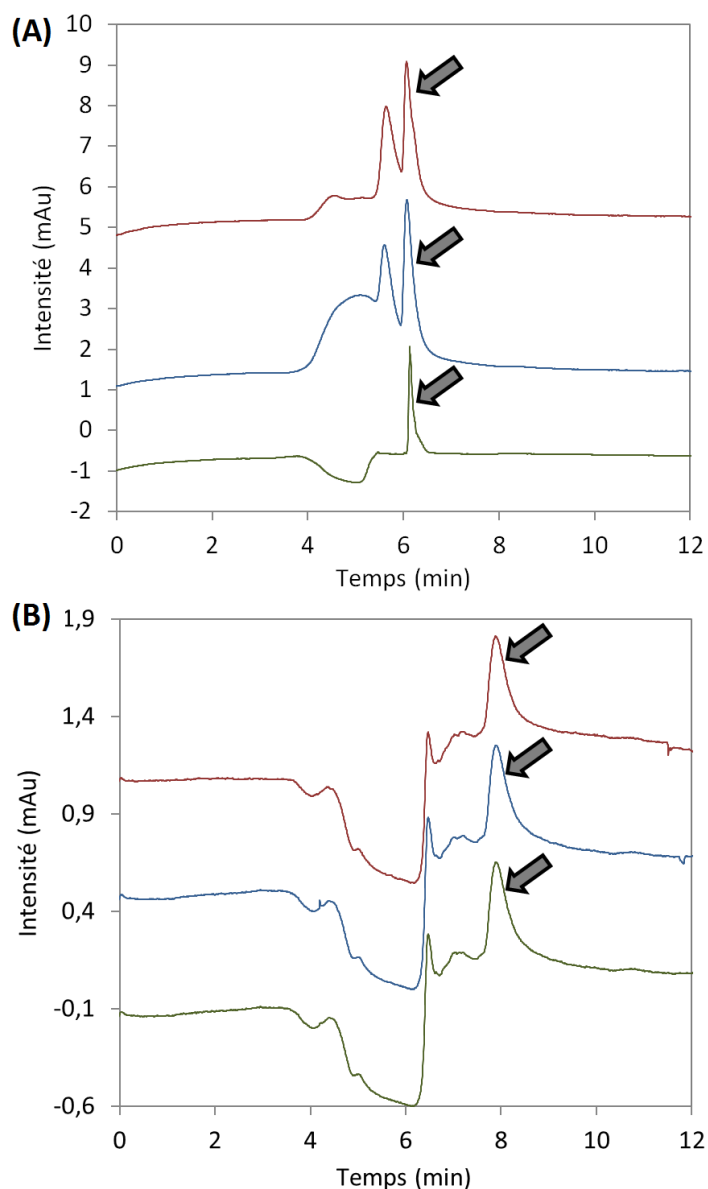


**Figure 63 :** Chromatogrammes correspondant à des préconcentrations d'eaux dopées à  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  MC-LR. Volume d'injection = 150 nL. Eaux dopées : eau pure, eau de Seine, eau de lac. (A) Injection directe en nanoLC-UV. (B) Injection sur mIS<sub>3</sub>/nanoLC-UV.

En outre, en comparant les chromatogrammes correspondant aux échantillons d'eau pure et d'eaux environnementales, principalement d'eau de Seine, il peut être constaté en Figure 63–A que l'aire du pic semble être largement affectée par la matrice lors d'une injection directe en nanoLC-UV. Pour évaluer ce point, les courbes correspondant aux aires de pics obtenues pour les trois concentrations considérées en fonction de la concentration en MC-LR sont tracées en Figure 64. Les injections effectuées directement en nanoLC et sur le système mIS/nanoLC-UV y sont comparées. Les

droites issues des régressions linéaires sont tracées à titre indicatif de manière à pouvoir comparer facilement la tendance des aires de pics. Il est visible que les injections directes en nanoLC entraînent une augmentation de l'aire des pics par rapport à des injections d'eau pure, augmentation qui est particulièrement intense dans le cas de la matrice « eau de Seine ». En effet, une pente moyenne de 0,0012 a été obtenue dans le cas de l'eau de Seine contre seulement 0,0005 dans le cas de l'eau pure, soit 2,4 fois inférieure. Dans le cas de l'eau de lac, la co-élution avec le pic situé à 6,9 min augmente particulièrement lorsque la concentration augmente ce qui ne permet plus de différencier les deux pics et augmente particulièrement l'aire du pic de la MC-LR à 500 ng/mL. A l'inverse, quand une purification des échantillons est réalisée sur le mIS<sub>3</sub> avant analyse par nanoLC-UV, il est clairement visible en Figure 64-B que les pentes des aires de pics obtenus en fonction de la concentration ne sont pas différentes. Exprimées en rendement, connaissant la quantité de MC-LR dopée, ces pentes sont de 73,1% dans l'eau pure, 73,3% dans l'eau de lac et enfin de 71,9% dans l'eau de Seine. Ces rendements sont cohérents avec les pentes et rendements obtenus précédemment sur le mIS<sub>3</sub> en Figure 58 pour des niveaux de dopage inférieurs à la capacité, pente qui était de 72,3% dans l'eau pure.

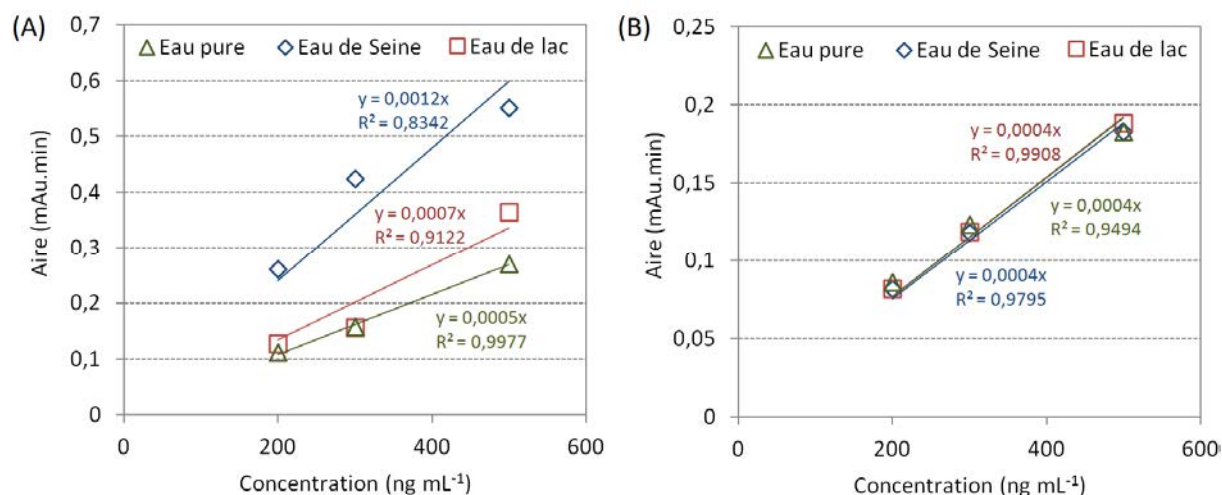


Figure 64 : Comparaison des aires de pics en fonction de la concentration. (A) Injection directe en nanoLC-UV. (B) Injection sur mIS<sub>3</sub>/nanoLC-UV.

Les niveaux de concentration étudiés sont cependant très élevés au regard de la valeur seuil de 1 ng/mL. De manière à essayer d'atteindre cette limite réglementaire, il a été envisagé de concentrer un échantillon d'eau de lac avant injection sur le mIS<sub>4</sub> couplé à la nanoLC. La limite de quantification étant située autour de 130-150 ng/mL, nous avons essayé d'atteindre une concentration théorique de 200 ng/mL. Un échantillon d'eau de lac a été dopé à une concentration de 1 ng/mL de façon à être sûr d'y trouver de la MC-LR. Pour atteindre une concentration de 200 ng/mL, 4 mL de cet échantillon ont été évaporés sous azote. Lorsque quelques centaines de microlitres seulement subsistent dans le flacon, l'échantillon est réintroduit dans un insert puis remis sous évaporation. Une fois complètement évaporé, l'échantillon est repris dans 20 µL d'eau pure. Ce

protocole s'est avéré fastidieux, du fait de la grande difficulté à évaporer un volume d'eau aussi important. En outre, lors de la reprise dans 20  $\mu\text{L}$  d'eau, une partie des sels n'ont pu être totalement solubilisés. Malgré ces difficultés, l'échantillon a été injecté sur la colonne analytique pour analyse directe par nanoLC-UV et sur le mIS<sub>4</sub> couplé à la nanoLC-UV. Les chromatogrammes correspondant aux injections directes en nanoLC-UV et sur le mIS<sub>4</sub> de l'échantillon d'eau de lac dopé à 1 ng/mL MC-LR (concentré 200 fois par évaporation) sont reportés en Figure 65.

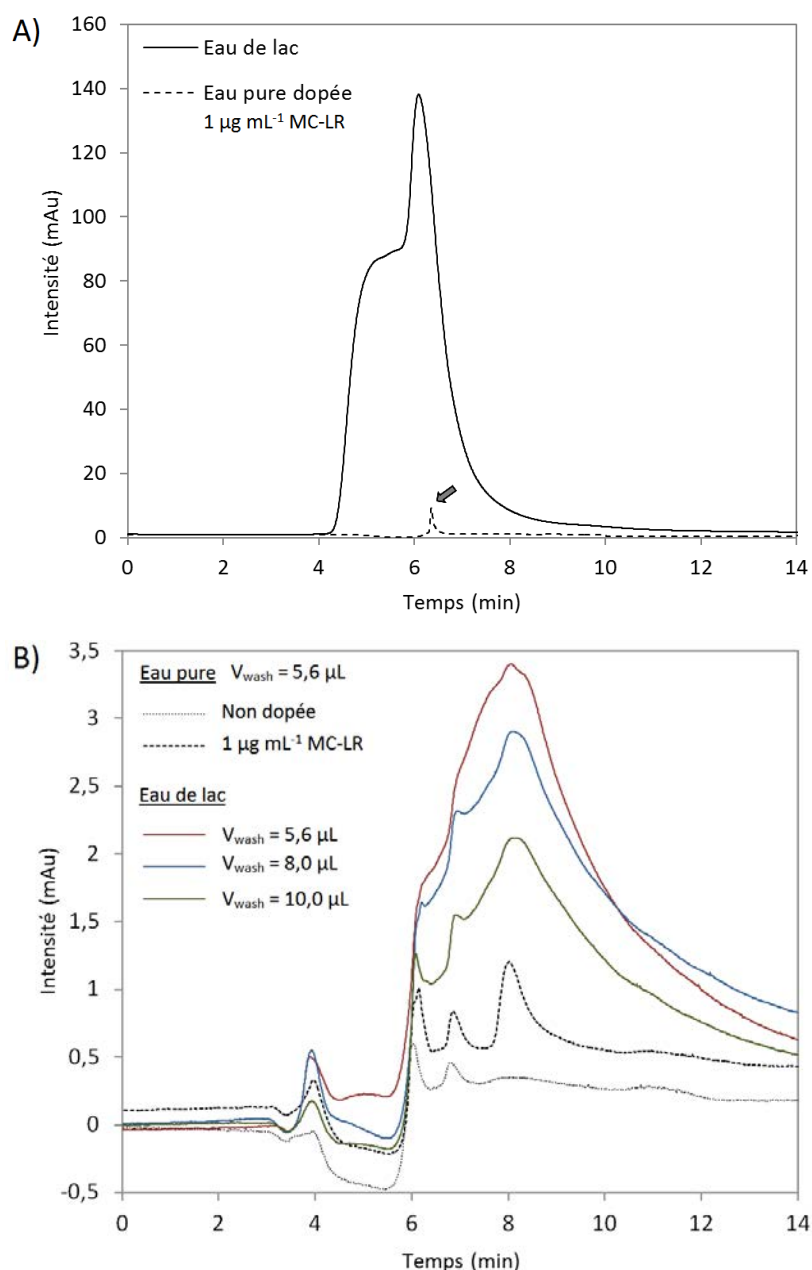


**Figure 65 :** Chromatogrammes correspondant à l'injection d'un échantillon d'eau de lac dopé à 1 ng/mL MC-LR concentré 200 fois : A) Injection directe en nanoLC-UV. B) Injection sur le mIS<sub>4</sub> couplé à la nanoLC-UV, différents volumes de lavage ( $V_{\text{wash}}$ ) testés : 5,6  $\mu\text{L}$ , 8,0  $\mu\text{L}$  et 10,0  $\mu\text{L}$ . Comparaison avec les chromatogrammes issus de l'injection d'eau pure non dopée et dopée à 1  $\mu\text{g/mL}$  MC-LR avec un volume de lavage ( $V_{\text{wash}}$ ) au PBS 10 mM (pH 7,4) de 5,6  $\mu\text{L}$ .

Il est visible en Figure 65-A que l'échantillon d'eau de lac dopé à 1 ng/mL MC-LR présente un pic très large et surtout extrêmement intense entre des temps de rétention de 4 et 10 min. La hauteur de ce pic est de l'ordre de 140 mAu, *i.e.* de l'ordre de 18 fois plus intense que le pic correspondant à l'injection d'eau pure dopée à 1 µg/mL ayant lui une hauteur d'environ 7,8 mAu et reporté sur le même chromatogramme. Cette intensité traduit le grand nombre de composés interférents préconcentrés par évaporation dans la matrice considérée. Cette concentration très importante des composants de la matrice a rendu plus difficile leur élimination complète et un accroissement du volume de lavage a été nécessaire. Plusieurs volumes de lavage ont ainsi été envisagés. Nous avons vu en Figure 55 que la MC-LR initialement dans l'eau pure était toujours retenue sur le mIS après un volume de lavage de 5,6 µL, du fait de la grande affinité de l'anticorps pour cette molécule et des conditions de lavage (dans du tampon physiologique) qui favorise fortement le maintien de cette interaction tant qu'aucun solvant organique ou changement de pH n'est appliqué. Il est visible en Figure 65-B que le mIS a permis une très forte purification de l'échantillon avec un lavage avec 5,6 µL de PBS, l'intensité du pic correspondant aux composants de la matrice étant diminué approximativement d'un facteur 40. Malgré cette forte purification, la limite du système est clairement atteinte avec une simple détection UV. En effet, un lavage de 5,6 µL n'est pas suffisant pour éliminer la totalité des interférents, un pic large dont le maximum se situe à un temps de 8,02 min pouvant toujours être observé. Ce temps de rétention très proche du temps de rétention de la MC-LR dans l'eau pure qui est de 7,94 min laisse suspecter malgré tout la présence de MC-LR. De ce fait deux autres injections du même échantillon concentré ont été réalisées sur le mIS<sub>4</sub> avec cette fois des conditions de lavage plus fortes avec un volume de 8,0 µL de PBS et 10,0 µL de PBS. Il est visible que ces conditions améliorent encore le lavage et semble confirmer la présence de MC-LR. Des conditions de lavage encore améliorées pourraient peut-être permettre d'atteindre une purification plus poussée. Cependant, avec une étape de percolation et lavage réalisée à 200 nL/min, un volume de lavage de 10 µL correspond à une durée pour cette étape de 50 min ce qui semble très long, une fois ajouté aux heures nécessaires à l'évaporation de l'échantillon.

Au vu de ces derniers essais il est évident qu'un couplage avec la spectrométrie de masse est indispensable de manière à pouvoir utiliser les mIS développés pour la quantification de la MC-LR à des concentrations très faibles. La présence de sels dans la phase de lavage, incompatible avec un couplage direct avec la spectrométrie de masse, pourrait être contournée en évaluant une étape de lavage à l'eau plutôt qu'avec un tampon. Enfin, une séparation en mode gradient pourrait permettre également d'améliorer la limite de quantification et surtout de séparer la MC-LR des quelques composés interférents toujours présents après purification d'échantillons très complexes sur le mIS.

## 6 Régénération et réutilisation

La stabilité des mIS s'est révélée très satisfaisante. Lors de chaque analyse, le temps de contact du mIS avec la phase mobile hydro-organique a été réduite à seulement quelques minutes en rebasculant la nano-vanne n°2 après la durée nécessaire au transfert de la MC-LR du mIS vers la colonne analytique de manière à limiter la dénaturation des anticorps. Devant la difficulté à déconnecter les mIS du montage utilisé et du fait du risque d'endommager les capillaires, ceux-ci n'ont pas été déconnectés après chaque injection. Leur régénération a été réalisée en percolant à chaque fois au minimum 6  $\mu$ L de tampon PBS à 100 nL/min pendant une durée minimale de 1 heure après des injections dans l'eau pure. Après des injections d'échantillons réels, une durée de régénération de 2 heures (12  $\mu$ L de PBS) a été appliquée. Des études menées au LSABM sur des IS à base de particules de silice conditionnées en cartouche ont montrées qu'une régénération des IS pendant 24 heures dans du PBS était normalement nécessaire pour récupérer 100 % de la capacité du support [342]. Chamieh *et al* ont par ailleurs montré qu'une régénération de 2 heures pouvait permettre une utilisation répétée d'un IS couplé en ligne à la CE après une exposition limitée à du méthanol [69]. Dans le cas des mIS, les durées et les conditions de régénération sus-citées ont permis de récupérer une rétention suffisante de la MC-LR dans la majeure partie des cas. Même si une durée de régénération de 24 heures n'a pas systématiquement été appliquée, il a été possible de travailler avec une capacité moindre qui s'est avérée malgré tout suffisante pour les concentrations les plus faibles. Seule l'estimation des capacités de chaque mIS a impliquée l'utilisation de temps de régénération plus important d'au moins 16 heures pour les points de concentration les plus élevés. Lorsque les mIS ont été déconnectés, ils ont été scellés puis conservés dans du tampon PBS 10 mM contenant 0,1% d'azide à 4°C. Au final, en comptant les injections d'eau non dopée (servant de blanc), d'eau pure dopée et d'échantillons réels plus de 40 injections ont pu être réalisées sur les mIS<sub>1</sub> et mIS<sub>4</sub>, 35 sur le mIS<sub>2</sub> et 50 sur le mIS<sub>3</sub> avant qu'une perte de rétention de la MC-LR ne soit observée. Cette perte de rétention a notamment été observée par une forte diminution des aires de pics obtenus sur les mIS<sub>3</sub> et mIS<sub>4</sub> après injections respectivement de 15 et 10 échantillons réels. Tous ces éléments prouvent que les outils développés dans ce projet de thèse s'avèrent stables dans les conditions d'utilisation que nous avons utilisé (échantillon pur, extraits d'algues aqueux et extraits d'eaux environnementales) et peuvent être réutilisés un grand nombre de fois.

## 7 Transposition à d'autres molécules

La transposition du protocole développé a été explorée en utilisant le support contrôle utilisé au début de ce chapitre et consistant en un mIS préparé à partir d'anticorps dirigés contre l'ochratoxine A (OTA), une mycotoxine. Cette molécule peut être détectée par fluorescence. De

façon à évaluer la transposition à d'autres molécules de la méthode développée avec la MC-LR, le détecteur UV précédemment utilisé pour la détection de la MC-LR a été remplacé par un détecteur à fluorescence induite par laser (LIF) de manière à pouvoir cette fois détecter l'OTA. La colonne analytique utilisée reste inchangée et est toujours une colonne Chromolith® CapRod® RP18 (15 cm x 100 µm d.i.). La phase mobile utilisée dans cette étude est constituée d'eau/acétonitrile (20/80, v/v). Une gamme d'étalonnage a tout d'abord été réalisée comme précédemment pour la MC-LR en supprimant la deuxième nano-vanne et en connectant directement la première nano-vanne liée à la boucle d'injection (150 nL) à la nano-pompe analytique et à la colonne analytique. Ensuite, le mIS anti OTA (4,5 cm x 100 µm d.i.) utilisé préalablement comme support contrôle a été introduit dans le montage d'immunoextraction en ligne en lieu et place des mIS anti MC-LR. Des préconcentrations d'eau pure dopée avec l'OTA à une concentration de 0,2 µg/mL (quantité injectée = 30 pg) ont été réalisées grâce à ce montage en testant deux volumes de lavage avec du PBS 10 mM (pH 7,4) : 0,6 µL et 3,4 µL, ce dernier volume étant celui déjà utilisé dans le protocole développé dans le cas de la MC-LR. Les résultats relatifs à ces injections (n = 3) sont reportés en Figure 66.

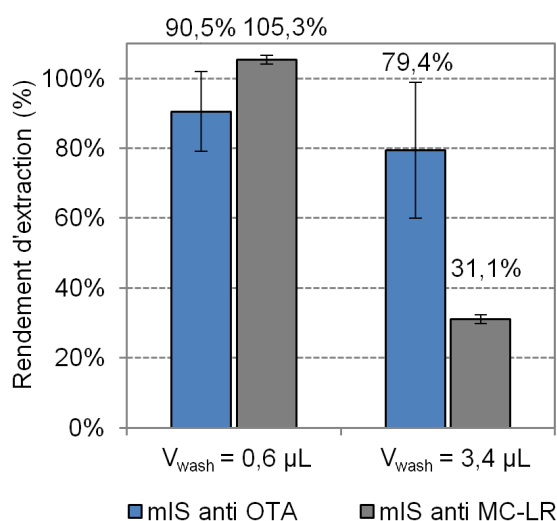


Figure 66 : Comparaison de la rétention de l'ochratoxine A (OTA) sur un mIS (45 mm x 0,1 mm d.i.) spécifique de l'OTA et sur un capillaire contrôle (mIS<sub>2</sub> spécifique de la MC-LR) en fonction du volume de lavage de PBS (10 mmol/L, pH 7,4). Injection de 150 nL d'eau pure dopée à 0,2 µg/mL d'OTA (n = 3).

De la même façon que pour la MC-LR, un lavage avec seulement 0,6 µL de tampon s'avère insuffisant pour mettre en évidence une sélectivité du support. Une grande quantité d'OTA est retenue par interactions non spécifiques sur le mIS<sub>2</sub> anti MC-LR faisant office de contrôle dans cette partie de l'étude. Par contre, l'augmentation du volume de lavage permet clairement d'observer la sélectivité du mIS préparé par immobilisation d'anticorps anti OTA. Ainsi un rendement de 79,4% ± 19,4% a été obtenu sur le mIS anti OTA contre un rendement de seulement 31,1% ± 1,3% sur le contrôle (mIS anti MC-LR). Cette sélectivité est notamment illustrée sur les chromatogrammes comparés en Figure 67. Il est visible que la hauteur et l'aire du pic correspondant à l'OTA est bien plus faible sur le contrôle (mIS<sub>2</sub> anti MC-LR) que sur le mIS anti-OTA. Cependant, l'aire du pic reste

importante en comparaison du pic de l'OTA sur le mIS mettant en évidence un manque de sélectivité du protocole de lavage développé avec la MC-LR lors de la transposition à l'OTA. Une amélioration de cette étape de lavage n'a pas été envisagée dans ce projet de thèse avec cette autre molécule mais il est tout à fait envisageable d'améliorer le lavage en augmentant le volume de PBS percolé au travers du mIS de manière à améliorer la sélectivité des mIS dirigés contre l'OTA.

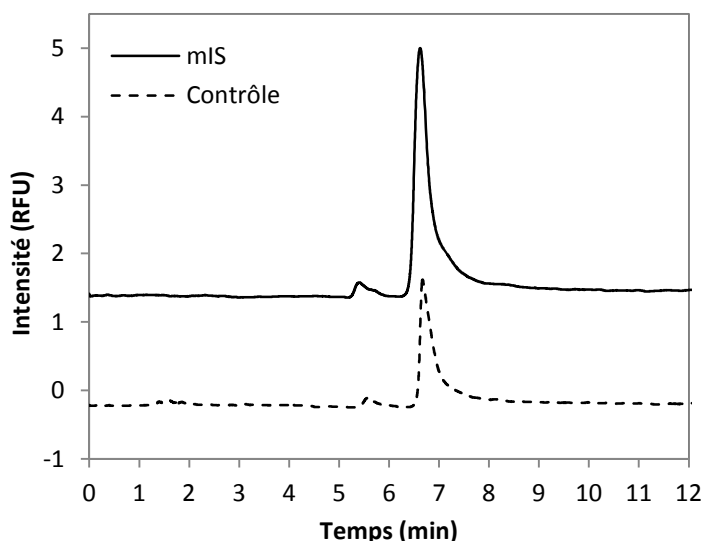


*Figure 67 : Chromatogrammes correspondant à l'injection de 150 nL d'eau pure dopée à 0,2 µg/mL d'ochratoxine A (OTA) sur un mIS (45 mm x 0,1 mm d.i.) spécifique de l'OTA et sur un capillaire contrôle consistant (mIS<sub>2</sub> spécifique de l'OTA (45 mm x 0,1 mm d.i.). Volume de lavage de PBS (10 mmol/L, pH 7,4) = 3,4 µL.*

Bien que la sélectivité reste à améliorer, l'ensemble de ces résultats constituent une preuve de principe très encourageante pour le développement de mIS dirigés contre d'autres molécules dans de futures études.

## 8 Conclusions

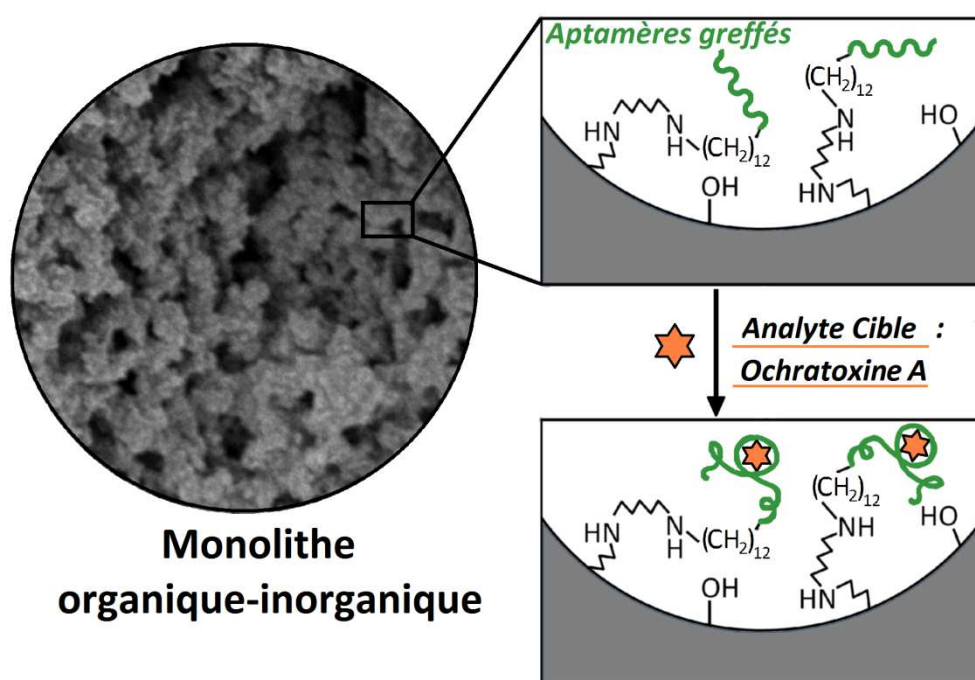
Nous avons démontré que des anticorps pouvaient être immobilisés sur un support monolithique hybride à base de silice en capillaire pour développer des immunoadsorbants miniaturisés couplés en ligne avec la nanoLC-UV (ou LIF). L'extraction sélective de la molécule modèle choisie, la microcystine-LR, a été conduite avec succès. La procédure d'extraction développée dans l'eau pure a permis d'obtenir des rendements d'extraction élevés et sa répétabilité a tout particulièrement été mise en évidence dans ce chapitre. De plus, bien que les difficultés techniques rencontrées aient empêché d'obtenir des capacités répétables, ces capacités se sont malgré tout révélées très élevées en comparaison de valeurs rapportées dans la littérature pour l'immobilisation via des approches en tube ouvert. Les supports développés ont ensuite été appliqués avec succès à



l'extraction de la microcystine-LR contenue dans des échantillons réels d'extraits intracellulaires de cyanobactéries et d'eaux environnementales, deux matrices dans lesquelles cette molécule modèle peut être recherchée. Cette approche pourrait très facilement être appliquée à d'autres molécules par l'immobilisation d'anticorps dirigés contre d'autres molécules. Une preuve de principe rapide a d'ailleurs fait l'objet de ce chapitre en utilisant les supports contrôles préparés par immobilisation d'anticorps anti-ochratoxine A et injections de cette même molécule sur ces supports.

Le succès de l'immobilisation des anticorps a ouvert la voie, dans ce projet de thèse, à l'immobilisation d'un autre type de biomolécules utilisées pour le développement de supports d'extraction sélectifs et présentées au chapitre 1 : les aptamères. L'immobilisation de ces biomolécules a fait l'objet du chapitre 4.

## Chapitre 4 – Développement d'un oligoadsorbant miniaturisé (mOS)



# 1 Introduction

Le chapitre précédent a été l'occasion de faire la preuve de principe de l'immobilisation covalente d'anticorps sur un monolithe hybride organique-inorganique synthétisé *in situ* en capillaire dans le cadre du développement d'un outil bioanalytique miniaturisé hautement sélectif. L'objectif de ce chapitre est maintenant de développer un autre type d'outil sélectif, basé sur le greffage d'aptamères, par une approche très similaire.

Il a été mentionné au chapitre 1 que l'immobilisation d'aptamères dans les systèmes miniaturisés avait été largement considérée en utilisant des particules conditionnées dans des canaux de puces [228, 247] ou des capillaires [156, 172] voire en utilisant des approches en tube ouvert [164, 248, 249, 251, 252, 343]. Peu d'études se sont concentrées sur le greffage d'aptamères sur des monolithes synthétisés au sein de systèmes miniaturisés [152, 229, 237, 238]. Ce greffage a été principalement réalisé en utilisant des monolithes organiques, principalement à base de glycidyl méthacrylate, avec des aptamères biotinylés [152, 238] ou amino-modifiés [229] pour une utilisation en chromatographie d'affinité. Cependant, la caractérisation complète des colonnes en termes de répétabilité de synthèse, de procédure d'immobilisation et de taux de greffage n'a pas toujours été décrite. De plus, à notre connaissance aucune étude ne s'est focalisée sur la miniaturisation de supports de SPE sélectif basé sur des aptamères en utilisant un monolithe hybride à base de silice. En parallèle de nos travaux, Deng *et al* ont tout de même été les premiers à publier des travaux portant sur l'immobilisation d'un aptamère C6 amino-modifié spécifique d'une protéine, *i.e.* l' $\alpha$ -thrombine humaine, dans un capillaire de 250  $\mu\text{m}$  de diamètre interne après synthèse d'un monolithe hybride organique-inorganique à base de TEOS et d'APTES [237]. Ces auteurs ont prouvé la rétention sélective de la protéine cible (par l'absence de rétention de trois autres protéines : HSA, transferrine et myoglobine) en connectant directement un détecteur UV en sortie du monolithe en capillaire et ont également mesuré le taux de greffage des aptamères ainsi que la capacité de leur support. Ces résultats seront d'ailleurs discutés au cours de ce chapitre.

Dans le présent chapitre, l'immobilisation d'aptamères a été réalisée de façon similaire aux anticorps après une étape d'activation au glutaraldéhyde des monolithes hybrides synthétisés *in situ* en capillaire pour ensuite coupler les oligoadsorbants miniaturisés (mOS) avec la nanoLC. Tout comme pour les anticorps, une attention particulière a été portée sur la caractérisation complète des supports. La répétabilité de la procédure d'immobilisation mais aussi d'extraction a, en effet, été évaluée. Le succès de l'immobilisation a également été confirmé en évaluant le taux de greffage des aptamères ainsi qu'en étudiant la capacité des supports. La réactivité croisée a été également évaluée avant d'envisager l'extraction de la molécule modèle choisie à partir d'échantillons complexes. Ce projet s'est orienté vers l'extraction d'une molécule de faible poids moléculaire pour laquelle un aptamère était disponible. La molécule modèle choisie est l'ochratoxine A, une molécule

de petite taille qui sera décrite ci-après et dont l'aptamère a déjà fait l'objet de nombreuses caractérisations.

## 2 Présentation de la molécule modèle

L'ochratoxine A (OTA) a été choisie comme molécule modèle pour ce chapitre car l'aptamère décrit pour celle-ci possède une bonne affinité avec une constante de dissociation  $K_D$  autour de 50 nM [138]. Cet aptamère a également fait l'objet de nombreuses caractérisations par différents groupes [138, 344, 345] et au LSABM [145, 146]. De ce fait, l'objet de cette partie est de présenter succinctement cette molécule modèle et son intérêt analytique.

### 2.1 Origine

Certaines espèces de moisissures provenant du sol ou de l'atmosphère se développent préférentiellement sur des plantes, notamment au niveau des grains ou des fruits lorsque des microblessures y sont présentes. Les mycotoxines (ou toxines de moisissures) sont des molécules naturelles de faible masse moléculaire ( $MW < 1000$  Da) issues du métabolisme secondaire de certaines moisissures. Cinq genres de moisissures sont capables de produire des mycotoxines : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Claviceps*. Elles sont produites lorsque ces dernières sont soumises à des conditions environnementales dites stressantes. Les facteurs environnementaux favorisant cette synthèse sont principalement climatiques, *i.e.* la température et l'humidité. La succession de périodes sèches et chaudes avec des périodes humides (climats tropicaux) favorise tout particulièrement le développement des *Aspergillus*, alors que des climats humides en zones tempérées et avec un ensoleillement moins important engendrent la prolifération de *Penicillium* [346]. La présence plus ou moins importante d'oxygène et de nutriments, le pH du milieu ou la compétitivité inter-espèces peut également influencer grandement sur la production des mycotoxines [346].

Les ochratoxines représentent l'un des groupes les plus importants de mycotoxines. Dans ce groupe, de nombreuses formes d'ochratoxines et leur métabolites ont été décrits dans la littérature parmi lesquels les ochratoxines A, B et C [347]. Parmi ces ochratoxines, l'OTA est la mycotoxine prévalente. Elle est plus particulièrement sécrétée par deux genres de moisissures : *Aspergillus* et *Penicillium* [347-349] et peut contaminer différentes denrées alimentaires principalement pendant leur stockage mais aussi pendant leur culture. Elle est notamment retrouvée dans les céréales [350, 351], le vin [352, 353], les grains de café [354], les fèves de cacao [355] et même dans le lait et la viande issus de certains animaux du fait de la consommation par ces derniers de denrées alimentaires contaminées par l'OTA [346, 356].

## 2.2 Structure et propriétés physico-chimiques

L'ochratoxine A est constituée d'un motif de 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarine lié par une liaison peptidique, au niveau du groupement carboxyle en C7, au groupement amine de la L-β-phénylalanine. Structuellement, les trois ochratoxines ne diffèrent que très légèrement les unes des autres. L'ochratoxine B (OTB) est le dérivé non chloré de l'OTA et l'ochratoxine C (OTC) en est l'ester éthylique. Cependant, malgré ces différences minimales, leur potentiel toxique respectif est loin d'être équivalent, l'OTA restant de loin la plus toxique des trois. Leurs structures sont représentées en Figure 68.

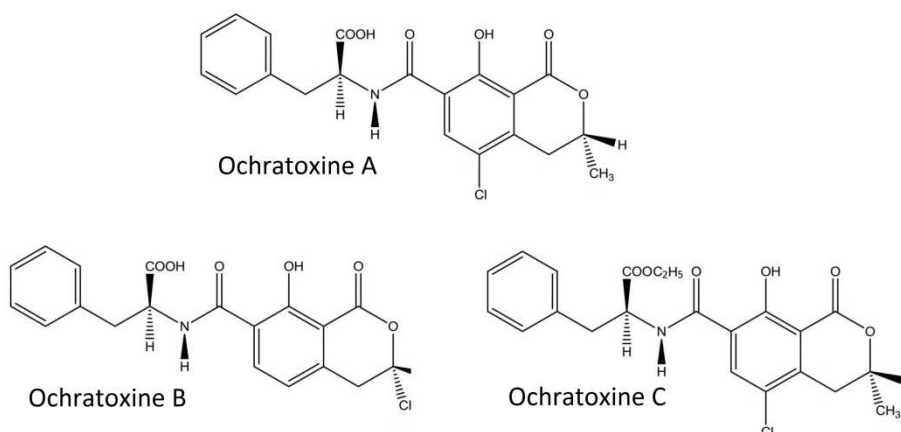


Figure 68 : Structure chimique de l'ochratoxine A, B et C. Adapté de [347].

L'OTA a une masse molaire de 403,8 g/mole. Elle possède des propriétés acides ( $pK_{a1} = 4,4$  et  $pK_{a2} = 7,1$  respectivement pour le groupement carboxyle et la fonction hydroxyle du groupement phénolique [356, 357]) et son log P est estimé à 4,6 (à des valeurs de pH inférieures à 4 pour lesquelles l'OTA est sous forme neutre). Son spectre d'absorption UV varie avec le pH et la polarité du solvant. L'OTA possède un maximum d'absorption à 333 nm dans le méthanol. Dans les mêmes conditions, l'OTB absorbe à 318 nm. L'OTA présente un maximum d'émission de fluorescence à 467 nm dans l'éthanol à 96 % et à 428 nm dans l'éthanol absolu. Elle est par ailleurs très stable et n'est que partiellement dégradée au cours du stockage, de la transformation ou même de la cuisson des aliments [358].

## 2.3 Toxicité

L'OTA s'est avérée présenter de nombreux effets toxiques sur les animaux et les hommes [347, 348]. Bien que le mécanisme d'action de l'OTA reste à ce jour méconnu et controversé, il est avéré qu'une exposition constante à l'OTA peut causer de graves problèmes de santé. La toxicité de l'OTA varie grandement en fonction de l'espèce considérée, du sexe et de la voie d'administration. La dose létale médiane ( $DL_{50}$ ) après une administration orale va de 0,2 mg/kg (rapporté à la masse

totale de l'organisme) chez les chiens à 30,3 mg/kg chez les rats mâles (les femelles des rats y étant bien plus sensibles). Une exposition chronique à de faibles doses d'OTA peut être par ailleurs bien plus dangereuse qu'une exposition brève à une forte dose de cette même molécule [356]. Des études ont par ailleurs montré que l'OTA est bien plus toxique lorsqu'elle est administrée par injection intra-péritonéale que par voie orale. Quelle que soit l'espèce considérée, les organes les plus touchés par les effets toxiques de l'OTA restent les reins. L'OTA a notamment été incriminée chez l'homme dans une pathologie rénale chronique touchant les populations de nombreux états d'Europe de l'Est, la néphropathie endémique des Balkans. Outre cette néphrotoxicité (*i.e.* toxicité pour les reins), ses effets toxiques les plus importants sont l'immunotoxicité (*i.e.* toxicité vis-à-vis du système immunitaire), la teratogénicité (*i.e.* pouvant causer des malformations fœtales) et la carcinogénicité (*i.e.* favorisant le développement de cancers) [356]. En effet, l'ingestion d'OTA pendant la grossesse peut affecter le développement du fœtus [359]. Le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) a classé l'OTA en 1993 comme potentiellement carcinogène (groupe 2B). Le développement de cancers est dépendant de l'espèce mais aussi du sexe [347, 356]. L'OTA s'avère également génotoxique via un métabolisme oxydatif. Cette activité est supposée jouer un rôle central dans la carcinogénèse induite par l'OTA et peut être divisée en des mécanismes d'action directs (adduits à l'ADN) et indirects (dommages oxydatifs de l'ADN). Les études récentes suggèrent que l'OTA est un carcinogène génotoxique par induction de lésions oxydatives à l'ADN couplée avec la formation d'adduits directs de l'ADN via la formation d'une quinone [356].

Du fait de la toxicité de l'OTA, l'Union Européenne a mis en place en 2006 des réglementations fixant des teneurs maximales en OTA dans les principales matrices alimentaires impliquées et destinées à une consommation humaine (règlement 1881/2006/CE). Ces teneurs sont par exemple de 10 µg/kg pour le café soluble ou les raisins secs, de 5 µg/kg pour les céréales brutes ou le riz, 2 µg/kg pour les vins (rouge, blanc, rosé) ou boissons à base de vin. Certaines denrées destinées à l'alimentation animale sont également réglementées (2006/576/CE) telles que les céréales avec une teneur maximale de 10 µg/kg et les compléments alimentaires pour les porcs (50 µg/kg) et pour les volailles (100 µg/kg). Ces aliments étant globalement très consommés par l'homme, l'OTA peut être ensuite retrouvé dans le sang, le plasma et le lait maternel. La faible solubilité de l'OTA entraîne en effet une bioaccumulation de cette molécule dans l'organisme. Une fois ingérée, elle s'accumule dans les reins, le foie, les tissus adipeux et les muscles. Du fait de ces réglementations, il est nécessaire de développer des méthodes d'analyse et de traitement de l'échantillon performantes permettant d'atteindre ces limites réglementaires de manière à pouvoir réaliser un contrôle de ces matrices.

## 2.4 Méthodes de purification et d'analyses de l'OTA

### 2.4.1 Méthodes d'extraction de l'OTA en amont de l'analyse

L'étape de séparation chromatographique est systématiquement précédée d'une étape d'extraction et purification des échantillons complexes. Si des méthodes d'extraction en phase liquide peuvent être envisagées, cette purification est le plus souvent réalisée sur des supports d'extraction sur phase solide [73]. Parmi les supports conventionnels de SPE, les supports hydrophobes restent les plus utilisés pour l'extraction de l'OTA [73]. L'OTA a notamment été extraite du vin sur des cartouches remplies de particules greffées C18 [360, 361] permettant dans certains cas d'atteindre de très hauts rendements d'extraction, supérieurs à 90%, dans cette matrice [360]. Malgré ces applications performantes, des supports d'immunoaffinité plus sélectifs commercialement disponibles et permettant une meilleure purification des échantillons ont été plus largement utilisés [71, 73, 362]. En effet, les immunoadsorbants sont les supports de purification parmi les plus utilisés pour l'analyse de l'OTA et l'analyse d'autres mycotoxines [363]. Cependant certains anticorps peuvent présenter une réactivité croisée importante et donc peuvent manquer de spécificité [364] et leur coût peut être élevé. L'alternative à l'utilisation d'anticorps pour l'extraction de l'OTA a consisté ces dernières années en le développement et à la commercialisation de MIP [29, 365-367] mais aussi d'oligoadsorbants utilisant des aptamères [145, 146, 168, 368]. Des oligoadsorbants ont permis d'extraire l'OTA à partir d'extraits de blé [146, 168], de vins [145] et de bières [368]. Ces développements ont été rendu possibles par la forte affinité de la séquence de l'aptamère anti-OTA pour cette même molécule. L'affinité de cette séquence pour sa cible est à ce jour l'une des plus importantes dans le cas des petites molécules. C'est pourquoi l'OTA a été choisie comme molécule modèle pour cette étude portant sur la miniaturisation des supports d'extraction.

### 2.4.2 Méthodes d'analyses par chromatographie

La chromatographie liquide couplée à un détecteur de fluorescence (LC-Fluo) est la méthode la plus utilisée pour l'analyse de l'OTA [71, 73, 84, 350, 351, 354, 355, 369, 370]. Associée à une méthode de traitement de l'échantillon, cette méthode permet en générale d'atteindre de très bonnes limites de détection (de l'ordre de 0,1 ng/g dans le cacao ou les raisins secs [71, 355] et de 0,1 ng/mL dans le vin [370]) du fait de la fluorescence naturelle de l'OTA. Cette méthode a notamment permis de mettre en évidence une contamination par l'OTA de nombreux types d'échantillons tels que les figues séchées [371], le riz [372], le café [373] ou le sang humain [374]. En générale la longueur d'onde d'excitation est fixée à 333 nm et la longueur d'onde en émission à 460 nm. L'étape de séparation est quant à elle généralement réalisée sur une colonne à polarité de phase inversée (greffées C18) de format conventionnel.

Bien que la détection par fluorescence soit de loin le mode de détection le plus utilisé pour l'OTA du fait de sa simplicité de mise en œuvre et de sa disponibilité, la spectrométrie de masse, plus complexe et plus onéreuse, a également permis la détection de l'OTA. Des études font notamment référence à l'utilisation de ce type de détection pour l'analyse de l'OTA dans divers échantillons de vins purifiés sur des supports de SPE conventionnels avec des limites de détection de l'ordre de 0,05 ng/mL [375].

### 3 Protocole expérimental

#### 3.1 Choix de l'aptamère

Dans de précédents travaux réalisés au LSABM, un oligoadsorbant a été développé en utilisant l'aptamère anti-OTA dont la séquence (5'-GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGAC A-3') a été identifiée par Cruz-Aguado *et al* en 2008 [138]. Cet aptamère présente une très forte affinité pour sa cible avec une constante de dissociation de l'ordre de 50 nM [138]. Pour cela, un espaceur consistant en une chaîne carbonée (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> a été introduit entre l'extrémité 5' de la séquence et un groupement amine de façon à faciliter son immobilisation sur des particules de sépharose activées -CNBr [145]. D'autres modifications peuvent être envisagées, telles que la liaison d'un espaceur au niveau de l'extrémité 3' ou l'utilisation d'une chaîne carbonée de longueur différente (CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub> comme déjà évoqué au chapitre 1. Une étude menée au LSABM en parallèle de ce projet de thèse a permis d'évaluer que l'utilisation d'un OS préparé par greffage de l'aptamère 3'C6 amino-modifié sur des particules de sépharose permettait d'obtenir une capacité et des rendements d'extraction non significativement différents de ceux obtenus sur un OS préparé par greffage de l'aptamère 5'C6 amino-modifié [146]. Cependant, l'utilisation d'une chaîne carbonée plus longue, (CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>, a permis d'atteindre une capacité plus élevée. En effet, une capacité de 1,95 µg d'OTA a été mesurée sur un OS-A5'C12 contre une capacité de 1,3 µg d'OTA sur un OS-A5'C6 consistant tous les deux en 35 mg de sépharose activée CNBr puis greffée (cf. Figure 22 en page 78) [146]. L'OS-A5'C12 a également permis l'extraction de l'OTA à partir d'extraits de blé dilués dix fois avec des rendements supérieurs à 90 % montrant la très bonne affinité de l'aptamère 5'C12 amino-modifié pour l'OTA [146] sans que la chaîne en C12 ne génère plus d'interactions non spécifiques que celle en C6.

L'aptamère finalement choisi pour être greffé sur des monolithes hybrides en capillaire est ainsi l'aptamère 5'C12 amino-modifié qui a permis d'atteindre, comme évoqué ci-avant, de meilleures valeurs de capacité tout en conservant la très forte affinité de la séquence pour l'OTA. Choisir un aptamère présentant une faible constante de dissociation ainsi que permettant d'atteindre des capacités élevées étaient un pré-requis pour débiter les études du greffage de telles biomolécules sur monolithe en capillaire, ne sachant pas, à ce stade du projet, si les rendements



d'immobilisation des aptamères s'avéreraient suffisants pour pouvoir caractériser la sélectivité des supports et ne pas être limité dans cette étude par une capacité trop faible.

### 3.2 Immobilisation des aptamères

Au vu des difficultés qui ont pu être rencontrées dans le chapitre précédent lors de la percolation des solutions d'anticorps à travers les monolithes en capillaire préparés avec un bain de glace et présentant une faible perméabilité ( $2,23 \pm 0,15 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ ), l'immobilisation des aptamères a été envisagée sur des monolithes en capillaires présentant une perméabilité plus élevée en utilisant la méthode de synthèse effectuée à une température de 22°C. Sept monolithes, synthétisés en capillaire à partir de mélanges réactionnels indépendants, préparés sur deux jours et dont la perméabilité moyenne est de  $6,15 \pm 0,67 \times 10^{-14} \text{ m}^2$  (C.V = 10,9%), ont donc été utilisés pour immobiliser ces aptamères. Ceux-ci seront nommés cap<sub>1</sub>, cap<sub>2</sub>, cap<sub>3</sub>, cap<sub>4</sub>, cap<sub>5</sub>, cap<sub>6</sub> et cap<sub>7</sub> dans la suite du chapitre. Avec une telle perméabilité, la perte de charge générée par un capillaire de 7 cm est donc attendue autour de  $4,8 \pm 0,5$  bars dans l'eau pure ou dans un tampon (tel qu'un tampon de liaison d'aptamères) à 200 nL/min et  $12,1 \pm 1,3$  bars dans un mélange eau/acétonitrile (70/30) (composition proche d'une phase mobile d'analyse) à 500 nL/min ce qui rend les capillaires compatibles avec un couplage en ligne avec la nanoLC.

Tout comme pour les anticorps, la première étape du protocole de greffage des aptamères consiste à activer la surface du monolithe au glutaraldéhyde (10% w/w dans du tampon phosphate 100 mM pH 8,0). Cette étape permet d'obtenir une surface présentant des groupements aldéhyde nécessaires au greffage d'aptamères amino-modifiés. Des aptamères 5'C12 amino-modifiés dirigés contre l'OTA ont été immobilisés sur le monolithe hybride à base de silice contenus dans les capillaires cap<sub>1</sub>, cap<sub>2</sub>, cap<sub>3</sub> et cap<sub>4</sub> (10 cm x 100 µm d.i.) en suivant la procédure illustrée en Figure 69.

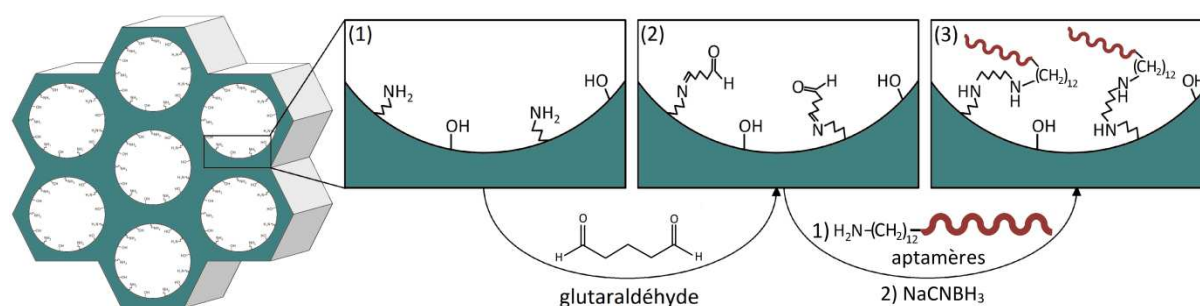


Figure 69 : Principe général du greffage d'aptamères sur le monolithe organique-inorganique synthétisé en capillaire.

Brièvement, 60 µL d'une solution d'aptamères 5'C12 amino-modifiés spécifiques de l'OTA à 1 g.L<sup>-1</sup> (dans 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 8,0), soit 60 µg d'aptamères) ont été percolés à travers les différents capillaires activés avec du glutaraldéhyde pendant 25 heures. Cette concentration a été choisie car il s'agit de la concentration en aptamères généralement utilisée pour le greffage d'aptamères sur des particules de sépharose [146-148]. Cette étape est ensuite suivie

d'un premier rinçage avec du tampon phosphate 100 mM pH 8,0, d'un second avec du tampon de liaison (BB : *binding buffer*, Tris-HCl (10 mM), NaCl (120 mM), KCl (5mM) and  $\text{CaCl}_2$  (20 mM)) contenant 5 mg/mL de  $\text{NaCNBH}_3$  de manière à réduire les imines formées en amines et stabiliser la liaison covalente des aptamères au monolithe, puis d'un troisième rinçage avec du tampon BB et enfin avec une phase hydro-organique composée d'eau/acétonitrile 70/30 (v/v) de manière à éliminer les aptamères encore simplement adsorbés à la surface du monolithe. Les oligoadsorbants miniaturisés (mOS) obtenus ont ensuite été conservés dans du BB à 4°C avant utilisation. La procédure est plus largement détaillée en Annexe 3. Le tampon de liaison correspond au tampon favorisant la liaison de l'aptamère à l'OTA. Celui-ci est entre autres constitué d'ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  à une concentration de 20 mM. Une étude de Cruz-Aguado *et al* en 2008 [138], comparant l'effet de deux cations divalents ( $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ ) sur la liaison de l'aptamère à l'OTA et dont les résultats sont présentés dans le Tableau 10, a montré que la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  à une telle concentration permet d'avoir la meilleure constante de dissociation entre l'aptamère et l'OTA avec une valeur de  $49 \pm 3$  nM.

**Tableau 10 :** Constantes d'affinité mesurées en fonction de la nature de la concentration du cation divalent utilisé. Adapté de [138].

| concentration (mM) | $K_d$ (nM)       |                  |
|--------------------|------------------|------------------|
|                    | $\text{Mg}^{2+}$ | $\text{Ca}^{2+}$ |
| 0                  | NB               | NB               |
| 5                  | $197 \pm 74$     | $112 \pm 12$     |
| 10                 | $148 \pm 8$      | $54 \pm 8$       |
| 20                 | $118 \pm 46$     | $49 \pm 3$       |

<sup>a</sup> NB, aucune liaison détectée

Ces quatre capillaires ont ensuite été coupés pour obtenir quatre capillaires de 7 cm de longueur. Cette longueur peut paraître élevée au regard de la longueur de la colonne analytique utilisée (15 cm x 100  $\mu\text{m}$  d.i.). Le choix d'une telle longueur de capillaires dans le cadre de cette étude a été dicté par les craintes de ne pas atteindre une capacité suffisante pour caractériser la sélectivité des mOS ne connaissant pas les rendements de greffage atteignables par l'approche suivie pour le greffage au début de cette étude exploratoire. Les essais préliminaires ont donc été réalisés avec cette longueur de capillaire, qui a été conservée pour la suite de l'étude pour caractériser la répétabilité de préparation des supports. De la même façon que pour les anticorps, trois capillaires contrôles préparés en greffant des aptamères 5'C12 amino-modifiés dirigés contre une autre molécule, la cocaïne, ont été préparés en appliquant une procédure en tout point identique à celle appliquée pour l'immobilisation d'aptamères anti OTA sur les capillaires cap<sub>5</sub>, cap<sub>6</sub> et cap<sub>7</sub>. La séquence de ces aptamères, qui est 5'-GGGAGACAAGGAAAATCCT TCAATGAAGTGGGTCGACA-3', ne présente aucune affinité pour la molécule modèle choisie dans cette étude, l'OTA. Ces capillaires contrôle ne doivent générer aucune rétention de l'OTA et ont été synthétisés de façon à contrôler la

sélectivité de l'extraction. Quatre mOS dirigés contre l'OTA ont ainsi été obtenus ainsi que trois supports contrôles consistant en des mOS dirigés contre la cocaïne.

### 3.3 Méthode d'analyse et étalonnage

Avant d'envisager le couplage des mOS avec la nanoLC-LIF il a été nécessaire de développer une méthode d'analyse de l'OTA. Tout comme pour la MC-LR, une analyse en mode isocratique a été préférée et utilisée pour les analyses. La phase mobile utilisée est ainsi composée d'eau/acétonitrile (70/30, v/v), la colonne utilisée restant une Chromolith® CapRod® RP-18 (15 cm x 100 µm d.i., Merck). La détection a été réalisée grâce à un détecteur LIF (*Laser Induced Fluorescence*). La longueur d'onde d'excitation est obtenue grâce à un laser He-Cd à 325 nm (Model 3056-M-A02, Melles Griot, Voisins-le-Bretonneux, France) couplé à un détecteur Zetalif Evolution (Picometrics, Toulouse, France). Ces conditions ont été choisies de manière à pouvoir réaliser des analyses rapides ( $t_r \approx 7,4$  min pour l'OTA) tout en ayant une bonne limite de quantification située autour de 25-50 ng/mL dans ces conditions ( $S/N \approx 10$ ). Les gammes d'étalonnage ont été réalisées à chaque fois en connectant directement une nano-vanne comprenant une boucle d'injection de 250 nL à la nano-pompe analytique et à la colonne analytique de manière à réaliser des analyses directes en nanoLC et pouvoir étalonner le système. Ces gammes d'étalonnage ont été préparées dans du tampon BB pour être au plus proche du milieu dans lequel l'OTA est contenue lors du couplage d'un mOS avec la nanoLC-LIF, ce mOS étant rempli de tampon de lavage, *i.e.* BB, avant basculement et transfert de son contenu vers la colonne analytique. La composition du milieu a une importance cruciale sur les propriétés de fluorescence de l'OTA. Ce point sera discuté plus amplement en partie 5 en page 200. Enfin, ces gammes ont été refaites plusieurs fois au cours de l'étude. Un exemple de chromatogramme obtenu et de courbe d'étalonnage est reporté en Figure 70.

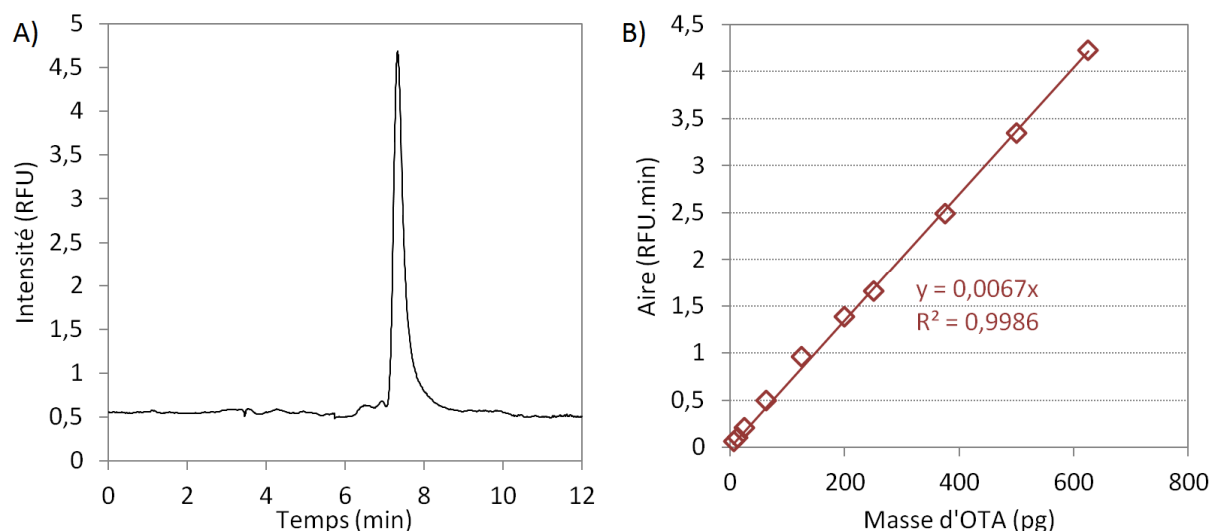


**Figure 70 :** A) Exemple d'un chromatogramme correspondant à l'analyse par nanoLC-LIF de 250 nL de tampon de liaison (BB) dopé avec 125 pg d'OTA ( $C^0 = 0,5 \mu\text{g/mL}$ ). B) Exemple de courbe d'étalonnage réalisée par analyse d'échantillons de BB dopé à des concentrations croissantes d'OTA par nanoLC-LIF.

### 3.4 Montage expérimental

Les mOS (ou contrôles) préparés ont ensuite été intégrés dans un montage permettant leur couplage avec la nanoLC-LIF. Le montage utilisé est schématisé en Figure 71 et est très similaire au montage utilisé pour le couplage en ligne des mIS dans le chapitre précédent. Ce montage comprend deux nano-vannes six-voies. La première nano-vanne comprend une boucle d'injection de 250 nL et est reliée à une nano-pompe de préconcentration (nano-pompe 1) et à une deuxième nano-vanne. Cette deuxième nano-vanne est reliée quant à elle au mOS (7,0 cm x 100  $\mu$ m d.i.), placé en lieu et place d'une boucle d'injection, à une nano-pompe analytique (nano-pompe 2) délivrant la phase mobile nécessaire à l'analyse et à la colonne analytique. De nombreuses études sur cartouche font référence à la percolation de solutions à faible température (4 °C) [146-148]. Cette température pouvant avoir un effet sur la liaison de l'aptamère à sa cible, le mOS (ou contrôle) a toujours été équilibré à une température de 6 °C dans un four à colonne (Thermo Scientific). Cette température a été choisie du fait de l'impossibilité d'atteindre une température de 4 °C avec ce four (la température minimale atteignable étant de 5 °C) et dans un souci de répétabilité (le four se stabilisant parfaitement à 6 °C mais pas à 5 °C). De plus, tous les échantillons ont été injectés seulement quelques secondes après leur sortie du réfrigérateur (4 °C). L'ensemble des connexions ont été réalisées au moyen de capillaires de très faible diamètre interne (20  $\mu$ m d.i.) de manière à minimiser comme précédemment les volumes morts du système.

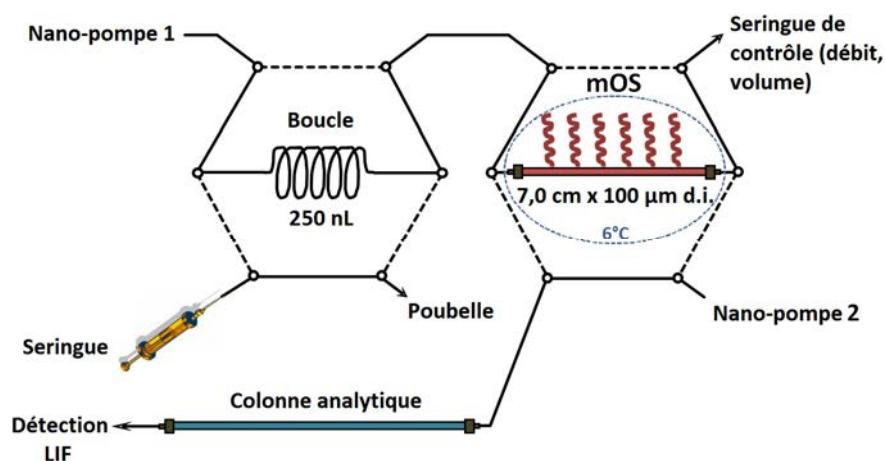


Figure 71 : Schéma du montage d'oligoextraction miniaturisée couplée à une analyse par nanoLC-LIF.

La nano-pompe 1 délivre le tampon nécessaire à l'étape de lavage à un débit fixé à 200 nL/min et permet de pousser l'échantillon depuis la boucle d'injection de 250 nL vers le mOS. C'est l'étape de percolation. Le tampon délivré par cette nano-pompe est le tampon de liaison (TrisHCl 10 mM, KCl 5 mM, NaCl, 120 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH ~ 5,4). Les volumes morts des connectiques entre la boucle d'injection et le mOS ont été évalués à environ 150 nL. De manière à ce que l'échantillon soit intégralement transféré dans le mOS il est donc nécessaire de pousser 400 nL de tampon BB (250 nL de la boucle d'injection + 150 nL de connectiques). Tout comme pour les mIS,

nous avons défini l'étape de lavage comme débutant dès que l'intégralité de l'échantillon se trouve être dans le mOS, *i.e.* une fois que l'échantillon a été poussé avec 400 nL de tampon. Après que le volume de tampon adéquat pour l'étape de lavage a été percolé au travers du mOS, la deuxième nano-vanne est basculée permettant ainsi à la phase mobile hydro-organique de passer au travers du mOS (débit = 500 nL/min) et rompre ainsi les interactions spécifiques entre l'analyte cible, dans ce cas l'OTA, et son aptamère. L'analyte est alors transféré vers la colonne analytique puis le détecteur.

## 4 Oligoextraction sélective en milieu pur

Les trois premiers mOS anti-OTA et les supports contrôles ont été caractérisés grâce au montage présenté ci-avant.

### 4.1 Essais préliminaires

Les premiers essais de couplage d'un mOS avec la nanoLC-LIF ont eu pour but de déterminer la faisabilité du couplage en ligne, la longueur choisie pour les mOS étant ici importante et pouvant donc être limitante pour conserver une hauteur et une largeur de pic raisonnable et donc une bonne limite de détection. Comme mentionné dans la partie précédente, la longueur choisie pour les mOS (ou contrôle) est de 7,0 cm, c'est-à-dire une longueur seulement 2,1 fois moins élevée que la longueur de la colonne analytique pour un diamètre identique. Outre l'élargissement de pic pouvant être causé par la longueur importante des mOS, tout comme pour les préconcentrations sur les mIS du chapitre précédent, l'utilisation d'un tampon très concentré en sels lors de l'étape de lavage, *i.e.* BB (Tris-HCl (10 mM), NaCl (120 mM), KCl (5mM) and CaCl<sub>2</sub> (20 mM)), a aussi été vue comme une cause potentielle de difficulté. En effet, tout comme précédemment pour les mIS, la crainte était de causer une précipitation de sels dans les capillaires lors du basculement de la seconde nano-vanne et arrivée de la phase mobile hydro-organique dans le mOS. L'ensemble de ces paramètres a donc été évalué dès les premières injections sur les mOS. Un exemple de chromatogramme résultant d'une préconcentration sur le mOS<sub>1</sub> d'eau pure dopée avec 0,8 µg/mL d'OTA avec un volume de lavage non optimisé de 2,0 µL de BB est reporté en Figure 72.

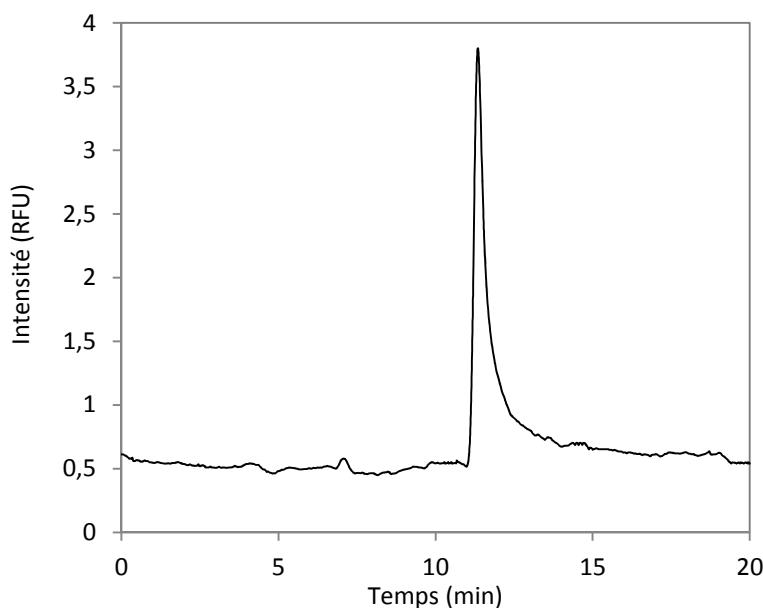


**Figure 72 :** Chromatogrammes correspondant à la percolation de 250 nL de tampon de liaison (BB) dopé à 0,8 µg/mL d'OTA sur le mOS<sub>1</sub> (70 mm x 0,1 mm d.i.). Volume de lavage de BB = 2,0 µL.

Il est visible que le couplage du mOS<sub>1</sub> avec la nanoLC-LIF entraîne, comme pour le couplage des mIS, un décalage du temps de rétention qui passe de 7,4 min pour les injections directes à 11,2 min une fois le mOS couplé du fait du volume plus grand du mOS comparé à la boucle d'injection utilisée pour les injections directes ( $\approx$  440 nL contre 250 nL respectivement) et du volume mort des capillaires de connexions entre le mOS et la nano-vanne. Ces volumes entraînent également un élargissement du pic et une diminution de sa hauteur. La hauteur et la largeur à mi hauteur du pic de l'OTA passent ainsi respectivement d'environ 4,0 RFU et 18,5 secondes pour une injection directe sur la colonne analytique à 3,2 RFU et 21,5 secondes pour une analyse précédée d'une étape de préconcentration en ligne sur le mOS. De ce fait la LOQ est augmentée à environ 65 ng/mL pour ce couplage. Cette LOQ est apparue malgré tout comme suffisante pour envisager une caractérisation des supports développés. De la même façon qu'avec les mIS, l'ensemble des premières injections a montré que l'utilisation du tampon de liaison BB pour l'étape de lavage n'entraîne pas de problèmes de précipitation lors du basculement de la deuxième nano-vanne, ce qui facilite de ce fait le couplage direct du mOS avec la nanoLC-LIF.

## 4.2 Développement d'un protocole d'extraction sélective

La suite de l'étude a alors consisté à optimiser les paramètres d'extraction et de comparer la rétention de l'OTA sur les trois mOS et sur les trois contrôles. Pour ce faire, le volume minimal de tampon de liaison nécessaire à l'élimination des interactions non-spécifiques potentielles a d'abord été déterminé. Cette étape doit permettre de maintenir une forte rétention de l'OTA sur les mOS et son élimination des capillaires contrôle. La solution de lavage, *i.e.* BB, permet le transfert de

l'intégralité du volume de l'échantillon (*i.e.* 250 nL) vers le mOS (ou contrôle). L'étape de lavage commence après percolation de 400 nL de BB (250 nL inj. + 150 nL de volumes morts) avec la nano-pompe de préconcentration. Pour déterminer ce volume de lavage minimal, des échantillons de BB dopé avec 800 ng/mL d'OTA ont été injectés sur les trois mOS en utilisant des volumes croissants de tampon BB lors de la phase de lavage (débit de 200 nL/min) avant de basculer la deuxième nanovanne en position « inject » de manière à transférer l'analyte du mOS (ou contrôle) vers la colonne analytique. L'ensemble de ces injections ont été réalisées une fois pour chaque volume de lavage considéré sur chacun des mOS et sur chacun des contrôles. Les volumes de lavage étudiés sont 1,0  $\mu$ L, 1,5  $\mu$ L, 2,0  $\mu$ L, 3,0  $\mu$ L, 4,0  $\mu$ L et 5,0  $\mu$ L. Les rendements d'extraction de l'OTA sur les deux types de supports sont reportés dans le Tableau 11.

**Tableau 11 :** Comparaison des rendements d'extraction de l'OTA sur trois mOS (70 x 0,1 mm d.i.) spécifiques de l'OTA et sur trois capillaires contrôle préparés avec des aptamères anti-cocaine (70 x 0,1 mm d.i.) après percolation de quantités croissantes de tampon BB (Tris-HCl (10 mM), NaCl (120 mM), KCl (5 mM) et CaCl<sub>2</sub> (20 mM)) au cours de l'étape de lavage effectuée par des volumes de lavage ( $V_{\text{lavage}}$ ) croissants. Injection de 250 nL de BB dopé à 800 ng/mL d'OTA ( $n = 1$ ) sur les mOS et sur les contrôles couplés en ligne avec la nanoLC-LIF

|                       | $V_{\text{lavage}}$            |                               |                               |                               |                               |                               |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                       | 1,0 $\mu$ L                    | 1,5 $\mu$ L                   | 2,0 $\mu$ L                   | 3,0 $\mu$ L                   | 4,0 $\mu$ L                   | 5,0 $\mu$ L                   |
| mOS <sub>1</sub>      | 85,3%                          | 93,2%                         | 101,9%                        | 98,7%                         | 89,7%                         | 85,7%                         |
| mOS <sub>2</sub>      | 82,5%                          | 91,7%                         | 91,0%                         | 85,5%                         | 74,1%                         | 72,9%                         |
| mOS <sub>3</sub>      | 101,0%                         | 108,7%                        | 105,4%                        | 101,0%                        | 78,1%                         | 84,1%                         |
| <b>moyenne</b>        | <b>89,6%</b><br><b>± 10,0%</b> | <b>97,8%</b><br><b>± 9,4%</b> | <b>99,4%</b><br><b>± 7,5%</b> | <b>95,1%</b><br><b>± 8,4%</b> | <b>80,7%</b><br><b>± 8,1%</b> | <b>80,9%</b><br><b>± 7,0%</b> |
| contrôle <sub>1</sub> | 94,3%                          | 66,4%                         | 60,3%                         | 43,1%                         | 26,9%                         | 7,7%                          |
| contrôle <sub>2</sub> | 90,3%                          | 77,6%                         | 57,5%                         | 45,7%                         | 26,9%                         | 9,7%                          |
| contrôle <sub>3</sub> | 80,4%                          | 85,6%                         | 72,6%                         | 53,2%                         | 40,1%                         | 25,0%                         |
| <b>moyenne</b>        | <b>88,3%</b><br><b>± 7,2%</b>  | <b>76,5%</b><br><b>± 9,6%</b> | <b>63,5%</b><br><b>± 8,0%</b> | <b>47,3%</b><br><b>± 5,2%</b> | <b>31,3%</b><br><b>± 7,6%</b> | <b>14,1%</b><br><b>± 9,5%</b> |

Tout d'abord, il est visible que les rendements d'extraction de l'OTA présentent, quel que soit le volume de lavage étudié, une très bonne répétabilité sur les trois mOS préparés à partir de synthèses de monolithes puis de greffages d'aptamères complètement indépendants. En effet, il peut être observé que des écart-types inférieurs ou égaux à 10,0% ont toujours été obtenus ce qui constituent des résultats extrêmement satisfaisants.

Ensuite, il est clairement visible que la rétention de l'OTA reste très élevée sur les trois mOS après lavage des supports avec 5,0  $\mu$ L de BB, équivalent à plus de 11 volumes de capillaires monolithiques (en supposant comme précédemment une porosité de 0,8). A l'inverse, la rétention sur les trois contrôles décroît rapidement. Il est ainsi visible qu'au-delà d'un volume de lavage de 1,5 – 2,0  $\mu$ L (*i.e.* 3,5 – 4,5 volumes de capillaire) les rendements d'extraction obtenus sur les contrôles commencent à chuter. En effet, un rendement moyen sur les trois contrôles de 63,5% ± 8,0% a été

obtenu avec une étape de lavage par 2,0  $\mu\text{L}$  de BB contre un rendement toujours constant de  $99,4\% \pm 7,5\%$  sur les mOS. Au-delà d'un volume de 5,0  $\mu\text{L}$  de lavage avec du tampon BB, un rendement moyen de seulement  $14,1 \pm 9,5\%$  est finalement obtenu sur les trois contrôles contre  $80,9 \pm 7,0\%$  sur les mOS. Cette différence démontre la sélectivité de la rétention de l'OTA sur les mOS. Cette sélectivité est notamment illustrée sur les chromatogrammes de la Figure 73 qui compare des injections de tampon BB dopé à 800 ng/mL (inj = 250 nL) sur le mOS<sub>1</sub> et sur le contrôle<sub>1</sub> après un lavage par 5,0  $\mu\text{L}$  de tampon BB.

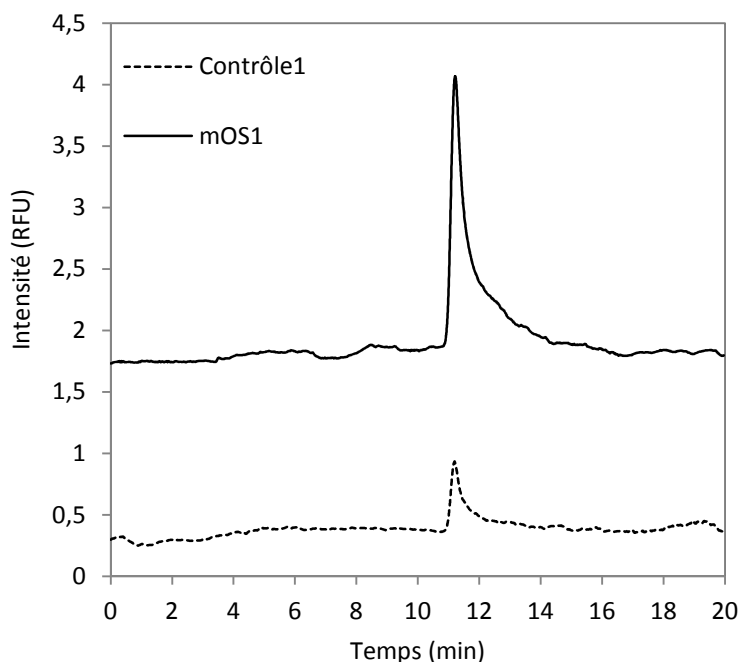


*Figure 73 : Chromatogrammes correspondant à l'injection de 250 nL de tampon de liaison (BB) dopé à 0,8  $\mu\text{g/mL}$  d'OTA sur un mOS (70 mm x 0,1 mm d.i.) spécifique de l'OTA et sur un capillaire contrôle consistant en un mOS spécifique de la cocaïne (70 mm x 0,1 mm d.i.). Volume de lavage de BB = 5,0  $\mu\text{L}$ .*

Il est clairement visible que l'aire et la hauteur du pic sont bien plus importantes sur le mOS que sur le contrôle. L'ensemble de ces résultats indique qu'un volume de lavage avec du tampon BB égal à 5,0  $\mu\text{L}$  semble être au moins nécessaire pour éliminer la plupart des interactions non spécifiques résiduelles et atteindre une très bonne sélectivité. La possibilité de greffer des aptamères sur un monolithe hybride organique-inorganique en capillaire avec une méthode répétable a ainsi été démontrée.

### 4.3 Evaluation de la répétabilité

Pour caractériser plus amplement la répétabilité de la procédure d'extraction impliquant l'utilisation de 5,0  $\mu\text{L}$  de tampon de liaison BB lors de l'étape de lavage précédant le basculement de la seconde nano-vanne, celle-ci a été répétée trois fois sur chaque mOS et sur chaque contrôle couplés à la nanoLC-LIF. Les rendements d'extraction obtenus sont reportés en Figure 74.



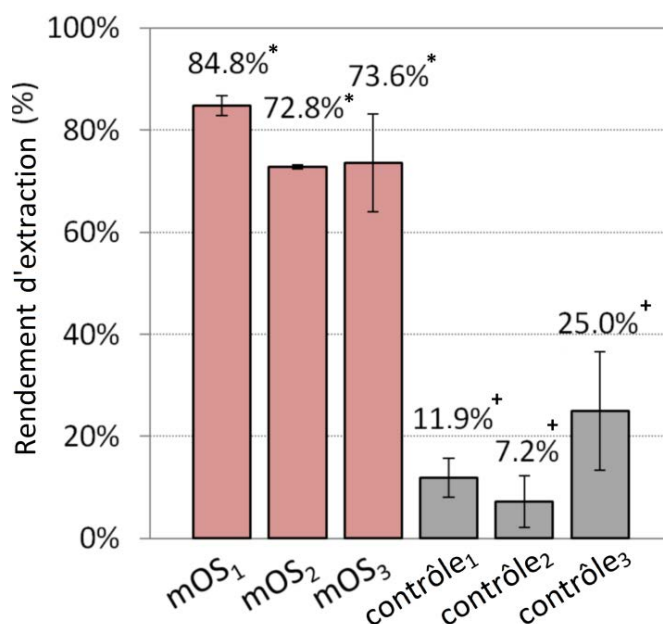


**Figure 74 :** Répétabilité des rendements d'extraction de l'OTA sur trois mOS (mOS<sub>1</sub>, mOS<sub>2</sub>, mOS<sub>3</sub>) spécifiques de l'OTA et sur trois supports contrôles (préparés avec des aptamères anti-cocaine) couplés en ligne à la nanoLC-LIF. Injection de 250 nL de BB dope à 800 ng/mL d'OTA. Lavage avec 5,0 µL de BB (n = 3). \*ANOVA :  $p = 0,07 > 0,05$ . <sup>+</sup>ANOVA :  $p = 0,07 > 0,05$

Des rendements d'extraction de  $84,8\% \pm 1,9\%$ ,  $72,8\% \pm 0,4\%$ , and  $73,6\% \pm 9,5\%$  (n = 3) ont été obtenus respectivement sur les mOS<sub>1</sub>, mOS<sub>2</sub> and mOS<sub>3</sub> en injectant 250 nL de tampon BB dopé à 800 ng/mL d'OTA. Les valeurs des C.V. se sont avérées particulièrement basses pour les mOS<sub>1</sub> et mOS<sub>2</sub> (respectivement 2,2% et 0,6%) et satisfaisant pour le mOS<sub>3</sub> avec un C.V. de 12,9%. La répétabilité du protocole d'extraction a ainsi été mise en évidence sur ces supports. De plus, ces résultats permettent également d'illustrer la répétabilité inter-mOS, *i.e.* la répétabilité de préparation des supports. En effet, il est visible en Figure 74 que les rendements d'extraction sur les mOS<sub>1,2,3</sub> ne sont pas significativement différents (ANOVA,  $p\text{-value} = 0,07 > 0,05$ ). Il peut aussi être noté que les rendements sur les trois contrôles sont bas en comparaison avec les mOS. Des rendements d'extraction sur les contrôle<sub>1,2,3</sub> de  $11,9\% \pm 3,8\%$ ,  $7,2\% \pm 5,0\%$  et  $25,0\% \pm 11,6\%$  (non significativement différent, ANOVA :  $p = 0,07 > 0,05$ ) ont été obtenus. Ces résultats appuient à nouveau la grande répétabilité de la préparation des supports et confirment la sélectivité des mOS pour l'OTA.

#### 4.4 Evaluation de la réactivité croisée de l'aptamère

La séquence d'aptamère utilisée dans cette étude présente une affinité 100 fois plus élevée pour l'OTA que pour l'OTB, cette dernière étant comme déjà mentionné un analogue structural de l'OTA qui ne possède pas d'atome de chlore au niveau du noyau isocoumarine contrairement à l'OTA [138]. Une étude menée en parallèle de ce projet de thèse au LSABM a montré qu'aucune rétention spécifique de l'OTB n'était observée avec la séquence de l'aptamère 5'C12 greffé sur des particules de sépharose conditionnées en cartouche [146]. En fait, la sélectivité résultant du mécanisme de

liaison de l'analyte cible à son aptamère, *i.e.* par appariement de bases associé à une conformation spéciale de la séquence de l'aptamère en présence de l'analyte cible, est tellement élevée que cet aptamère peut être utilisé pour séparer l'OTA de son analogue. En conséquence, la rétention de l'OTB sur le mOS<sub>4</sub> spécifique de l'OTA, préparé *via* un protocole similaire à celui appliqué pour la préparation des mOS précédents, a été étudiée pour confirmer la spécificité du système miniaturisé pour l'OTA. Ce mOS a été couplé en ligne à la nanoLC-LIF via le montage présenté en partie 3.4 en page 187. Des échantillons de tampon BB, dopés à 800 ng/mL d'OTB ou d'OTA ont été injectés sur le système mOS/nanoLC-LIF (boucle d'injection = 250 nL). Pour mettre en évidence, différentes injections ont été réalisées en augmentant le volume de lavage de manière à étudier plus amplement le comportement de l'OTB sur le mOS<sub>4</sub>. La Figure 75-A présente les rendements d'extraction de l'OTB et de l'OTA obtenus après application de différents volumes de lavage avec du tampon BB.

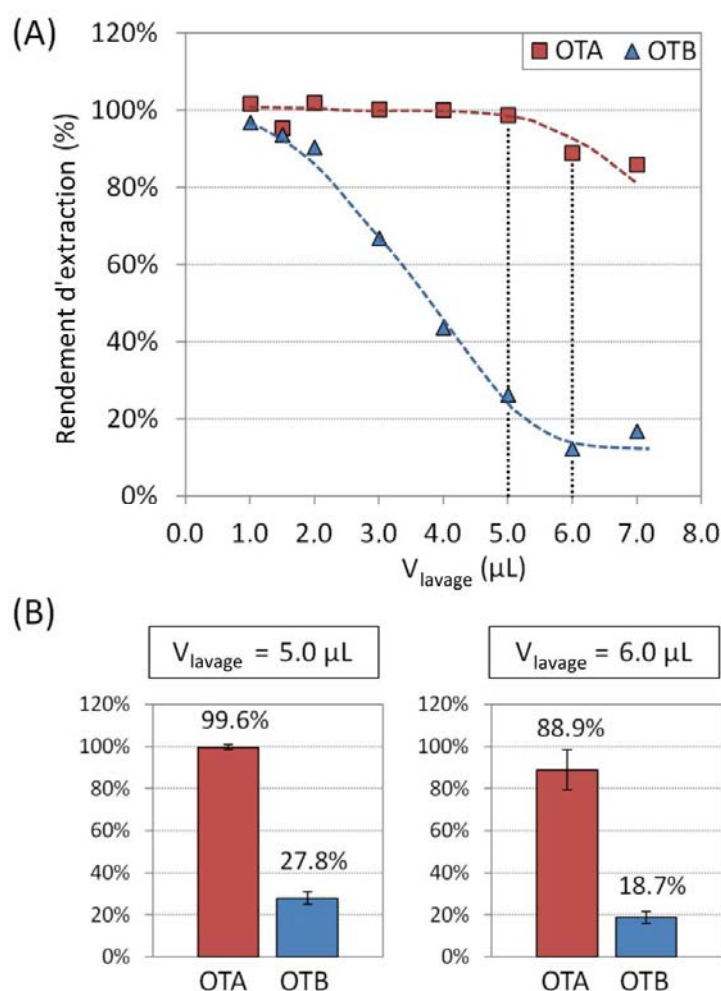


Figure 75 : (A) Rendements d'extraction de l'OTB sur le mOS<sub>4</sub> (70 x 0,1 mm d.i.) spécifique de l'OTA, couplé en ligne avec la nanoLC-LIF, après percolation de volumes croissants de tampon de lavage : tampon BB (Tris-HCl (10 mM), NaCl (120 mM), KCl (5 mM) et CaCl<sub>2</sub> (20 mM)). Injection de 250 nL de BB dopés à 800 ng/mL d'OTB (*n* = 1). (B) Rendements d'extraction de l'OTA et l'OTB sur le mOS<sub>4</sub> couplé en ligne avec la nanoLC-LIF après lavage avec 6,0 µL de BB. Injection de 250 nL de BB dopé à 800 ng/mL d'OTB et OTA (*n* = 3).

Il est visible que la rétention de l'OTB sur le mOS chute rapidement au-delà de 2,0  $\mu\text{L}$  de lavage comme précédemment observé pour des préconcentrations d'OTA sur des capillaires contrôles. Le rendement d'extraction après lavage avec 5,0  $\mu\text{L}$  de BB est égal à 27,8%, très proche du rendement précédemment rapporté pour le contrôle<sub>3</sub> (cf. Tableau 11). A l'inverse, l'OTA s'est avérée être retenue avec de très bons rendements d'extraction, proches de 100 % jusqu'à ce même volume de lavage de 5,0  $\mu\text{L}$ . Un rendement de 27,8% d'OTB sur le mOS avec un volume de lavage de 5,0  $\mu\text{L}$  n'étant pas complètement satisfaisant, deux autres volumes plus élevés ont été cette fois envisagés : 6,0 et 7,0  $\mu\text{L}$ . Il est visible que la rétention de l'OTA reste très élevée sur ce mOS avec des rendements de 96,2% et 85,9% respectivement après un lavage avec 6,0 ou 7,0  $\mu\text{L}$ . A l'inverse la rétention de l'OTB continue elle de diminuer jusqu'à des valeurs de 12,3% et 17,0%. Un volume de 6,0  $\mu\text{L}$  semble donc suffisant pour éliminer presque intégralement l'OTB retenue sur le mOS<sub>4</sub>.

L'extraction de l'OTB et de l'OTA a finalement été réalisée en triplicat avec un lavage avec 5,0 et 6,0  $\mu\text{L}$  de BB. Les résultats sont présentés en Figure 75-B. Il est visible que des rendements très élevés de  $99,6\% \pm 1,2\%$  et  $88,9\% \pm 9,6\%$  ont été obtenus pour l'OTA contre des rendements faibles de seulement  $27,8\% \pm 9,6\%$  et  $18,7\% \pm 6,0\%$  observés pour l'OTB sur le même mOS. Le lavage réduit fortement les interactions développées entre le support et l'OTB. Le système miniaturisé s'est ainsi révélé très spécifique de l'OTA et ne présente aucune réactivité croisée pour l'OTB. Cette forte spécificité pour l'OTA confirme que des aptamères ont été greffés avec succès sur le monolithe hybride à base de silice et que l'analyse totale et en ligne de petites molécules via le couplage d'un système d'oligoextraction miniaturisé avec la nanoLC est possible.

## 4.5 Détermination de la capacité et du taux de greffage

### 4.5.1 Evaluation du taux de greffage

#### 4.5.1.1 Méthode de dosage

Comme pour les anticorps, la quantité totale d'aptamères greffés a été déterminée indirectement en analysant la quantité d'aptamères non immobilisés restante dans les différentes solutions percolées au travers des mOS au cours de la procédure de greffage. Cette procédure de greffage et la collecte des solutions percolées comprend plusieurs phases. Une première phase consiste à collecter les 60  $\mu\text{L}$  de solution d'aptamères à 1 g/L percolée à travers le monolithe en capillaire (10 cm x 0,1 mm d.i.) puis la solution issue du rinçage avec 6,0  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 100 mM, pH 8,0. La deuxième phase consiste ensuite à collecter les solutions de rinçage de tampon BB contenant 5 mg/mL de  $\text{NaCNBH}_3$  puis de tampon BB. Enfin, la troisième phase correspond à la solution de rinçage du capillaire avec une phase hydro-organique constituée d'eau/acétonitrile (70/30, v/v) utilisée de manière à éliminer les derniers aptamères potentiellement adsorbés de façon non covalente à la surface du monolithe. Ces solutions sont à chaque fois récupérées en sortie du

capillaire grâce à un système utilisant une seringue sans piston. Chacune de ces trois phases est ensuite introduite dans un insert, évaporée sous azote et reprise dans un volume connu d'eau de manière à pouvoir déterminer précisément la quantité d'aptamères présente dans chacune des phases. L'ensemble des analyses ont été effectuées par chromatographie liquide de paires d'ions sur colonne C18 (avec l'ion triéthylammonium comme agent d'appariement) couplée à une détection UV. Cette méthode, développée au cours d'un précédent projet de thèse doctorale au LSABM [376], est décrite en Annexe 6. La séparation est réalisée en utilisant un gradient d'acétonitrile de 7 à 14,5% en 30 min. Des chromatogrammes résultants de l'injection de solutions d'aptamères spécifiques de l'OTA et de la cocaïne sont représentés en Figure 76. Un temps de rétention moyen de 33,6 min a été obtenu avec cette méthode pour les deux aptamères. Une limite de quantification située autour de 0,5 µg/mL a été observée pour chacun des aptamères ( $S/N \approx 10$ ).

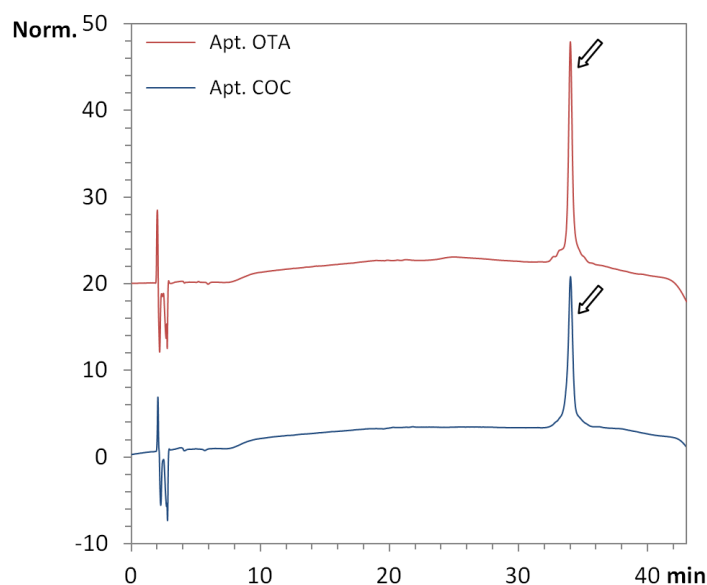


**Figure 76 :** Chromatogrammes correspondant à l'injection d'aptamères anti-OTA et anti-cocaïne (COC) avec espaceur C12. La quantité injectée correspond à l'injection de la solution de greffage diluée 400 fois (2,5 µg/mL). Volume injecté : 25 µL.

Ces quantifications ont tout d'abord montré que quel que soit l'aptamère considéré, la quantité d'aptamères retrouvés dans les solutions de rinçage est inférieure à la limite de quantification. Ainsi, la quantité maximale d'aptamères présente dans les solutions de la phase 2 et 3 est respectivement de 35 ng et 50 ng, *i.e.* seulement 0,06% et 0,08% de la quantité d'aptamères initialement percolée. Ceci montre que très peu d'aptamères restent simplement adsorbés à la surface du monolithe après la première phase de rinçage au tampon phosphate. Le fait que peu d'aptamères soient retrouvés dans la phase 3 qui consiste en un rinçage avec une phase hydro-organique semble indiquer qu'aucun aptamère ne reste simplement adsorbé à la surface du monolithe après l'ensemble des rinçages. Les analyses menées sur les solutions résultantes de la phase 1 ont donc permis de mesurer la quantité d'aptamères récupérés en sortie du capillaire après greffage et de calculer les densités volumétriques d'aptamères dans les capillaires monolithiques.

## 4.5.1.2 Résultats

Les dosages effectués sur les différentes solutions issues du greffage des aptamères ont permis de calculer les taux de greffage des aptamères sur les mOS<sub>3</sub>, mOS<sub>4</sub> et sur un cinquième mOS (non caractérisé par couplage en ligne jusqu'à maintenant) ainsi que sur les trois capillaires contrôles présentés ci-avant. Les taux de greffage mesurés et les conditions de greffage utilisées pour chaque aptamère sont comparés dans le Tableau 12 avec les résultats obtenus par Deng *et al* [237] pour le greffage d'aptamères spécifiques de la thrombine et avec ceux obtenus dans le chapitre 3 pour le greffage d'anticorps et le développement des mIS.

**Tableau 12 :** Taux de greffage des biomolécules (aptamères et anticorps) et capacité des mOS, supports contrôle, mIS et colonnes d'affinité développées par Deng *et al* [237]. Comparaison des conditions de greffage et rendements de greffage.

|                                                      | mOS                               | contrôle                          | Deng <i>et al</i> [237]       | mIS                          |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Analyte cible                                        | OTA                               | Cocaine                           | Thrombine                     | MC-LR                        |
| Biomolécule greffée                                  | aptamère                          | aptamère                          | aptamère                      | anticorps                    |
| Modification/Espaceur                                | NH <sub>2</sub> / 5'C12           | NH <sub>2</sub> / 5'C12           | NH <sub>2</sub> / 5'C6        | -                            |
| Masse biomolécule                                    | 11.6 kDa                          | 12.1 kDa                          | 9.3 kDa                       | 150 kDa                      |
| Densité de greffage (nmol biom. $\mu\text{L}^{-1}$ ) | 6.27 $\pm$ 0,38                   | 5.14 $\pm$ 0.54                   | 0.568                         | 0.026                        |
| C.V (n = 3)                                          | 6.10%                             | 10.50%                            | 13.50%                        | -                            |
| <u>Conditions de greffage</u>                        |                                   |                                   |                               |                              |
| d.i. capillaire                                      | 100 $\mu\text{m}$                 | 100 $\mu\text{m}$                 | 250 $\mu\text{m}$             | 100 $\mu\text{m}$            |
| Longueur capillaire                                  | 10 cm                             | 10 cm                             | 10 cm                         | 4.5 cm                       |
| Activation                                           | 16 h                              | 16 h                              | n.c.                          | 16 h                         |
| T° greffage                                          | T° amb                            | T° amb                            | 4 °C                          | T° amb                       |
| Durée du greffage                                    | 25 h                              | 25 h                              | 24 h                          | 24 h                         |
| C° biomolécule                                       | 86.4 $\mu\text{M}$                | 82.7 $\mu\text{M}$                | 25 $\mu\text{M}$              | 6.7 $\mu\text{M}$            |
| Qté <sub>biom. perc.</sub>                           | 5.2 nmol                          | 5.0 nmol                          | 5.7 nmol                      | 0.13 nmol                    |
| Qté <sub>biom. perc.</sub> /V <sub>cap</sub>         | 6.6 nmol $\mu\text{L}^{-1}$       | 6.3 nmol $\mu\text{L}^{-1}$       | 1.2 nmol $\mu\text{L}^{-1}$ * | 0.38 nmol $\mu\text{L}^{-1}$ |
| Rendement de greffage                                | <b>96.4 <math>\pm</math> 1.6%</b> | <b>83.3 <math>\pm</math> 9.1%</b> | <b>48.9 %*</b>                | <b>7.0%</b>                  |

biom. = biomolécule. C°<sub>biomolécule</sub> = concentration en biomolécules dans la solution de greffage. V<sub>cap</sub> = volume du capillaire vide. Qté<sub>biom. perc.</sub> = quantité totale de biomolécules percolées, Qté<sub>biom. perc.</sub> / V<sub>cap</sub> = densité volumétrique maximale théoriquement atteignable. T°<sub>amb.</sub> = température ambiante. \*valeur déduite des données fournies.

Tel que reporté dans le Tableau 12, la densité volumétrique d'aptamères immobilisés dans les capillaires a été déterminées comme étant égale à  $6,27 \pm 0,38$  nmol/ $\mu$ L (C.V = 6,1%, n = 3) d'aptamères anti-OTA sur les mOS et  $5,14 \pm 0,54$  nmol/ $\mu$ L (C.V = 10,5%, n = 3) d'aptamères anti-cocaine dans les capillaires contrôles. Ces résultats sont de 9 à 11 fois supérieurs à la densité rapportée par Deng *et al* lors de l'immobilisation d'aptamères anti-thrombine sur des colonnes capillaires monolithiques de 250  $\mu$ m d.i. [237]. En effet, ces auteurs ont rapporté une densité de 0,568 nmol/ $\mu$ L en dosant l'ensemble des solutions utilisées au cours du greffage par absorbance UV à 260 nm. Cette grande différence résulte probablement de la percolation de quantités similaires d'aptamères (5,2 et 5,2 nmol contre 5,7 nmol) pour un volume de capillaire bien plus faible dans notre cas mais aussi d'une concentration molaire en aptamères de l'ordre de 3,3 à 3,5 fois plus élevée dans les solutions de greffage utilisées dans notre étude (86,4  $\mu$ M et 82,7  $\mu$ M contre 25  $\mu$ M). Il est ainsi visible dans le Tableau 12 que la densité volumétrique maximale qui aurait pu être atteinte si tous les aptamères avaient été greffés (*i.e.* le ratio entre la quantité d'aptamères percolée et le volume du capillaire,  $Q_{\text{éapt. perc.}}/V_{\text{cap.}}$ ) est respectivement de 6,6 nmol/ $\mu$ L et 6,3 nmol/ $\mu$ L pour les aptamères anti-OTA et anti-cocaine. Ceci est 5 à 6 fois plus élevé que la valeur qui peut être estimée par les données fournies par Deng *et al*, *i.e.* 1,2 nmol/ $\mu$ L. Un rendement de greffage d'environ 48,9% pour les aptamères anti-thrombine a été calculé avec cette valeur [237]. Ce rendement est 1,7 et 2 fois plus faible que les rendements obtenus pour les aptamères anti-cocaine et anti-OTA. Ces rendements de greffage sont en effet de  $96,4\% \pm 1,6\%$  et  $83,3\% \pm 9,1\%$  pour les mOS correspondants. Cette différence peut être en partie expliquée par l'effet de la longueur du bras espaceur, qui est plus long dans notre étude (Tableau 12), sur l'accessibilité du groupement amine comme précédemment rapporté par notre équipe sur des OS sous forme de particules de sépharose greffées et conditionnées en cartouche [148]. De plus, aucune indication n'est donnée par Deng *et al* sur la durée de l'étape d'activation au glutaraldéhyde. Dans des études précédentes du même groupe [269], les colonnes capillaires ont été activées pendant 6h contre 16h dans notre étude. Il est possible qu'une activation plus longue permette d'accroître le nombre de sites activés accessibles à l'immobilisation, augmentant ainsi le rendement de greffage des aptamères et la quantité totale d'aptamères greffés. D'autres paramètres, tels que la température ou la vitesse linéaire de percolation des solutions de greffage pourraient aussi avoir un impact mais restent à évaluer. Il peut ainsi être déterminé à partir des données fournies par Deng *et al* que le volume de solution d'aptamères percolé est de l'ordre de 228  $\mu$ L. Le greffage étant réalisé sur 24 h, ce volume permet de calculer un débit d'environ 160 nL/min, *i.e.* une vitesse linéaire en entrée du capillaire (250  $\mu$ m d.i.) de 3,2 mm/min. Dans notre étude, cette même vitesse est de 5,1 mm/min avec un débit de 40 nL/min et un capillaire de 100  $\mu$ m d.i.. Le greffage de Deng *et al* a donc été réalisé en utilisant une vitesse linéaire plus faible ce qui pourrait favoriser la cinétique de greffage bien qu'ici la comparaison directe avec nos données soient rendue difficile par l'utilisation de conditions d'immobilisation différentes en termes de concentration et de bras espaceur. Des études futures pourraient

justement consister à réaliser des comparaisons rigoureuses des taux de greffage des aptamères sur des monolithes en capillaire en travaillant dans des conditions strictement identiques.

Enfin, la comparaison du taux de greffage des anticorps avec ceux des aptamères reportés dans le Tableau 12 laissent supposer que la plus faible taille des aptamères permet à ces derniers un meilleur accès à l'ensemble des sites de liaison à la surface du monolithe et surtout diminue l'encombrement stérique permettant ainsi d'améliorer considérablement la densité d'aptamères greffées au sein du capillaire. En effet, la plus faible valeur de densité de greffage d'aptamères (0,568 nmol/ $\mu$ L, rapportée par Deng *et al*) reste de l'ordre de 22 fois plus élevée que celle mesurée dans le chapitre précédent pour les anticorps (0,026 nmol/ $\mu$ L) et rappelée dans ce tableau. Cependant, une fois encore ces résultats restent à confirmer puisque la concentration molaire d'anticorps utilisé au cours du greffage ainsi que la quantité totale de biomolécules percolées sont bien inférieures à celles utilisées pour l'étude du greffage d'aptamères et que les monolithes utilisés pour le greffage des anticorps ont une perméabilité de l'ordre de trois fois inférieure, *i.e.* une macroporosité plus faible pouvant gêner la diffusion de biomolécules de grande taille.

#### 4.5.2 Capacité

Les résultats précédents ont montré que la densité volumétrique d'aptamères s'est avérée très élevée et semble être cohérente avec le greffage d'aptamères anti-thrombine rapporté précédemment. Cependant, cette expérience permet uniquement d'estimer la quantité d'aptamères immobilisés sans aucune information sur la réelle proportion d'aptamères actifs, *i.e.* d'aptamères capables de piéger sélectivement l'OTA. En effet, comme pour les anticorps, certains aptamères peuvent être immobilisés dans une mauvaise orientation, ou liés au monolithe en plusieurs points (par des groupements amines de bases azotées) les empêchant d'adopter la conformation adéquate pour la liaison avec l'OTA. Des mesures de capacité ont donc été envisagées pour évaluer la quantité d'aptamères actifs immobilisés. Pour rappel, la capacité correspond à la quantité maximale d'OTA qui peut être retenue sur le mOS sans observer de perte de rétention pour une procédure donnée. Elle est directement liée au nombre d'aptamères actifs et accessibles greffés à la surface des pores du monolithe. Des solutions de BB (inj = 250 nL) dopées avec des quantités croissantes d'OTA, de 12,5 pg à 5,0 ng, ont été préconcentrées en ligne sur le mOS<sub>1</sub> et un volume de lavage de 5,0  $\mu$ L a été appliqué. Cette limite haute de 5,0 ng a été fixée de manière à empêcher la saturation du détecteur et de la colonne analytique. En parallèle, des préconcentrations sur le contrôle<sub>1</sub> ont également été menées sur le même domaine de concentrations. Les résultats de ces préconcentrations sont présentés sur les courbes de la Figure 77.

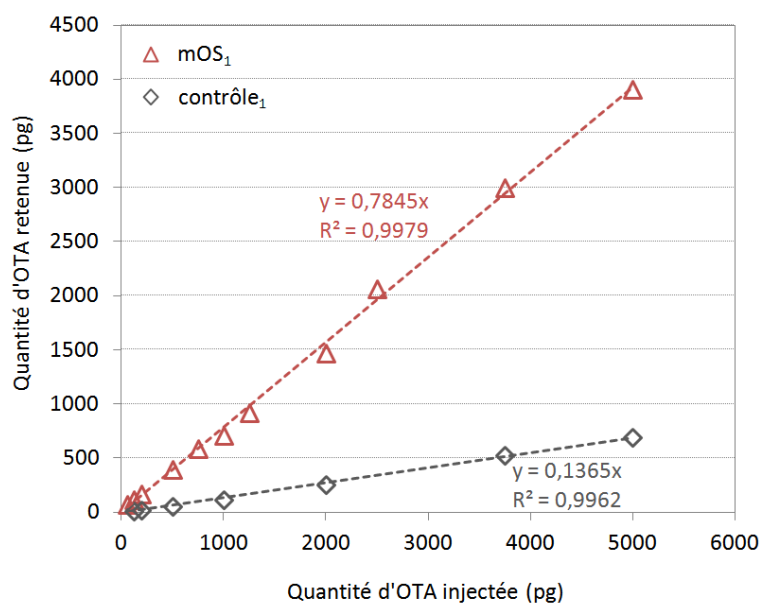


**Figure 77 :** Evolution de la quantité d'OTA retenue sur le mOS<sub>1</sub> et sur le contrôle<sub>1</sub> en fonction de la quantité d'OTA injectée dans du tampon BB. Volume d'injection = 250 nL. Volume de lavage = 5,0 µL de BB.

Il est visible tout d'abord que les pentes obtenues sur le mOS<sub>1</sub> et sur le contrôle<sub>1</sub> sont très différentes. En effet, une pente de 78,5% est observé sur le mOS<sub>1</sub> contre une pente de seulement 13,7% sur le contrôle<sub>1</sub>. Ces résultats représentent le rendement d'extraction moyen sur chacun de ces supports et sont cohérents avec les rendements qui avaient été obtenus précédemment sur ces mêmes supports en un point de concentration donné de 800 ng/mL d'OTA (Figure 74). Il est surtout visible qu'aucune chute de rendements n'est observée pour cet intervalle de concentration. Une chute de rendements aurait impliqué l'observation d'une rupture de pente dans le cas du mOS<sub>1</sub>, pente qui devrait théoriquement chuter à environ 13%, rendement équivalent à celui du contrôle. La capacité est donc supérieure à 5,0 ng, *i.e.* supérieure à 22,5 pmol/µL d'aptamères actifs. Cette capacité est comparée à celle obtenue par Deng *et al* [237] et à celle des mIS dans le Tableau 13.

**Tableau 13 :** Capacité des mOS, mIS et colonnes d'affinité développées par Deng *et al* [237]. Rappel des taux de greffage et densité volumétrique de biomolécules mesurées.

|                                                    | mOS                       | Deng <i>et al</i> [237]     | mIS                        |
|----------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Biomolécule greffée                                | aptamère                  | aptamère                    | anticorps                  |
| Masse biomolécule                                  | 11.6 kDa                  | 9.3 kDa                     | 150 kDa                    |
| Densité de greffage (nmol biom. µL <sup>-1</sup> ) | 6.27 ± 0,38               | 0.568                       | 0.026                      |
| Qté <sub>biom. perc.</sub> /V <sub>cap</sub>       | 6.6 nmol µL <sup>-1</sup> | 1.2 nmol µL <sup>-1</sup> * | 0.38 nmol µL <sup>-1</sup> |
| Capacité (pmol biom. µL <sup>-1</sup> )            | ≥ 22.5                    | 31.2                        | ≤ 1.6                      |
| Rendement de greffage                              | 96.4 ± 1.6%               | 48.9 %*                     | 7.0%                       |

biom. = biomolécule. V<sub>cap</sub> = volume du capillaire vide. Qté<sub>biom. perc.</sub> = quantité totale de biomolécules percolées, Qté<sub>biom. perc.</sub>/V<sub>cap</sub> = densité volumétrique maximale théoriquement atteignable. \*valeur déduite des données fournies.



La valeur de 22,5 pmol/ $\mu$ L est plus élevée que pour le greffage d'anticorps. En effet, des valeurs inférieures à 1,6 pmol/ $\mu$ L d'anticorps actifs ont été mesurées au chapitre précédent (Tableau 13), i.e. 40 fois moins élevée que pour les aptamères. Les aptamères sont donc des outils puissants pour atteindre des capacités élevées en comparaison avec les anticorps du fait certainement de leur faible taille (9-12 kDa contre 150 kDa, soit un facteur 12 à 15). Cet effet sur la capacité n'avait d'ailleurs jamais pu être observé dans les précédentes études du LSABM menées au format conventionnel par greffage des biomolécules sur particules de sépharose activée CNBr, des capacités similaires ayant été obtenues que ce soit pour l'immobilisation d'anticorps ou d'aptamères [146]. L'échelle miniaturisée ajoutée à un protocole d'immobilisation consistant à percoler les solutions de biomolécules à travers les monolithes en capillaire permettent sans doute d'améliorer l'accès des biomolécules à l'ensemble des pores et donc la mise en contact de ces molécules avec les sites de liaison.

En outre, Deng *et al* ont rapporté une capacité de  $1,95 \times 10^{-24}$  mol/nm<sup>2</sup>, i.e. 31,2 pmol/ $\mu$ L, pour leur monolithe hybride en capillaire à base de silice (250  $\mu$ m i.d.) [237]. Cette valeur est égale à 5,4% de la quantité totale d'aptamères greffés rapportée dans la même étude. Pour un tel ratio, la capacité du mOS développé pour l'OTA serait égale à 339 pmol/ $\mu$ L, i.e. 56 ng d'OTA. Cette dernière valeur est bien plus élevée que des valeurs rapportées pour des colonnes particulières ( $33,8 \pm 3,2$  pmol/ $\mu$ L [140],  $204 \pm 23$  pmol/ $\mu$ L [172]) ou des approches en tube ouvert (5,6 pmol/ $\mu$ L [164]). Ceci met encore en évidence le fort potentiel de l'approche monolithique pour atteindre de grande capacité de liaison. Une diminution de la longueur de capillaire, qui a été surestimée au début de cette étude (par crainte de rendements d'immobilisation insuffisants), pourrait ainsi être envisagée à l'avenir de manière à améliorer la qualité du couplage en ligne avec la nanoLC.

## 5 Application à des échantillons réels

Le potentiel des mOS a clairement été démontré pour l'extraction sélective de l'OTA dans des matrices aqueuses pures au regard des faibles rendements obtenus sur les capillaires contrôles. L'extraction à partir de matrices complexes a ensuite été considérée. L'OTA est généralement recherchée dans des matrices alimentaires telles que les dérivées de céréales [146], le vin [102] ou la bière [345, 368]. Pour mettre en lumière la sélectivité dans des matrices complexes, un échantillon de bière, dont le contenu en éthanol (4,2%) est connu pour potentiellement affecter le mécanisme de rétention, a été choisi. En outre, l'aptamère prend sa conformation en présence d'un cation divalent (i.e. Ca<sup>2+</sup>) comme mentionné précédemment. Ceci implique de diluer les échantillons dans du tampon de liaison. Le Tableau 10 déjà présenté en page 185 référence les constantes d'affinité mesurées par Cruz-Aguado *et al* [138] en fonction de la nature et de la concentration du cation divalent utilisé dans le tampon de liaison. Il est visible que la constante de dissociation de l'aptamère

anti-OTA ( $K_D$ ) est égale à  $49 \pm 3$  nM et  $54 \pm 8$  nM pour des concentrations en ions  $\text{Ca}^{2+}$  respectivement de 20 mM et 10 mM en solution. Ces deux valeurs sont très similaires et ne semblent pas différentes au vu des écart-types observés sur chacune des mesures. Une dilution par un facteur 2 du tampon de liaison ne doit donc jouer que très peu sur l'affinité de l'aptamère pour sa cible. Des échantillons de bière ont donc été dilués seulement une fois avec du tampon BB (contenant 20 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ) pour obtenir une concentration finale de 10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  et 2,1% d'éthanol dans un mélange bière/BB (50/50).

Des solutions de bière/BB (50/50) et de BB dopées avec des quantités croissantes d'OTA (de 25 pg à 375 pg avec une boucle d'injection de 250 nL) ont été injectées directement sur la colonne analytique mais aussi préconcentrées sur le  $\text{mOS}_4$  couplé à la nanoLC-LIF en appliquant ensuite un volume de lavage de 6,0  $\mu\text{L}$ . Les chromatogrammes correspondant aux injections des échantillons de bière/BB dopés avec 75 pg d'OTA sont comparés en Figure 78 avec les chromatogrammes correspondant aux injections de tampon BB dopé.

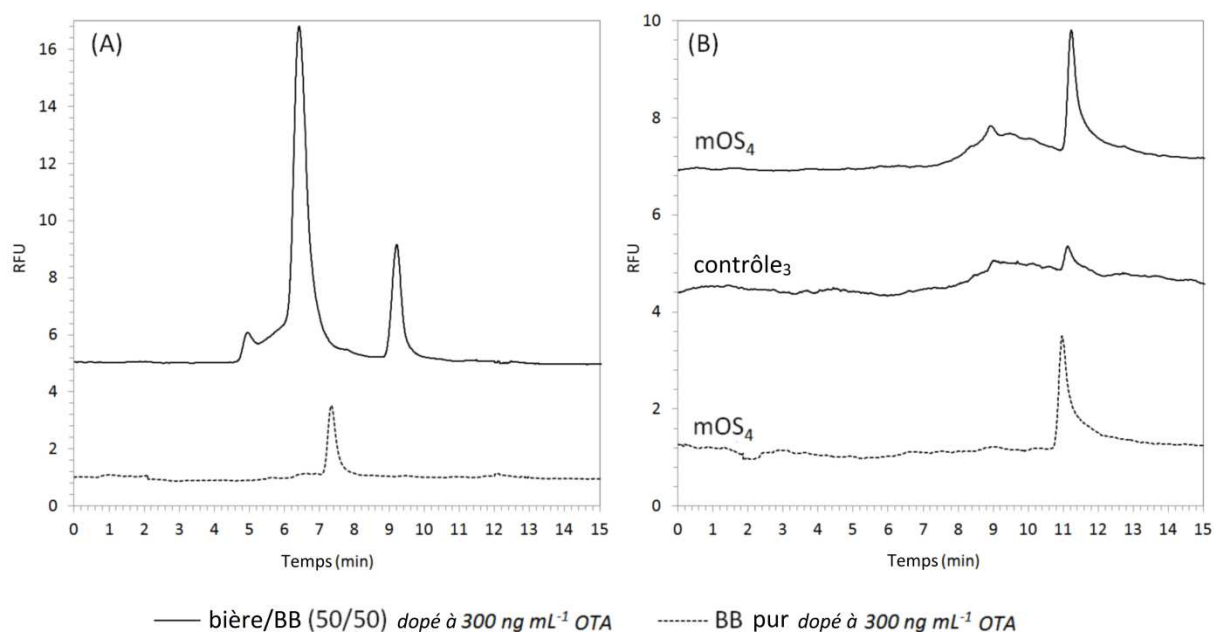


**Figure 78 :** Chromatogramme nanoLC correspondant à l'analyse de 250 nL de bière/BB (50/50) et de BB dopés avec 75 pg d'OTA. (A) Injection directe de chaque échantillon sur la colonne analytique. (B) Extraction de chaque échantillon sur le  $\text{mOS}_4$  et le  $\text{contrôle}_3$  couplé en ligne avec la nanoLC-LIF.

Bien que la détection par fluorescence induite par laser soit déjà sélective, le chromatogramme correspondant à l'injection directe de bière/BB (Figure 78-A) met en évidence la présence d'un certain nombre de composés interférents lorsque ce chromatogramme est comparé avec du BB dopé. Un pic très intense situé autour de 6,5 min est observé correspondant aux nombreux composés contenus dans la bière. De plus, le temps de rétention se trouve être retardé en comparaison avec du BB dopé avec de l'OTA et son écart-type augmente. Il est égal à  $7,38 \pm 0,09$  min dans le BB ( $n = 7$ , C.V. = 1,2 %) contre  $9,91 \pm 0,88$  min dans un mélange bière/BB ( $n = 7$ , C.V. = 8,9%).

Pour comparaison, l'OTA dans de l'eau pure (non montrée ici) présente un temps de rétention de  $6,77 \pm 0,07$  min ( $n = 7$ , C.V. = 1,1%). Le retard peut être attribué à une modification des interactions avec la colonne analytique du fait de la modification de la composition du tampon et particulièrement du pH de la solution injectée. En effet, le pH du mélange bière/BB considéré est d'environ 4,4 et celui du tampon BB d'environ 5,5. Le diagramme de distribution des différentes formes de l'ochratoxine A en fonction du pH est reporté en Figure 79.

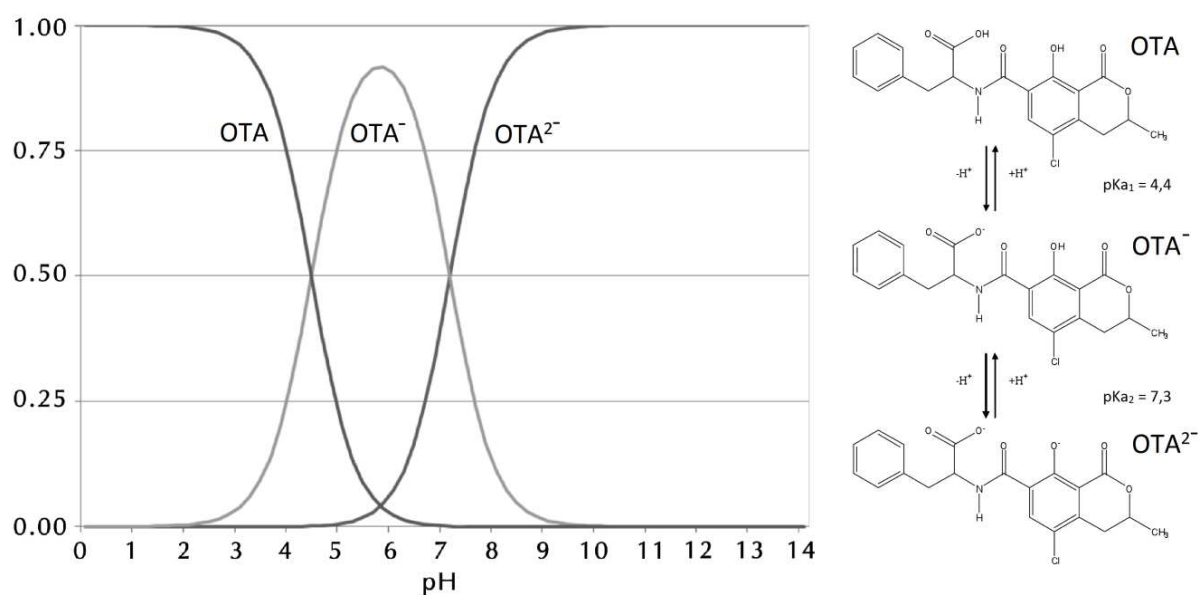


Figure 79 : Diagramme de distribution de l'ochratoxine A et structure de l'ochratoxine A dans différents intervalles de pH. Adapté de [357].

Il est visible que le ratio de la forme protonée de l'OTA est de l'ordre de 50 % à pH 4,4 (égal au pKa de l'acide carboxylique de l'OTA) contre moins de 10 % à pH 5,5. Le ratio de la forme déprotonée OTA<sup>-</sup> augmente lui de 50 à 90 %. La forme protonée (OTA) est donc bien plus présente dans un mélange bière/BB que dans le tampon BB pur. Il s'avère que le volume injecté (250 nL) est grand et représente environ 21% du volume  $V_0$  ( $\approx 1,18$   $\mu$ L) de la colonne analytique. De ce fait, la composition du tampon ou du solvant injecté perturbe fortement la composition de la phase mobile ce qui favorise ainsi la rétention de l'OTA en phase inverse dans les échantillons de bière/BB. A l'inverse, la comparaison entre l'injection de BB dopé et la préconcentration de bière/BB préconcentrés sur le mOS (Figure 78-B) confirme que les composés interférents sont principalement éliminés au cours des étapes de percolation et de lavage sur le mOS tandis que l'OTA est au contraire sélectivement retenue sur le système. Aucun retard du temps de rétention n'est observé en comparaison avec des injections de tampon BB dopé avec de l'OTA. En effet, lorsque la seconde nano-vanne est basculée pour éluer l'OTA retenue sur le mOS, l'OTA est contenue dans du tampon de liaison, *i.e.* le tampon utilisé lors de l'étape de lavage, quelle que soit la composition initiale de l'échantillon (bière/BB ou BB pur). De plus, l'OTA reste très faiblement retenue sur le contrôle<sub>3</sub> même dans des échantillons complexes.

En outre, en comparant les chromatogrammes correspondant aux échantillons de BB pur et de bière/BB en Figure 78-A, il est notable que la matrice affecte aussi l'aire du pic lorsque les échantillons sont injectés directement sur la colonne analytique. Pour étudier ce point, les courbes correspondant aux aires de pics obtenus en fonction de la quantité d'OTA sont rassemblées en Figure 80.

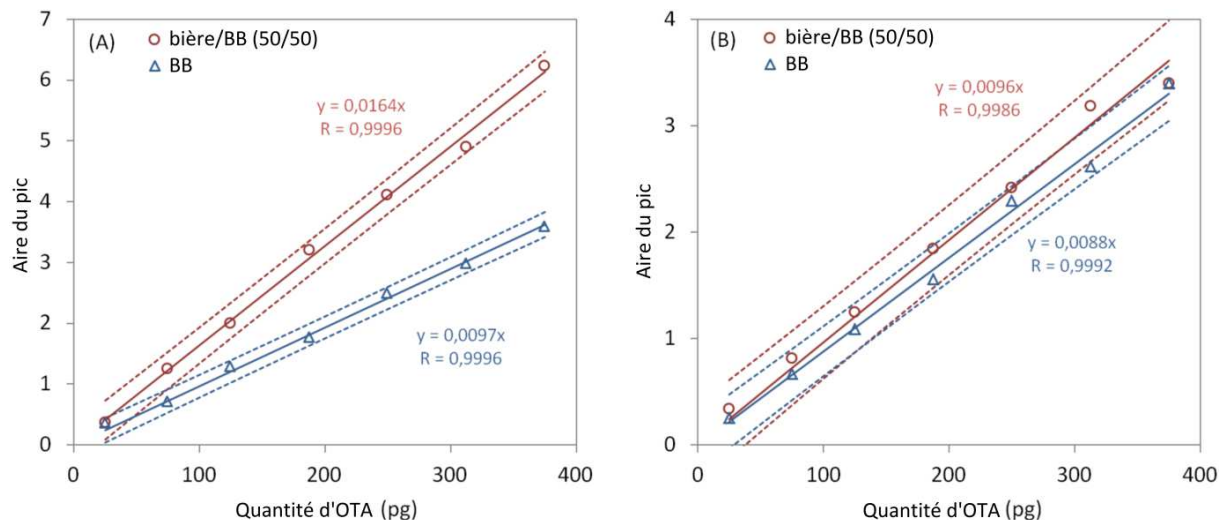


**Figure 80 :** Aire de pics de l'OTA obtenus par une détection LIF en fonction de la quantité d'OTA injectée dans deux types d'échantillons : bière/BB (50/50) (cercle) et BB pur (triangle). (A) Injection directe sur la colonne analytique. (B) Oligoextraction sur le mOS<sub>4</sub> couplée en ligne avec la nanoLC. Lignes en pointillés : hyperboles de confiance avec un risque de première espèce  $\alpha$  de 5%.

Il est visible que l'injection directe de bière/BB dopé avec de l'OTA sur la colonne cause une forte augmentation de l'aire de pic comparée avec des injections d'OTA dans du BB faussant ainsi sa quantification. Une pente de 0,0164 a été obtenue dans le premier cas contre 0,0097 dans le second, i.e. 1,7 fois plus faible. Des injections d'eau pure dopée ont aussi été réalisées (non montrée ici) et ont conduit à une pente 1,5 fois plus faible que dans du BB. Tout comme pour le temps de rétention, la composition du tampon peut avoir une forte influence sur les propriétés de fluorescence de l'OTA comme rapporté dans certaines études [357, 377]. Ceci peut interférer avec la quantification de l'OTA. A l'inverse, lorsque l'échantillon est purifié en injectant ces mêmes solutions sur le système mOS/nanoLC-LIF, les aires de pic obtenues avec le mélange bière/BB sont similaires aux aires obtenues lorsque l'OTA est contenue dans du BB pur. Les pentes des deux courbes ne sont pas significativement différentes (t-test,  $p = 0,12 > 0,05$ ) ce qui est mis en évidence par la superposition des intervalles de confiance à 95% délimités par les hyperboles de confiance à 95% des deux groupes de données en Figure 80-B. Le rendement d'extraction peut ainsi être estimé comme étant compris entre 90% et 99% dans ces deux types de matrices. Ceci est cohérent avec les rendements d'extraction obtenus précédemment (Figure 75-B) avec un lavage avec 6,0  $\mu$ L pour un échantillon de tampon BB pur dopé avec l'OTA mettant ainsi en évidence le fait que la matrice n'a aucun effet sur l'affinité de l'aptamère vis-à-vis de sa cible.

## 6 Régénération et réutilisation

La stabilité des supports s'est avérée bonne comme en témoigne les C.V. des mesures reportées dans ce chapitre. Comme évoqué, contrairement aux mIS, la régénération des supports a pu être réalisée rapidement en percolant à chaque fois 2  $\mu$ L de tampon BB au travers des mOS pendant 10 min. L'ensemble des injections a été réalisé tant que possible sans déconnecter le mOS considéré du montage. Les mOS<sub>1</sub>, mOS<sub>2</sub> et mOS<sub>3</sub> ont néanmoins été débranchés, scellés puis conservés dans du tampon BB à 4°C une fois avant d'être rebranchés au montage. Aucune perte de rétention n'a alors été observée par rapport à des injections réalisées avant de déconnecter le mOS. Au final, en comptant les percolations de tampon non dopé (servant de blanc), plus de 30 injections ont pu être réalisées sur le mOS<sub>1</sub>, 15 sur les mOS<sub>2</sub> et mOS<sub>3</sub> et plus de 50 préconcentrations sur le mOS<sub>4</sub> sans qu'aucune perte de rétention de l'OTA ne soit observée. Même après 7 préconcentrations d'échantillons du mélange bière/BB dopé avec l'OTA, les percolations dans du BB pur réalisées après l'ensemble de ces injections présente une pente avec un rendement d'extraction similaire à celui déjà obtenu en début d'utilisation. Tous ces éléments prouvent que les outils développés dans ce projet de thèse s'avèrent stable dans les conditions d'utilisation que nous avons utilisé (échantillon pur et échantillon de bière) et peuvent être réutilisés un grand nombre de fois.

## 7 Conclusions

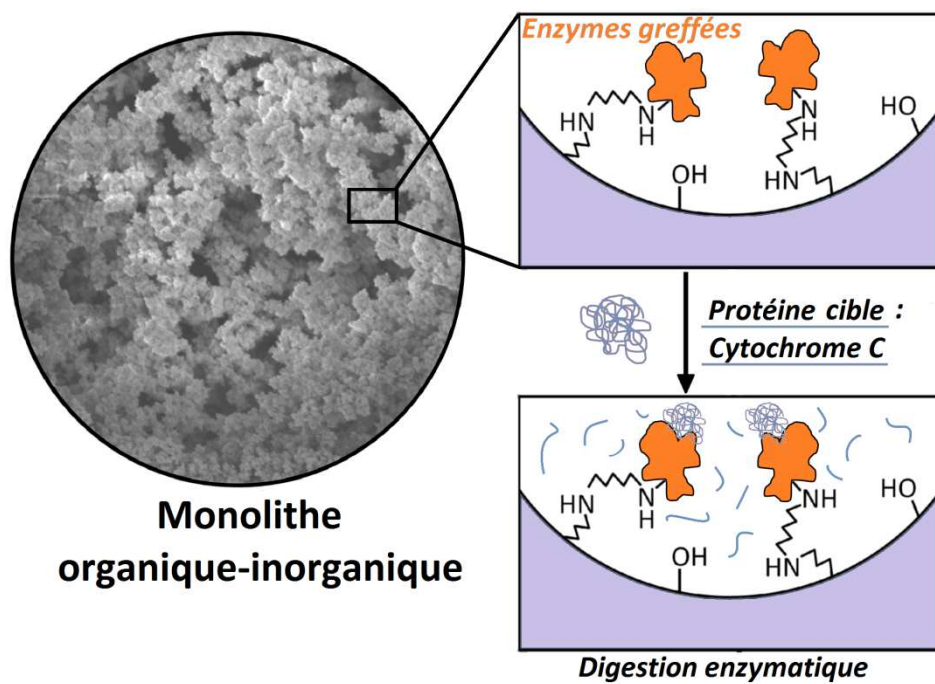
En conclusion de ce chapitre, nous avons développé un support miniaturisé sélectif basé sur l'immobilisation covalente d'un aptamère. Nous avons démontré que le monolithe hybride organique-inorganique synthétisé en capillaire au chapitre 2 pouvait être utilisé pour immobiliser un aptamère spécifique d'une petite molécule, l'ochratoxine A, de manière à développer un oligoadsorbant miniaturisé couplé à la nanoLC. La répétabilité de la préparation des supports a été mise en évidence. L'extraction sélective de l'OTA a été menée ensuite avec succès. La procédure d'extraction développée dans des milieux purs a permis d'obtenir des rendements d'extraction répétables et élevés. De plus, le taux de greffage s'est avéré très élevé permettant d'atteindre une densité volumétrique d'aptamère très élevée au sein du capillaire. La capacité n'a pas pu être atteinte et s'avère donc très élevée. Cette capacité élevée permet d'envisager à l'avenir de diminuer la longueur des mOS pour améliorer le couplage et donc augmenter la sensibilité. Ces systèmes miniaturisés ont ensuite été appliqués à l'extraction de l'OTA à partir d'échantillons complexes de bière témoignant de l'apport en sélectivité du support.

Cette approche pourrait maintenant être facilement adaptée au développement de mOS spécifiques d'autres molécules en changeant juste l'aptamère greffé et le type de détection. D'autre part, maintenant que des outils hautement sélectifs ont pu être mis en place pour des petites

molécules, il pourrait tout à fait être envisagé d'appliquer ces outils miniaturisés à l'extraction de protéines. Cette application implique un couplage avec la spectrométrie de masse et surtout le développement de microréacteurs permettant la digestion des protéines en peptides en amont de l'analyse et nécessite l'immobilisation d'autres biomolécules d'intérêt analytique : les enzymes. Cette application a fait l'objet du chapitre 5.



## Chapitre 5 – Développement de microréacteurs enzymatiques pour l'analyse de protéines





# 1 Introduction

Dans les chapitres précédents, une caractérisation complète d'outils sélectifs bioanalytiques basés sur le greffage d'anticorps ou d'aptamères a été réalisée. Il a été montré que ces outils pouvaient être appliqués à l'extraction sélective de molécules de faibles poids moléculaires et couplés en ligne à la nanoLC et à une détection simple par absorbance UV ou par fluorescence. L'objet de ce dernier chapitre est maintenant de transposer les outils miniaturisés développés dans les chapitres précédents à l'extraction sélective et à l'analyse totale en ligne de protéines.

La plupart des biomarqueurs sont sécrétés dans le plasma à de très faibles concentrations [378]. Du fait de la complexité de tels échantillons, l'analyse d'une protéine ciblée dans des échantillons biologiques nécessite généralement une étape d'extraction sélective de la protéine avant de pouvoir procéder à son analyse proprement dite. Il existe ensuite deux stratégies pour l'analyse des protéines : du haut vers le bas (*top-down*) et du bas vers le haut (*bottom-up*) [379]. Dans l'approche *top-down*, un mélange protéique est séparé en plusieurs fractions contenant une ou plusieurs protéines et chaque fraction est analysée séparément par spectrométrie de masse. Toutefois, les protéines étant identifiées par leur masse moléculaire, cette approche nécessite des spectromètres de masse hautement résolutifs. L'approche *bottom-up*, quant à elle, consiste à réaliser une étape de digestion des protéines avant analyse. Cette étape permet de cliver les protéines (isolées ou en mélange) au moyen d'une enzyme protéolytique pour produire des fragments peptidiques qui peuvent ensuite être analysés par LC-MS<sup>2</sup> en utilisant des spectromètres de masse moins résolutifs. L'attribution de chaque peptide détecté peut être réalisée par comparaison des masses expérimentales aux masses théoriques des peptides générés *in silico* par les banques de données informatiques. Cette technique permet ainsi l'identification des peptides qui sont attribués à chaque protéine digérée.

Dans les études protéomiques, la trypsine est l'enzyme protéolytique de loin la plus utilisée pour les digestions enzymatiques. Elle a un pH optimal d'activité compris entre 7,5 et 8,5 en présence de sels (tampons salins). Il s'agit d'une protéase de poids moléculaire de 23 kDa qui clive spécifiquement à l'extrémité C-terminal des résidus lysine et arginine [380]. Deux autres enzymes, la chymotrypsine et la pepsine sont aussi utilisées, mais moins fréquemment, principalement du fait de leur spécificité plus faible [380]. La pepsine, protéase de 34,5 kDa synthétisée dans l'estomac, est active à pH acide (pH 1-3). Bien que moins spécifique que la trypsine, elle coupe préférentiellement les liaisons peptidiques dans lesquelles sont engagés des acides aminés aromatiques phénylalanine, tyrosine, tryptophane et leucine [381]. Les ruptures sont d'ailleurs plus spécifiques à pH 1,3 au niveau des résidus phénylalanine et leucine. Cette spécificité est plus faible pour des pH supérieurs à 2. Comme déjà mentionné au chapitre 1, l'analyse de protéines est très généralement réalisée via cette approche dite *bottom-up* avec une étape de digestion en solution. Cette digestion en solution peut durer en général 16h voire plus. Cette étape très chronophage et non automatisée rend de ce

fait l'analyse fastidieuse. De plus, les enzymes de digestion utilisées (*i.e.* trypsine, pepsine, chymotrypsine) peuvent subir un phénomène d'autolyse qui peut produire des peptides pouvant interférer lors de l'analyse et la détection des peptides d'intérêt issus de la digestion de la protéine cible [380]. De manière à contourner ce problème, l'immobilisation des enzymes a été envisagée dans de nombreuses études [203, 282, 380, 382]. Cette immobilisation présente de nombreux avantages tels que l'absence d'autolyse, une réutilisation possible des supports et enfin une cinétique de digestion bien plus élevée [380].

L'immobilisation d'enzymes a jusqu'à maintenant été principalement envisagée, tout comme pour les autres biomolécules, sur monolithe organique et notamment sur des monolithes à base de GMA dans des formats conventionnels (disques, précolonnes) ou des capillaires (< 100 µm d.i.) [203, 282, 382]. Peu d'études référencent l'immobilisation d'enzymes protéolytiques sur des monolithes à base de silice [203, 282, 382]. Cette immobilisation a pour le moment été considérée principalement *via* des approches par encapsulation [258]. Des études ont tout de même fait référence au greffage d'enzymes sur des monolithes à base de silice, notamment des monolithes hybrides. L'étude de Ma *et al* déjà évoquée au cours du chapitre 2 décrit le greffage de trypsine sur un monolithe hybride organique-inorganique à base de TEOS et d'APTES en capillaire de 100 µm de diamètre interne. Les auteurs y ont démontré le succès du greffage par digestion de myoglobine suivie par une analyse par µLC-MS en différé [269]. Des recouvrements de séquence supérieurs à 90 % ont ainsi été mesurés par comparaison avec les bases de données pour une durée de digestion réduite à seulement 30 secondes sur le microréacteur contre 12 heures en solution. La quantité de trypsine greffée a de plus été déterminée comme étant égale à 1,3 µg sur un monolithe en capillaire de 1 cm [269]. Plus récemment, la même équipe a également immobilisé de la trypsine sur un monolithe hybride organique-inorganique à base de TEOS et d'un conjugué de l'acide iminodiacétique et de glycidoxypropyltriméthoxysilane [383]. Après activation au Cu<sup>2+</sup>, la trypsine a été immobilisée *via* chélation avec les ions cuivriques, cependant ce type de liaison reste plus faible qu'une liaison covalente et la trypsine peut être éluée du support et dans ce cas ré-immobilisée [383]. Là encore l'efficacité de la digestion a été caractérisée par la digestion de deux protéines modèles, la myoglobine et la BSA avec une analyse par LC-MS<sup>2</sup> en différé et comparaison des recouvrements de séquence après digestion sur microréacteur (50 sec) et en solution (12 heures). La quantité de trypsine greffée s'est avérée être de 1 µg/cm de capillaire *via* cette approche. Ces digesteurs enzymatiques (IMER pour *IMmobilized Enzyme Reactor*) au format miniaturisé à base de monolithe hybride n'ont cependant pas encore été couplés avec des méthodes séparatives tout comme avec des outils sélectifs miniaturisés. D'autre part, que ce soit au format conventionnel ou au format miniaturisé, l'enzyme de loin la plus utilisée dans les études relatant l'immobilisation de telles biomolécules est la trypsine [203, 282, 380, 382].

Une étude menée au cours d'une thèse doctorale soutenue en 2009 au LSABM a montré que des digestions sur des supports faits d'enzymes (trypsine ou pepsine) immobilisées sur des billes de sépharose conditionnées en précolonne (20 x 2 mm d.i.) pour l'analyse totale en ligne d'une

protéine modèle, le cytochrome C (CYC), pouvaient être réalisées en seulement 20 min de façon à obtenir des rendements de digestion similaires à ceux obtenus après 16h de digestion en solution [86, 87, 384]. Ce support a de plus été couplé en ligne avec une analyse par LC-MS<sup>2</sup> ainsi qu'avec un IS à base de particules de sépharose conditionnées en précolonne spécifique du CYC placé en amont de l'IMER. L'objectif de cette partie du projet est donc maintenant de miniaturiser ce type d'approche en mettant à profit les outils sélectifs miniaturisés développés dans les chapitres précédents pour des molécules de faible poids moléculaire et en ayant pour but le développement d'un système comparable à celui présenté en Figure 81.

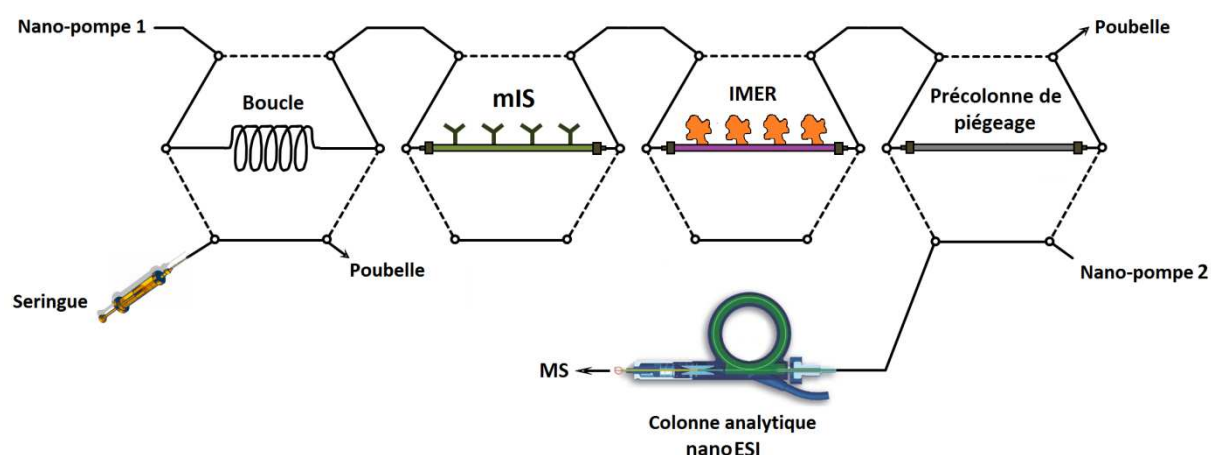


**Figure 81** : Schéma de principe du montage permettant l'analyse totale et miniaturisée en ligne d'une protéine cible, i.e. objectif final de ce projet de thèse.

Après injection d'un échantillon complexe (par exemple de plasma ou sérum) dans lequel la protéine cible est contenue, cette dernière est extraite sélectivement par un outil sélectif miniaturisé. Pour cette partie du projet nous avons tout d'abord choisi, à termes, de coupler un mIS spécifique d'une protéine. Une fois la protéine extraite et l'étape de lavage nécessaire à l'élimination des composés interférents de la matrice réalisée, l'interaction spécifique liant les anticorps à leur cible doit être rompue et la protéine transférée vers l'IMER. Un arrêt du débit (*stop flow*) doit alors être réalisé de manière à procéder à la digestion en peptides de cette protéine dans l'IMER. De plus, les conditions d'élution de la protéine cible sur le mIS doivent être compatibles avec les conditions de digestion de l'enzyme immobilisée sur le monolithe organique-inorganique. L'étude préalablement menée par A.Cingöz au LSABM a montré que l'interaction entre des anticorps anti-cytochrome C et la protéine cible pouvaient être rompue à pH très acide, proche de 2,0 [86, 87]. Ces conditions sont optimales pour une digestion à la pepsine, enzyme protéolytique dont l'activité est maximale à pH 2,0. Enfin, après digestion dans l'IMER, les peptides issus de la digestion sont transférés vers une précolonne de piégeage permettant de refocaliser les peptides et éventuellement de dessaler l'échantillon avant de basculer la quatrième nano-vanne et de transférer les peptides vers la colonne analytique et le spectromètre de masse au moyen de la phase mobile. Le couplage entre un IMER et

l'analyse par LC-MS<sup>2</sup> au format conventionnel est d'ailleurs le plus souvent assuré par ce type de montage [385-392].

Avant de pouvoir envisager l'intégration d'un mIS dans un tel montage, il a d'abord été nécessaire de développer une méthode d'analyse du cytochrome C par nanoLC-MS<sup>2</sup> grâce à une nouvelle source nanoESI appelée « *EASY-Spray*<sup>TM</sup> » (Thermo Scientific) couplée à un spectromètre de masse Triple Quadripôle (TSQ Quantum<sup>TM</sup> Access MAX, Thermo Scientific) en effectuant des digestions en solution du cytochrome C avec la pepsine ou la trypsine. Deux peptides caractéristiques de chacune des digestions ont ensuite été choisis de manière à suivre l'efficacité des digestions en solution et sur IMER. La rétention des peptides caractéristiques sur une précolonne capillaire de piégeage C18 couplée à la nanoLC-MS<sup>2</sup> a été étudiée. Enfin, les deux enzymes de digestion, *i.e.* la pepsine et la trypsine, ont été immobilisées via une approche similaire à celle employée jusqu'à maintenant pour les anticorps et aptamères sur un monolithe hybride organique-inorganique en capillaire. Cette étape de caractérisation des IMER est un pré-requis au couplage d'un mIS voire même d'un mOS spécifique d'une protéine avec la nanoLC-MS<sup>2</sup>.

## 2 Une protéine modèle : le cytochrome C

Le cytochrome C a été choisi comme protéine modèle pour ce dernier chapitre. Il s'agit en effet d'une protéine déjà bien connue des biologistes tant au niveau de ses fonctions que de sa structure [393]. Il a également été largement utilisé comme protéine modèle au cours de la thèse doctorale d'A.Cingöz soutenue en 2009 au sein du LSABM [86, 87, 384].

### 2.1 Origine et fonctions

Le rôle principal du cytochrome C est le transport d'électrons au niveau de la membrane des mitochondries [393]. Sa fonction principale dans la respiration cellulaire est de transporter des électrons du complexe cytochrome réductase (complexe III) au complexe cytochrome oxydase (complexe IV) [393]. Ce transfert électronique est principalement le fait d'une transition du cytochrome C entre un état ferreux (fer II) et ferrique (fer III) au niveau de l'hème (*i.e.* le noyau porphyrinique contenant du fer) ce qui en fait un transporteur biologique d'électrons efficace qui joue un rôle vital dans les oxidations cellulaires chez les plantes et les animaux [393].

Plus récemment, le cytochrome C a été identifié comme un médiateur important dans les voies apoptotiques [394] : la libération de cytochrome C mitochondrial dans le cytoplasme stimule l'apoptose, sa présence cytoplasmique est donc couramment utilisée comme indicateur du processus apoptotique [395]. Enfin, les niveaux de cytochrome C dans le sérum peuvent également être utilisés

comme un indicateur de la proportion de mort cellulaire induite par certaines thérapies contre le cancer [396].

## 2.2 Structure et propriétés physico-chimiques

Le cytochrome C de cœur de cheval a été choisi comme protéine modèle. Il est composé de 105 acides aminés, sa masse moléculaire est de 11,8 kDa et son point isoléctrique est de 10,6. Sa séquence primaire est détaillée en Figure 82.

|           |                                                             |           |
|-----------|-------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>  | Met Gly Asp Val Glu Lys Gly Lys Lys Ile Phe Val Gln Lys Cys | <b>15</b> |
| <b>16</b> | Ala Gln Cys His Thr Val Glu Lys Gly Gly Lys His Lys Thr Gly | <b>30</b> |
| <b>31</b> | Pro Asn Leu His Gly Leu Phe Gly Arg Lys Thr Gly Gln Ala Pro | <b>45</b> |
| <b>46</b> | Gly Phe Thr Tyr Thr Asp Ala Asn Lys Asn Lys Gly Ile Thr Trp | <b>60</b> |
| <b>61</b> | Lys Glu Glu Thr Leu Met Glu Tyr Leu Glu Asn Pro Lys Lys Tyr | <b>75</b> |
| <b>76</b> | Ile Pro Gly Thr Lys Met Ile Phe Ala Gly Ile Lys Lys Lys Thr | <b>90</b> |
| <b>91</b> | Glu Arg Glu Asp Leu Ile Ala Tyr Leu Lys Lys Ala Thr Asn Glu |           |

*Figure 82 : Structure primaire du cytochrome C de cœur de cheval [397]*

Sa structure globulaire a été déterminée par cristallographie aux rayons X [393] et est représentée schématiquement en Figure 83.

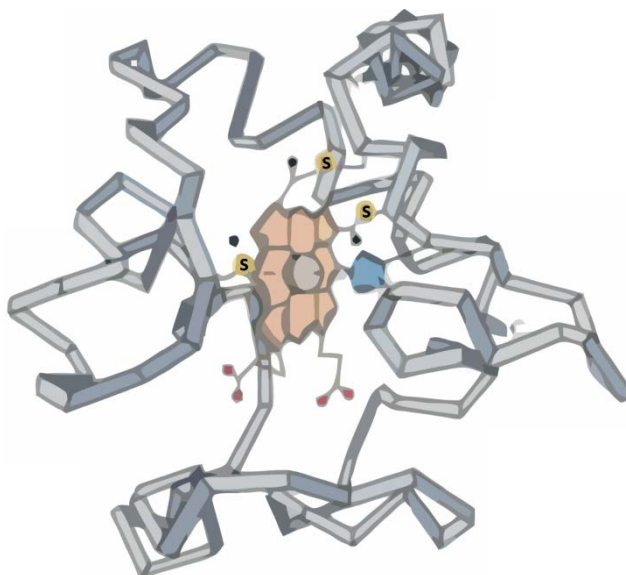


*Figure 83 : Structure du cytochrome C mitochondrial. L'hème (en rouge) est au centre lié par des liaisons covalentes à deux atomes de soufre (en jaune) de la protéine. Un troisième soufre, d'un résidu méthionine, est relié au fer par coordination. Adapté de [393].*

L'hème, plan, est situé près du centre de la protéine, entouré principalement par des résidus hydrophobes de la protéine. Outre ce cœur hydrophobe, la protéine présente une surface qui est à

l'inverse composée d'une majorité de lysines chargées positivement. Le cytochrome C est ainsi une protéine hautement basique et très soluble dans l'eau [393]. Le fer de la porphyrine est lié par des liaisons de coordination à un atome d'azote d'un résidu histidine sur un côté du plan et à un atome de soufre d'un résidu méthionine de l'autre côté [393]. Le diamètre du cytochrome C est de l'ordre de 3,4 nm autour de l'hème lié aux deux cystéines de la protéine par des liaisons covalentes. Ces liaisons covalentes sont une des raisons pour laquelle le cytochrome C a été choisi comme protéine modèle. En effet, La présence de cystéines dans la séquence d'acides aminés d'une protéine mène à la formation de ponts disulfures qui rigidifient considérablement la structure des protéines. La digestion de ces protéines est alors rendue difficile puisque les sites de coupures ne sont pas tous facilement accessibles. L'inaccessibilité des cystéines liées à l'hème empêche ainsi la formation de ponts disulfures au sein de la protéine. De ce fait, le cytochrome C est une protéine facile à digérer.

### 3 Développement d'un IMER à base de pepsine

La première étape de cette partie du projet a consisté à réaliser l'immobilisation de l'enzyme protéolytique dont l'activité est maximale autour de pH 2,0 : la pepsine. De façon à pouvoir analyser les peptides issus des digestions enzymatiques sur des IMER à base de pepsine, un couplage avec la spectrométrie de masse a dû être envisagé en utilisant une source nanoESI nouvellement acquise. La première étape a donc consisté à caractériser les colonnes capillaires et la source nanoESI associée et utilisée avec un spectromètre de masse triple quadripôle.

#### 3.1 Mise au point de l'analyse par nanoLC-MS/MS

##### 3.1.1 Présentation de la source nanoESI et du spectromètre de masse

Avant de décrire l'optimisation de l'analyse du cytochrome C par nanoLC-MS/MS, le fonctionnement général de la source nanoESI et du spectromètre de masse utilisés ainsi que les grands paramètres à optimiser seront décrits de manière à aider à la compréhension des étapes suivies pour cette optimisation.

Un spectromètre de masse se compose de trois parties : une source d'ionisation permettant de vaporiser et ioniser les molécules, un analyseur permettant de séparer les ions en fonction de leur rapport masse/charge (noté  $m/z$  dans la suite de chapitre) et un détecteur transformant les ions en signal électrique. Plusieurs sources d'ionisation peuvent être utilisées. Parmi celles-ci, l'ionisation par électroébulliseur (*ElectroSpray Ionization*, ESI) est un procédé d'ionisation doux, *i.e.* peu énergétique, par lequel les ions préformés en solution sont transférés en phase gazeuse. Les ions produits peuvent se trouver à l'état multi-chargé. La première étape est la formation de gouttelettes à

l'extrémité de l'aiguille ESI [398]. La haute tension donne au spray la forme d'un cône (appelé cône de Taylor) et provoque à la surface des gouttelettes la montée de particules chargées de même polarité. La seconde étape concerne l'élimination du solvant. Au fur et à mesure que le solvant s'évapore, la taille des gouttelettes se réduit et la concentration des charges à leur surface augmente. A la limite de Rayleigh, les forces de répulsion coulombienne dépassent les forces de tension de surface de la gouttelette qui explose alors. Cette explosion de Coulomb provoque la formation de gouttelettes plus petites et moins chargées. Ce processus de réduction de taille des gouttelettes suivi de leur explosion se reproduit successivement jusqu'à ce que l'analyte chargé se retrouve totalement désolvaté et en phase gazeuse.

Le couplage de la nanochromatographie liquide avec la spectrométrie de masse nécessite l'utilisation d'une source ESI adaptée aux faibles débits utilisés. En effet, les sources ESI classiques sont adaptées à des débits de phase mobile compris généralement entre 0,1 et 1 mL/min tandis que les débits utilisés en nanoLC sont généralement inférieurs à 500 nL/min. Outre le débit, l'ensemble des connectiques associé à une source ESI n'est donc pas adapté à des analyses par nanoLC du fait de volumes morts beaucoup trop importants pouvant causer des élargissements de pics. D'autre part, les sources ESI classiques sont le plus souvent placées à une distance de quelques centimètres de l'entrée du spectromètre de masse, potentiellement avec un angle d'inclinaison, ce qui ne se prête pas non plus à un transfert efficace des ions depuis l'aiguille de la source vers l'entrée du spectromètre de masse lorsque des débits extrêmement faibles sont appliqués. Avec une source ESI conventionnelle la majeure partie des analytes sont ainsi perdus lors de cette étape de formation des gouttelettes et de transfert vers le spectromètre de masse [399]. Ces pertes ne posent pas de problèmes de sensibilité avec des débits de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{L}/\text{min}$ , la quantité d'ions parvenant à l'entrée du spectromètre de masse étant largement suffisante, mais seront beaucoup plus problématiques avec l'utilisation de débits 1000 fois moins élevés. Il est donc nécessaire d'avoir une source à la fois adaptée aux faibles débits et positionnée à proximité de l'entrée du tube de transfert de manière à avoir un transfert d'ions efficace à de si faibles débits. D'un point de vue mécanistique, l'ionisation avec une source nanoESI n'est pas juste celle d'une source ESI miniaturisée [399]. En effet, les gouttelettes formées sont plus petites qu'avec une source ESI classique (de l'ordre d'un ordre de grandeur, 150 nm contre 1,5  $\mu\text{m}$  en diamètre) ce qui permet en théorie de s'adapter à de plus faibles concentrations en analyte. En effet, de petites gouttelettes requièrent un moins grand nombre de fissions et donc moins d'évaporation de solvant avant libération des ions en phase gazeuse. En conséquence, une part plus importante des analytes présente dans les gouttelettes initiales est rendue disponible pour l'analyse par spectrométrie de masse [400]. De nombreux systèmes comprenant des sources nanoESI ont été étudiés mais des problèmes de stabilité du spray et de mauvaises répétabilités ont très souvent été référencés [400].

Dans ce chapitre, un système très récent appelé *EASY-Spray*<sup>TM</sup> (Thermo Scientific) a été utilisé pour effectuer le couplage entre la nanoLC et un spectromètre de masse triple quadripôle. Ce système est présenté en Figure 84.

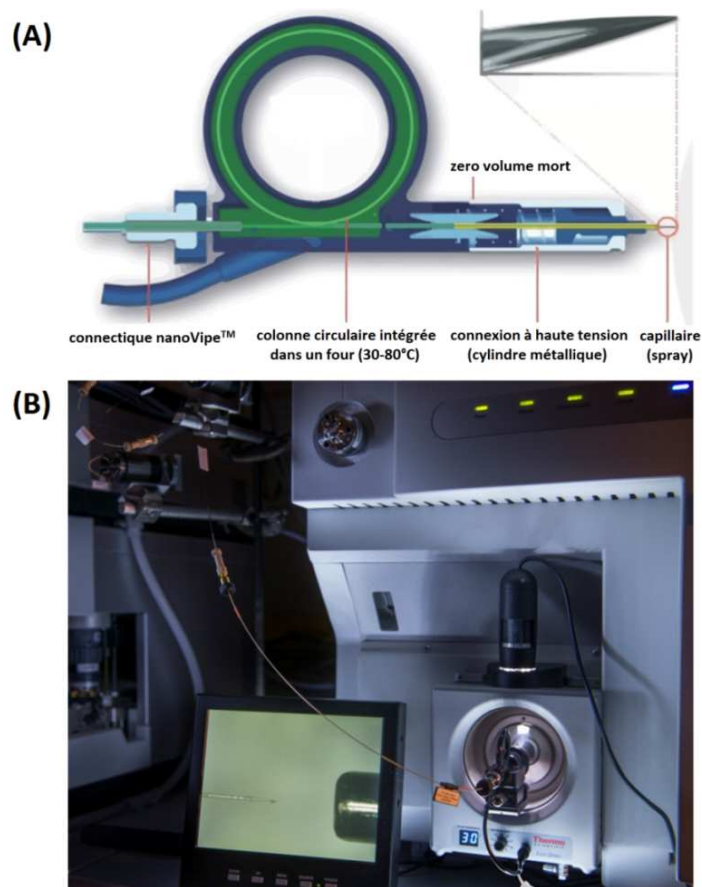


**Figure 84 :** (A) Schéma de principe d'une colonne EASY-Spray™. (B) Photographie prise au LSABM de la source EASY-spray™ sur laquelle est clipsée une colonne EASY-spray Pepmap C18 (15 cm x 75  $\mu$ m d.i.) reliée à un système de vannes manuelles permettant de réaliser les injections.

Il se compose d'une source consistant principalement en un support à colonne connecté au spectromètre de masse et permettant d'établir l'ensemble des connexions électroniques avec le détecteur. Une autre grande différence avec une source ESI classique, est ici que l'aiguille permettant la formation du spray est totalement solidaire de la colonne analytique (Figure 84-A). En effet, la colonne est intégrée dans un four à colonne dont la gamme de travail s'étale de 30 à 80°C. La sortie de la colonne est alors connectée *via* une connectique sans volume mort à l'aiguille nanoESI permettant de créer le spray. Ce dispositif doit être tout simplement clipser sur le support de la source connecté au spectromètre de masse. L'aiguille est alors libérée et placée directement à l'entrée du tube de transfert, *i.e.* à l'entrée du spectromètre de masse. Une fois l'étape d'ionisation réalisée, les ions formés pénètrent dans une interface placée en entrée du spectromètre de masse et composée d'un tube de transfert d'ions (chauffé), d'une lentille de focalisation (*tube lens*) et d'un *skimmer*. Cette interface est présentée en Figure 85.



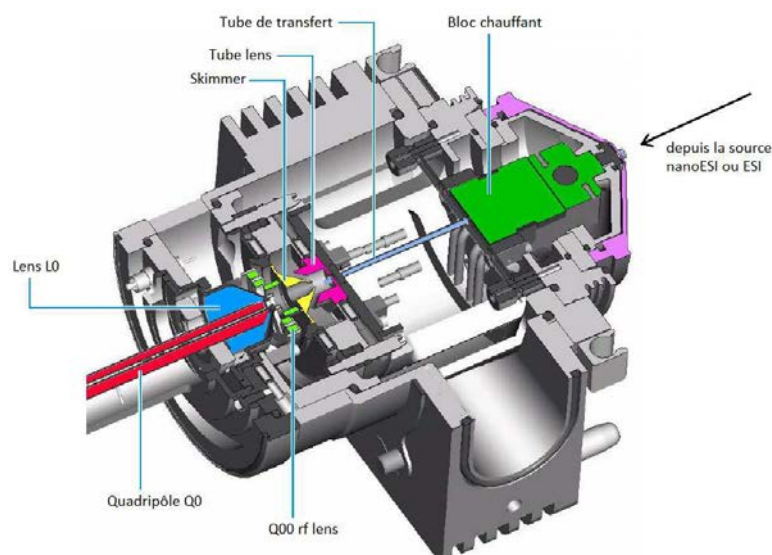


Figure 85 : Schéma en coupe de l'interface de la source du spectromètre de masse TSQ Vantum™

Les ions formés par la source ESI ou nanoESI sont attirés dans le tube de transfert à partir de la région atmosphérique et sont transférés vers la région composée du *tube lens* et du *skimmer* par un gradient de pression décroissant. La région entre le tube de transfert et le *skimmer* est entourée par le *tube lens*. Les ions sortant du tube de transfert chauffé se dispersent dans cette région et sont échantillonnés par l'ouverture sur le *skimmer*. Le *tube lens* a pour rôle de restreindre l'expansion du flux d'ions lorsqu'il quitte le tube de transfert chauffé. Un potentiel  $y$  est appliqué dans le but de focaliser les ions vers l'ouverture du *skimmer* et d'assister la désolvation des ions sous forme d'adduits en les accélérant *via* la pression résiduelle de gaz qui règne dans cette région (*e.g.* solvant, azote). Le potentiel appliqué sur la lentille constituant le *tube lens* est un des paramètres à optimiser. Ensuite, le *skimmer* agit comme un écran entre la région à haute pression du capillaire (1 Torr) et la région à plus basse pression des premiers quadripôles (50 mTorr). La tension *skimmer offset* est une tension supplémentaire appliquée sur les éléments après le *skimmer*. Elle permet d'éliminer certains adduits qui peuvent se former lors du processus d'ionisation mais peut entraîner, si le voltage est trop important, une fragmentation induite dans la source des ions parents. Cette tension est également un paramètre à optimiser pour avoir la meilleure intensité possible de signal. Après le *skimmer*, les ions sont transmis à deux multipôles (notés Q00 et Q0 en Figure 85) dont le but principal est de transmettre les ions du *skimmer* jusqu'aux analyseurs et d'éliminer les restes d'ions de polarité opposées ou d'espèces neutres.

Le triple quadripôle permet de faire de la spectrométrie de masse en tandem ou MS<sup>2</sup>. Un schéma de principe d'un triple quadripôle est présenté en Figure 86.

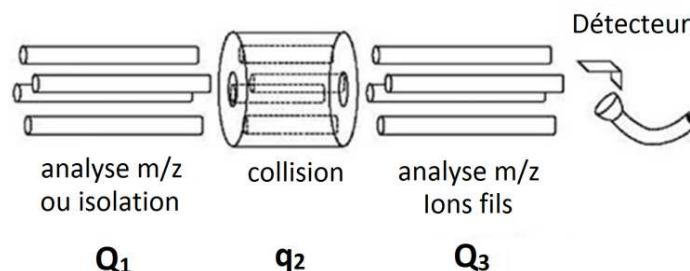


Figure 86 : Schéma de principe d'un triple quadripôle

Le spectromètre de masse est formé de deux analyseurs (quadripôles) en série séparés par une cellule de collision dans laquelle un gaz de collision inerte (argon) est introduit. Par excitation collisionnelle de ce gaz avec les ions, les ions sont dissociés. Classiquement, le premier quadripôle fonctionne comme un filtre et sélectionne un ion ( $m/z$ ) d'intérêt appelé ion parent. Après dissociation par collision, les ions fils sont analysés par balayage sur le second analyseur permettant l'obtention du spectre de fragmentation. La méthode de « *selected reaction monitoring* » (SRM) ou « *multiple reaction monitoring* » (MRM) permet quant à elle de détecter uniquement un (des) ion(s) fils provenant d'un ion(s) parent(s) donné(s) et donc de suivre uniquement une (des) transitions d'un ion(s) parent(s) vers un (des) ions fils. Cette méthode présente une grande spécificité qui en fait une méthode de choix pour la quantification.

### 3.1.2 Analyse d'un mélange peptidique et identification du cytochrome C

De façon à identifier les rapports  $m/z$  correspondant aux peptides issus d'une digestion enzymatique, la première étape de l'optimisation d'une analyse par LC-MS consiste à infuser un digestat vers le spectromètre de masse sans étape de séparation en utilisant la source ESI et un montage en T permettant de mélanger le digestat poussé au moyen d'une seringue et d'un pousse-seringue et l'effluent chromatographique délivré par une pompe LC. Cependant, la source nanoESI utilisée ne permet pas d'infuser directement une solution issue d'une digestion enzymatique vers le spectromètre de masse. Le spray est en effet formé directement au niveau de la sortie de colonnes adaptées comme il a été décrit précédemment. Un dispositif sans colonne, consistant en un capillaire en sortie duquel est incorporée une aiguille permettant de former un spray, est désormais disponible (*EASY-Spray<sup>TM</sup> Transfer Lines*, Thermo Scientific). Toutefois, au moment des premiers essais de ce projet, ce système n'étant pas commercialement disponible, cette difficulté a dû être contournée.

Pour ce faire, une digestion en solution de 1 mg de cytochrome C à la pepsine a été menée dans un volume de 1 mL d'acide formique (pH 2,0) pendant 16 heures à 37°C avec un rapport E/S de 1/25. Un refroidissement brusque a été effectuée au bout des 16 heures de manière à arrêter la digestion puis la solution a été congelée. Ces conditions de digestion ont été choisies car, en envisageant le couplage d'un mIS avec un IMER, le CYC retenu sélectivement par le mIS sera élué du

support à l'aide d'une solution à pH 2,0. Il est donc essentiel, dès l'optimisation de la méthode d'analyse du CYC de se placer dans les mêmes conditions de digestion.

Le rapport qualité du constructeur de la colonne EASY-Spray Pepmap® C18 montrant un exemple de séparation de peptides issus d'un digestat tryptique du cytochrome C en utilisant un gradient de 2 à 50 % en acétonitrile (0,1 % acide formique) en 30 min à un débit de 300 nL/min avec injection d'une quantité de 1 pmol de cytochrome C, il a été décidé, en première approche, d'injecter le digestat pepsique de cytochrome C, au moyen d'une boucle d'injection manuelle de 250 nL. De façon à injecter une quantité de CYC proche de 1 pmol, le digestat contenant un équivalent de 1 mg/mL de CYC ( $\approx 85$  nmol/mL) digéré a été dilué d'un facteur 20 dans l'eau pure. Avec une telle dilution un équivalent de 1,05 pmol de CYC peut être injecté sur la colonne analytique. Pour ces essais, le spectromètre de masse a été utilisé en mode MS et le courant ionique total (TIC) a été enregistré. La tension et la température du capillaire ont été fixées respectivement à 1900 V et 200°C. Cette tension de capillaire est dans l'intervalle de travail de la source EASY-Spray™ (1400 V – 2400 V) et est celle recommandée par le constructeur pour débiter les analyses. Le chromatogramme résultant de cette analyse est représenté en Figure 87.

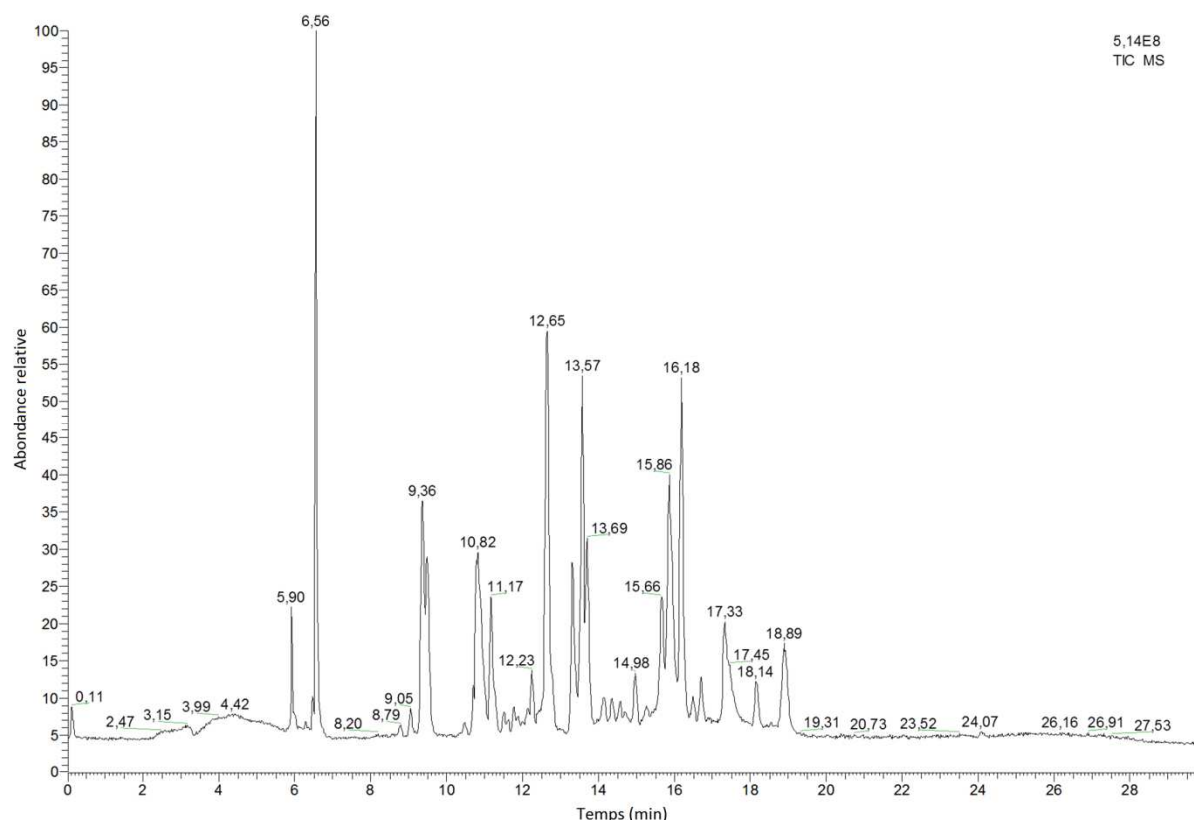


**Figure 87 :** Chromatogramme résultant de l'injection d'un digestat dilué de cytochrome C sur la colonne Pepmap C18 (75  $\mu$ m d.i. x 15 cm). Injection de 1,05 pmol de CYC (inj = 250 nL). Phase mobile : eau + 0,1% Ac. Formique/acétonitrile + 0,1% Ac. Formique. Gradient de 2% à 50% d'acétonitrile en 30 min.

Un grand nombre de pics, correspondant aux différents peptides issus de la digestion à la pepsine, peuvent être observés sur ce chromatogramme. Au vu de la complexité d'un tel mélange,

cette séparation de peptides s'avère tout à fait satisfaisante. D'autre part, l'intensité du signal semble également très élevée ( $5,14 \times 10^8$ ), confirmant la réussite du couplage avec la source nanoESI ainsi que la stabilité du spray au cours de l'analyse. Des essais supplémentaires ont été menés de manière à diminuer la pente du gradient en espérant une meilleure séparation, cependant, les résultats obtenus ont montré que la séparation initialement obtenue sur ce chromatogramme était le meilleur compromis entre une bonne séparation et une durée d'analyse raisonnable dans la mesure où l'ensemble des injections sont réalisées manuellement, ce qui limite grandement le nombre d'injections pouvant être réalisées chaque jour si le temps de l'analyse s'avère trop long. L'ensemble des peptides étant apparemment séparés en un temps inférieur à 18,9 minutes, la durée d'analyse a cependant été légèrement réduite. Au final, un gradient en acétonitrile (0,1% acide formique) de 2% à 35% en 20 minutes a été choisi. La pente du gradient est donc presque identique (*i.e.* environ +1,6% acétonitrile/min) à celle appliqué jusqu'à maintenant et n'a pas d'effet sur les temps de rétention finalement observés pour les différents peptides.

De manière à s'assurer de l'efficacité de la digestion du cytochrome C dans les conditions choisies, tous les spectres de masse correspondant aux différents pics chromatographiques observés ont été retraités de manière à attribuer les ions présents à des peptides issus de la digestion du CYC. Pour cela, ces données ont été comparées à celles présentes dans des banques de données pour permettre d'identifier les peptides, leur séquence ainsi que le recouvrement de séquence de la protéine. De ce fait, l'ensemble des spectres (en mode MS simple) ont été retraités manuellement de manière à calculer les masses des peptides correspondant à chacun des pics observés sur le chromatogramme de la Figure 87. Certaines masses de peptides calculées ont pu être associées automatiquement aux peptides correspondants grâce au logiciel MASCOT (<http://www.matrixsciences.com>) utilisé en mode *Peptide Mass Fingerprint*. Ces masses ont également pu être associées manuellement à des séquences de peptides au moyen de deux logiciels de bioinformatique : PeptideCutter ([http://web.expasy.org/peptide\\_cutter](http://web.expasy.org/peptide_cutter)) et MS-Digest Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>).

L'ensemble des peptides identifiés selon les rapports m/z observés et les temps de rétention correspondant sont reportés dans le Tableau 14.

**Tableau 14 :** Peptides identifiés après digestion en solution à la pepsine (E/S : 1/25) de 1 mg/mL de cytochrome C puis dilution au vingtième (250 nL injectés soit 1,05 pmol en équivalent de cytochrome C). En vert : peptides identifiés automatiquement par MASCOT (M). Les autres peptides ont été identifiés manuellement grâce aux logiciels PeptideCutter (PC) ou MS-Digest Prospector (MD)

| t <sub>r</sub> (min)                                                                                | m/z observés                 | Charges             | Masse (Da)<br>du peptide | Séquences peptidiques        | Positions    | MD | PC | M |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------------|------------------------------|--------------|----|----|---|
| 5.9                                                                                                 | 268.5 ; 402.2 ; 803.5        | 3+ ; 2+ ; 1+        | 802.9                    | GIKKKTE                      | 85-91        | -  | ✓  | - |
| 6.6                                                                                                 | <b>347.8 ; 463.4 ; 694.3</b> | <b>4+ ; 3+ ; 2+</b> | <b>1387.6</b>            | <b>AGIKKKTEREDL</b>          | <b>84-95</b> | ✓  | ✓  | ✓ |
| 8.8                                                                                                 | 316.9 ; 474.9 ; 948.5        | 3+ ; 2+ ; 1+        | 947.2                    | KGKKIFVQ                     | 6-13         | -  | ✓  | - |
| 9.1                                                                                                 | 369.2 ; 553.4                | 3+ ; 2+             | 1104.6                   | MGDVEKGKKI                   | 1-10         | ✓  | -  | - |
| 9.3                                                                                                 | 373.9 ; 560.3                | 3+ ; 2+             | 1120.3                   | GDVEKGKKIF                   | 2-11         | ✓  | ✓  | ✓ |
| 9.4                                                                                                 | 393.8 ; 524.8 ; 786.7        | 4+ ; 3+ ; 2+        | 1571.8                   | AGIKKKTEREDLIA               | 84-97        | ✓  | ✓  | - |
| 10.5                                                                                                | 340.2 ; 509.9 ; 1018.4       | 3+ ; 2+ ; 1+        | 1018.1                   | GRKTGQAPGF                   | 38-47        | ✓  | ✓  | ✓ |
| 10.7                                                                                                | 384.2 ; 576.0                | 3+ ; 2+             | 1150.3                   | IAYLKATNE                    | 96-105       | ✓  | ✓  | ✓ |
| 10.8                                                                                                | 398.6 ; 531.2 ; 796          | 4+ ; 3+ ; 2+        | 1590.8                   | KGGKHKGTGPNLHGLF             | 23-37        | -  | ✓  | - |
| 11.0                                                                                                | 417.8 ; 556.8 ; 834.4        | 4+ ; 3+ ; 2+        | 1666.0                   | ENPKKYIPGTMIF                | 70-83        | ✓  | ✓  | ✓ |
| 11.2                                                                                                | 412.8 ; 550.2                | 4+ ; 3+             | 1647.9                   | FAGIKKKTEREDLI               | 83-96        | ✓  | -  | - |
| 11.5                                                                                                | 443.1 ; 590.8 ; 885.1        | 4+ ; 3+ ; 2+        | 1768.9                   | TYTDANKNKGITWKE              | 48-62        | -  | ✓  | - |
| 11.8                                                                                                | 500.7 ; 667.2                | 4+ ; 3+             | 1999.2                   | TYTDANKNKGITWKEET            | 48-64        | ✓  | -  | - |
| 12.7                                                                                                | 388.3 ; 581.8                | 3+ ; 2+             | 1162.4                   | GDVEKGKKIF + Acet.           | 2-11         | ✓  | ✓  | ✓ |
| 12.8                                                                                                | 380.6 ; 507.1 ; 760.1        | 4+ ; 3+ ; 2+        | 1518.8                   | ENPKKYIPGTMKI                | 70-82        | ✓  | -  | - |
| 13.4                                                                                                | 504.7 ; 756.6                | 3+ ; 2+             | 1511.7                   | TYTDANKNKGITW                | 48-60        | ✓  | ✓  | - |
| 13.6                                                                                                | <b>421.4 ; 561.6 ; 841.6</b> | <b>4+ ; 3+ ; 2+</b> | <b>1682.0</b>            | <b>ENPKKYIPGTMIF + 1 Ox.</b> | <b>70-83</b> | ✓  | ✓  | ✓ |
| 13.6                                                                                                | 529.0 ; 704.9 ; 1056.7       | 4+ ; 3+ ; 2+        | 2112.1                   | TYTDANKNKGITWKEETL           | 48-65        | ✓  | ✓  | ✓ |
| 15.7                                                                                                | 445.7 ; 593.9                | 4+ ; 3+             | 1779.2                   | LENPKKYIPGTMIF               | 69-83        | ✓  | ✓  | - |
| 15.9                                                                                                | 573.2 ; 859.2                | 3+ ; 2+             | 1716.9                   | FGRKTGQAPGFTYTD              | 37-52        | ✓  | ✓  | - |
| 16.2                                                                                                | 486.5 ; 648.3                | 4+ ; 3+             | 1942.3                   | YLENPKKYIPGTMIF              | 68-83        | -  | ✓  | - |
| 16.4                                                                                                | 554.4 ; 740.1                | 4+ ; 3+             | 2218.1                   | MEYLENPKKYIPGTMIF + 1 Ox.    | 66-83        | ✓  | -  | ✓ |
| 16.7                                                                                                | 518.7 ; 691.3 ; 1036.5       | 4+ ; 3+ ; 2+        | 2071.1                   | MEYLENPKKYIPGTMKI + 1 Ox.    | 66-82        | ✓  | -  | - |
| 17.3                                                                                                | 551.6 ; 734.9 ; 1101.8       | 4+ ; 3+ ; 2+        | 2202.6                   | MEYLENPKKYIPGTMIF            | 66-83        | ✓  | ✓  | ✓ |
| Nombre de peptides totaux reconnus par MASCOT = 10<br>Recouvrement de séquence correspondant = 74 % |                              |                     |                          |                              |              |    |    |   |

MD : logiciel MS-Digest, PC : logiciel PeptideCutter, M : MASCOT

L'analyse des données a permis d'identifier 61 rapports m/z correspondant à 24 peptides au total. MASCOT a réussi à identifier, quant à lui, au total 26 rapports m/z correspondant à 10 peptides spécifiques du cytochrome C avec un recouvrement de séquence de 74 %. Le rapport MASCOT obtenu est présenté en Annexe 9. Jusqu'à cinq coupures manquées ont été autorisées avec les logiciels MS-Digest Prospector et PeptideCutter. De ce fait, un plus grand nombre de peptides a pu être attribué manuellement. De nombreux peptides n'avaient en effet pas pu être attribués automatiquement en utilisant uniquement le logiciel MASCOT, ce logiciel ne recherchant, pour la pepsine, que des clivages au niveau de liaisons peptidiques dans lesquelles sont engagés des résidus phénylalanine et leucine alors que d'autres sites de coupure on pu être observés dans la littérature au niveau de résidus alanine, tryptophane ou tyrosine [401]. Cette différence de prise en compte des

sites de clivage par les différents logiciels de bioinformatique explique également les différences observées dans le nombre de coupure manquée calculé pour chaque peptide dans le Tableau 14 . Compte tenu du grand nombre de peptides reconnus, la digestion en solution dans l'acide formique pH 2,0 pendant 16 heures par la pepsine est efficace.

### 3.1.3 Optimisation de la fragmentation de peptides cibles

Dans ces conditions, plusieurs peptides donnant lieu à des signaux intenses sont observés. La thèse doctorale d'A.Cingöz [86, 87, 384], ainsi que de précédentes études [402], ont montré qu'il était possible de suivre des peptides caractéristiques de la digestion d'une protéine ciblée de manière à développer un outil de quantification utilisant la linéarité entre la quantité de protéine digérée et les aires de pics de ces peptides caractéristiques. Deux peptides ont ainsi été choisis de manière à comparer les digestions en solution ainsi que les digestions en ligne qui feront l'objet de ce chapitre. Ces deux peptides de séquences AGIKKTEREDL et ENPKKYIPGTMIF ont des temps de rétention respectifs de 6,6 min et 13,6 min sur le chromatogramme de la Figure 87. Les spectres de masse observés à ces deux temps de rétention sont présentés en Figure 88.

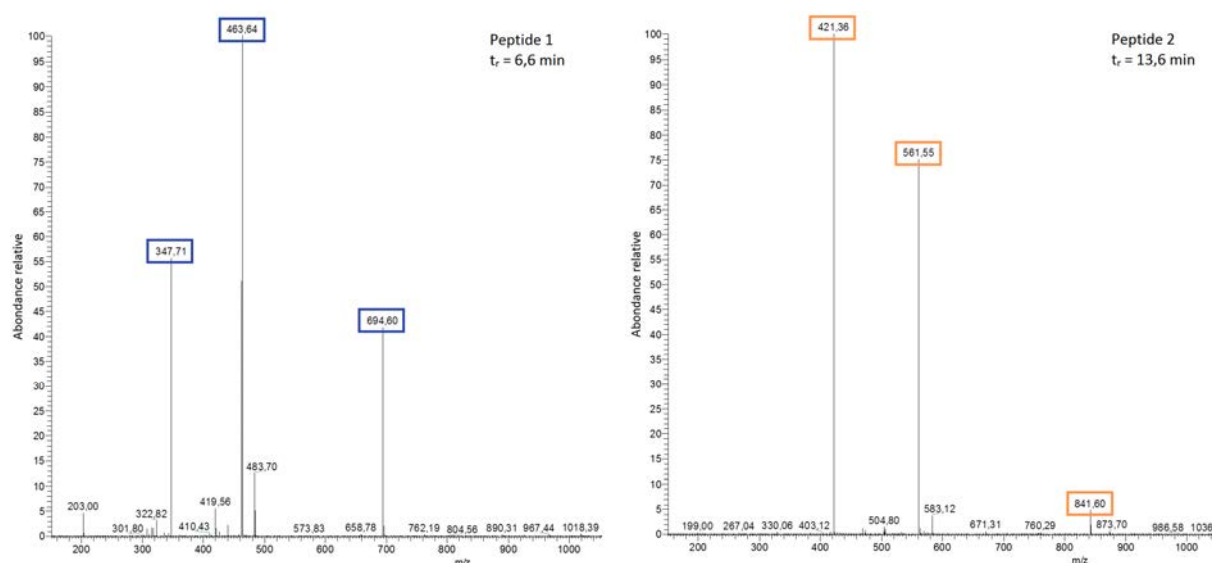


**Figure 88** : Spectres de masse des peptides 1 et 2 obtenus respectivement à  $t_r = 6,6$  min et  $t_r = 13,6$  min.

Les spectres de masse des deux peptides choisis contiennent des ions quadruplement, triplement et doublement chargés. Les ions caractéristiques du peptide 1 sont les ions de rapport  $m/z$  347,7, 463,6 et 694,6 avec respectivement des charges de 4+, 3+ et 2+. Ces rapports  $m/z$  permettent de déterminer une masse du peptide de 1387 Da (cf. Tableau 14). De la même façon, on peut observer que le peptide 2 présente des rapports  $m/z$  caractéristiques de 421,4, 561,6 et 841,6. Ces rapports permettent d'estimer la masse du peptide à 1682 Da avec respectivement des charges de 4+, 3+ et 2+ (cf. Tableau 14). Sur chacun de ces spectres de masse il est visible que les ions les plus

intenses sont les ions de  $m/z$  463,6 (chargé 3+) et 421,4 (chargé 4+) respectivement pour le peptide 1 et le peptide 2. De ce fait, ces deux ions ont été choisis pour être fragmentés et ainsi analysés en mode MS<sup>2</sup>. Les fragmentations ont principalement lieu au niveau des fonctions amide du squelette peptidique mais elles peuvent aussi avoir lieu de part et d'autre de cette liaison. Une première nomenclature des fragmentations peptidiques a été introduite en 1984 par P. Roepstorff et J. Fohlman [403] puis complétée et simplifiée par K. Biemann [404] quelques années plus tard. Elle est représentée en Figure 89.

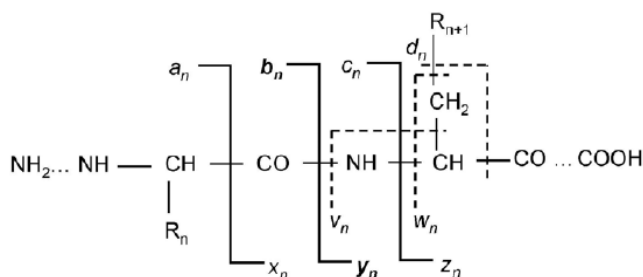


Figure 89 : Nomenclature des fragmentations peptidiques

La fragmentation à basse énergie donne lieu à deux types d'ions : les ions a, b et c pour lesquels la charge positive est portée par l'extrémité N-terminale et les ions x, y et z pour lesquels la charge positive est portée par l'extrémité C-terminale. De manière générale, la majorité des fragments sont de type b et y.

Il est indispensable d'optimiser pour chaque ion la tension de la lentille (*Tube Lens Offset*) qui permet le transfert des ions du tube de transfert vers l'optique ionique puis l'analyseur. Cette optimisation a été menée automatiquement par le spectromètre de masse. Ensuite, l'énergie de collision dans le deuxième quadripôle doit également être optimisée de manière à sélectionner les ions fils présentant la meilleure intensité. Cependant, la source nanoESI utilisée ne permet pas d'infuser directement une solution issue de digestion enzymatique vers le spectromètre de masse comme déjà mentionné. Pour optimiser ces paramètres, le digestat dilué de cytochrome C a été infusé au moyen d'une source classique HESI (*Heated ElectroSpray Ionization*). Pour ce faire, le débit du pousse-seringue a été fixé à 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  et cette solution a été mélangée à l'aide d'un T à l'effluent chromatographique qui consistait ici en un mélange eau/acétonitrile (+ 0,1% AF) 50/50 délivré à un débit de 0,250 mL/min. La température du capillaire a été fixée à 350 °C et sa tension à 3000 V. Le *skimmer offset* a lui été fixé à 20 V. Dans ces conditions, le spectre de masse observé est représenté en Figure 90-A.

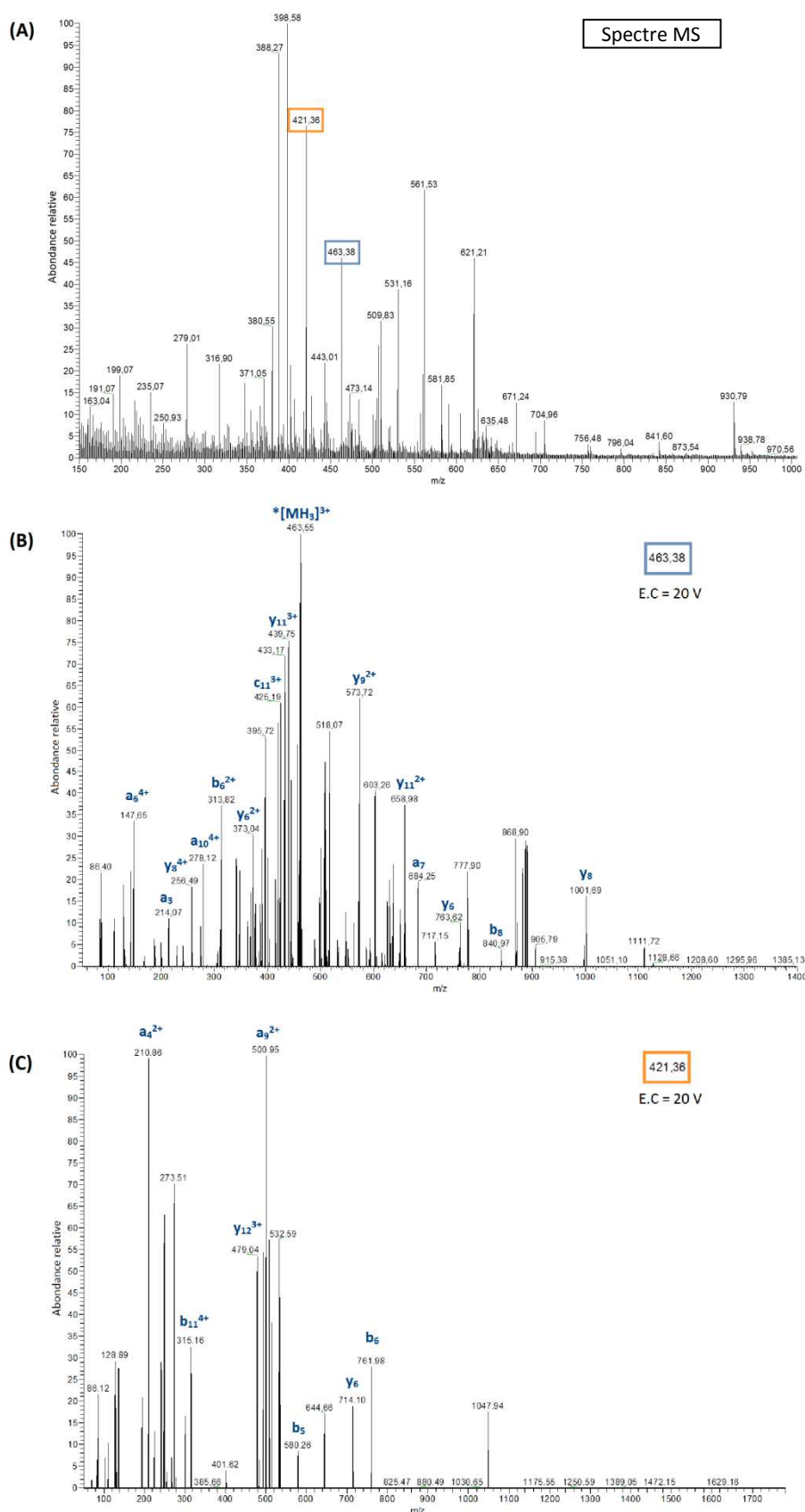


Figure 90 : (A) Spectre de masse obtenu après infusion du digestat dilué avec une source HESI et en  $\mu$ LC. (B) Spectres de fragmentation des ions précurseurs 463,6 et 421,4 avec une énergie de collision fixée à 20 V dans le deuxième quadripôle.



L'ensemble des ions déjà observés lors de l'analyse par nanoLC-MS sont bien retrouvés (cf. Tableau 14) et notamment ceux présents sur les spectres de masse observés aux temps de rétention des deux peptides caractéristiques (cf. Figure 88 et Figure 90-A). Les ions de rapports  $m/z$  463,6 et 421,4 ont donc été fragmentés de manière à identifier les ions fils les plus intenses et à optimiser l'énergie de collision. Les Figure 90-B et C présentent les spectres de fragmentation des ions de rapport  $m/z$  respectivement 463,6 et 421,4 avec une énergie de collision de 20 V. Les fragments  $y$  sont annotés selon la nomenclature de Roepstoff et Fohlman. L'optimisation de l'énergie de collision de l'ensemble des fragments a permis de sélectionner deux transitions parmi les plus intenses pour chacun des deux peptides caractéristiques. Les ions fils sélectionnés, leur séquence ainsi que les énergies de collision associées sont reportées dans le Tableau 15.

**Tableau 15 :** Transitions choisies pour les deux peptides cibles, séquence des fragments associés et énergies de collision permettant d'avoir un signal optimal.

| Peptides                    | Ions parents (m/z) | Tube Lens offset (V) | Energie de collision (V) | Ions fils (m/z) | Séquence fragment | Séquence charge |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| Peptide 1<br>AGIKKKTEREDL   | 463.3              | 117                  | 27                       | 129.0           | AG                | $b_2^+$         |
|                             |                    |                      | 16                       | 425.3           | AGIKKKTERED       | $c_{11}^{3+}$   |
| Peptide 2<br>ENPKKYIPGTKMIF | 421.4              | 92                   | 21                       | 135.7           | Y                 | -               |
|                             |                    |                      | 15                       | 248.6           | ENPKKY            | $b_6^{3+}$      |

Pour chaque peptide, les deux ions fils les plus intenses ont été sélectionnés. L'un a été utilisé pour la quantification et l'autre a été sélectionné afin de permettre de confirmer l'identification de l'ion parent. Les ions finalement choisis pour suivre le peptide 1 ( $t_r = 6,6$  min) après fragmentation de l'ion parent de rapport  $m/z$  463,3 sont les ions de rapport  $m/z$  129,0 et 425,3. De manière similaire, les ions fils choisis après fragmentation de l'ion parent de rapport  $m/z$  421,4 sont les ions de rapport  $m/z$  135,7 et 248,6 pour le peptide 2 ( $t_r = 13,6$  min).

### 3.1.4 Optimisation du *skimmer offset*

Au cours des précédentes étapes de l'optimisation, le *skimmer offset* a été fixé à une valeur arbitraire de 20 V. De manière à optimiser ce dernier paramètre tout en utilisant la source nanoESI, des injections du digestat pepsique (1 mg/mL CYC, E/S = 1/25) dilué au 1/20 comme précédemment ont été effectuées sur la colonne Pepmap® C18 (75  $\mu$ m d.i. x 15 cm) avec un gradient en acétonitrile de 2% à 35% en 20 minutes. L'analyse a été réalisée en mode MRM en suivant les deux transitions choisies pour chacun des deux peptides caractéristiques (Tableau 15). La Figure 91 représente la somme des aires des pics chromatographiques correspondant aux deux transitions suivies pour chacun des peptides tracée en fonction de la valeur du *skimmer offset* utilisée pour l'analyse.

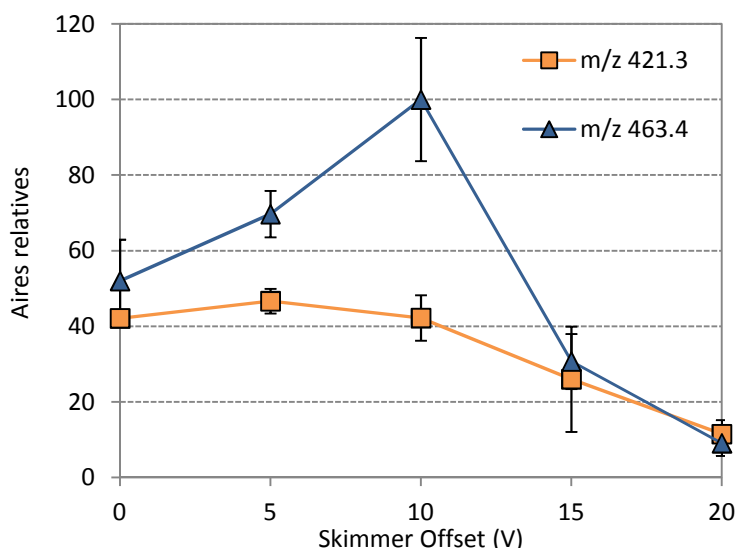


*Figure 91 : Somme des aires relatives des pics chromatographiques correspondant aux deux transitions suivies pour chacun des peptides en fonction de la valeur de skimmer offset utilisée pour l'analyse par nanoLC-MS<sup>2</sup> (n = 3). Aires relatives par rapport à la plus grande aire de pic obtenue.*

Il est visible que l'aire des pics pour une valeur de *skimmer offset* de 20 V, fixée arbitrairement, n'est pas optimale. En effet, il est visible en Figure 91 que la somme des aires des pics des deux transitions suivies pour le peptide 1 passe par un maximum situé à une valeur de *skimmer offset* de 10 V. Les transitions suivies pour le peptide 2, quant à elles, voient leurs aires rester constantes pour un *skimmer offset* compris entre 0 et 10 V. Ces aires chutent cependant au-delà, tout comme pour les transitions du peptide 1. De ce fait, une valeur de *skimmer offset* de 10 V a finalement été choisie pour la suite de l'étude.

### 3.1.5 Répétabilité des analyses

Nous venons de voir que la digestion du CYC par la pepsine est efficace et qu'il est possible de caractériser l'efficacité de cette digestion par le suivi de deux peptides différents. Afin de déterminer la pertinence de l'outil de quantification développé basé sur ces deux peptides caractéristiques et surtout de façon à évaluer la répétabilité des analyses par nanoLC-MS<sup>2</sup> lors de déconnexions successives de la source, trois injections différentes du même digestat de cytochrome C à la pepsine (E/S = 1/25) ont été réalisées sur trois jours différents après déconnexion complète de la source EASY-Spray<sup>TM</sup> entre chaque injection. Les aires relatives des pics obtenus pour chacune des transitions suivies pour les deux peptides caractéristiques sont reportées en Figure 92. La valeur de 100% correspond à l'aire la plus grande obtenue.

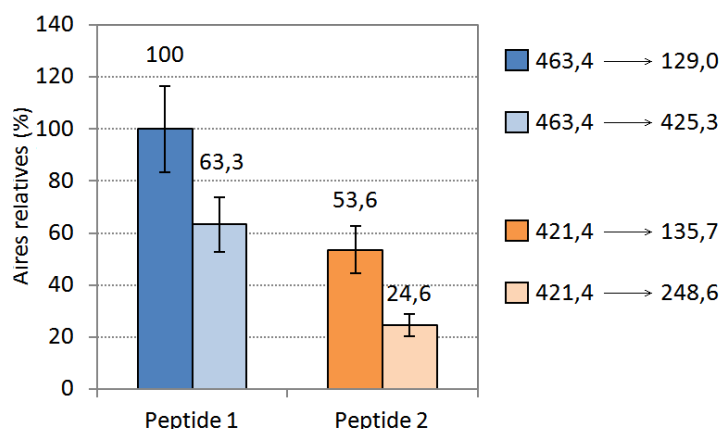


**Figure 92** : Aires relatives des pics des deux transitions des deux peptides spécifiques du cytochrome C de rapports  $m/z$  463,4 et 421,3 obtenus après digestion en solution à la pepsine de 25  $\mu\text{g/mL}$  de cytochrome C pendant 16 h ( $E/S = 1/25$ ). Injection : 250 nL. Déconnexion de la source entre chaque injection.  $n = 3$ .

Des coefficients de variation compris entre 16,5% et 16,9% ont été obtenus respectivement sur les aires des pics des peptides 1 et 2. Cette répétabilité s'avère globalement satisfaisante en considérant que ces injections ont été effectuées sur un même digestat en des jours différents, après déconnexion et reconnexion de la source nanoESI et de la colonne analytique et conservation du digestat au congélateur.

### 3.1.6 Linéarité de la méthode de quantification développée

A ce stade de l'étude, nous avons ensuite voulu vérifier que la réponse de l'aire des peptides 1 et 2 était linéaire avec la quantité de cytochrome C digérée, ainsi qu'évaluer la limite de quantification du système et la répétabilité de l'étape de digestions en solution. Pour ce faire, 6 digestions en solution de concentrations croissantes de cytochrome C ont été réalisées : 0,5 ; 1,0 ; 5,0 ; 10 ; 25 et 50  $\mu\text{g/mL}$ . Pour chacune des concentrations, trois digestions en solution indépendantes ont été réalisées avec la pepsine avec un rapport  $E/S$  de 1/25. Ces digestions ont été réalisées pendant 16 heures à 37°C dans un volume total d'acide formique (pH 2,0) de 1 mL. Chaque digestat a ensuite été injecté directement *via* la boucle d'injection manuelle de 250 nL et analysée par nanoLC-MS/MS en mode MRM. L'aire des pics de chacune des transitions suivies pour les peptides est tracée en fonction de la quantité de cytochrome C digérée et présentée en Figure 93.

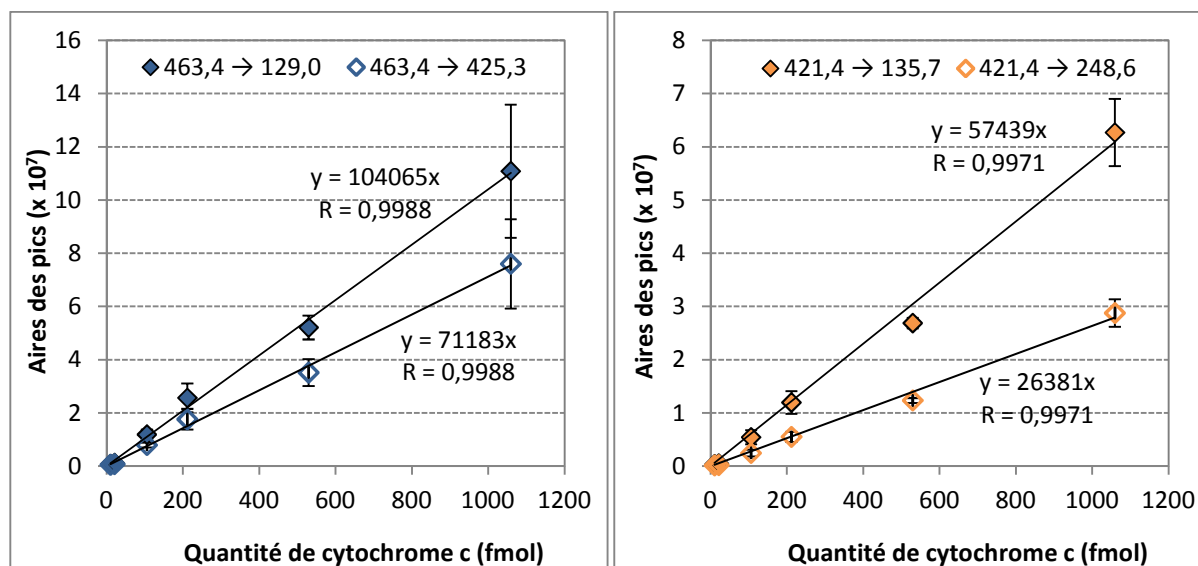


Figure 93 : Aires des pics correspondant aux deux transitions sélectionnées pour chacun des deux peptides spécifiques du cytochrome C de rapports  $m/z$  463,4 et 421,3 obtenus après digestion en solution à la pepsine de quantités croissantes de cytochrome C pendant 16 h ( $E/S = 1/25$ ).  $n = 3$  digestions

Il est tout d'abord visible que la répétabilité des aires de pics pour chaque digestion s'avère bonne. En effet, les C.V. calculés sur chaque concentration sont compris entre 5,4% et 19,2% pour les deux transitions du peptide 1 et sont compris entre 3,1% et 22,0% pour les deux transitions du peptide 2. Considérant que l'erreur sur chaque point résulte des incertitudes de mesure inhérente au spectromètre de masse et à la nouvelle source nanoESI (évaluée à environ 16,5% précédemment) ainsi qu'à la variabilité des digestions conduites indépendamment les unes des autres, ces coefficients de variation se sont avérés très satisfaisants. Ensuite, il est visible que la réponse des deux peptides est linéaire avec la quantité de cytochrome C digérée et analysée par nanoLC-MS<sup>2</sup>. En effet, des coefficients R de 0,9988 peuvent être observés par régression linéaire sur les pics des deux transitions suivies pour le peptide 1 et des coefficients R de 0,9971 sont quant à eux calculés pour les transitions du peptide 2 confirmant une bonne linéarité de la digestion des deux peptides avec la quantité de cytochrome C digérée. Les aires des pics chromatographiques des transitions suivies pour les deux peptides choisis sont donc bien proportionnelles à la quantité de cytochrome C digérée dans une gamme allant de 10,6 fmol à 1,06 pmol injectés. A l'aide de ces résultats, la hauteur des pics a également pu être évaluée et comparée avec la hauteur du bruit observé pour chacune des transitions. La limite de « quantification » du système tel qu'utilisé dans notre étude a été déterminée ( $S/N \approx 10$ ) comme se situant autour de 10 fmol en équivalent de cytochrome C injectée.

### 3.2 Caractérisation de la précolonne de piégeage

Le système de couplage d'un IMER avec la nanoLC-MS/MS présenté en Figure 81 implique l'utilisation d'une précolonne de piégeage de manière à refocaliser les peptides issus de la digestion et ne pas exposer l'IMER à une forte quantité de solvant organique. Il est ainsi indispensable de

caractériser l'efficacité du piégeage des deux peptides caractéristiques sur cette précolonne après digestion enzymatique à la pepsine. La précolonne de piégeage choisie consiste en une précolonne capillaire Acclaim® Pepmap100 C18 (2 cm x 100 µm d.i., 5 µm, 100 Å) permettant la rétention des peptides par interaction hydrophobe.

### 3.2.1 Présentation du montage

De manière à optimiser le protocole de transfert des peptides vers la précolonne de piégeage il a été envisagé d'injecter des digestats correspondant à la digestion pepsique de CYC en solution à une concentration de 25 µg/mL dans l'acide formique (pH = 2,0) avec un rapport E/S de 1/25. Le montage utilisé pour cette caractérisation est présenté en Figure 94.

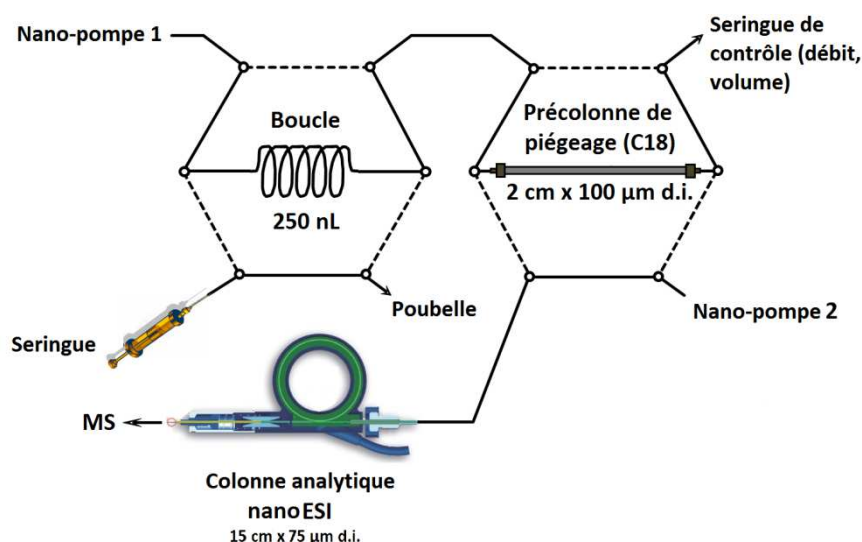


**Figure 94 :** Schéma du montage de préconcentration des peptides issus de la digestion pepsique du cytochrome C sur la précolonne de piégeage (Acclaim® Pepmap100, C18, 5 µm, 100 Å, 100 µm d.i. x 2 cm)

Ce montage est similaire à celui utilisé jusqu'à maintenant pour le couplage en ligne de mIS ou de mOS à la nanoLC. Le protocole consiste, après remplissage de la boucle d'injection de la première nano-vanne (250 nL) avec le digestat, à commuter cette première nano-vanne pour transférer les peptides vers la précolonne (2 cm x 100 µm d.i.) grâce à la nano-pompe 1 délivrant une solution d'acide formique pH 2,0 à 200 nL/min. Le débit ainsi que le volume effectivement percolé au travers de la précolonne de piégeage sont toujours contrôlés au moyen d'une seringue sans piston branchée en sortie de la précolonne. Dès que le volume d'acide formique (pH 2,0) souhaité a été percolé, la deuxième nano-vanne est basculée permettant le transfert des peptides piégés, de la précolonne de piégeage vers la colonne analytique et le spectromètre de masse grâce à la phase mobile délivrée par la nano-pompe 2. La phase mobile utilisée est identique à celle déjà décrite en partie 3.1.2 et est constituée d'eau et d'acétonitrile acidifiés avec 0,1% (v/v) d'acide formique. Un gradient de 2% à 35% en acétonitrile en 20 min est utilisé pour l'analyse tout comme précédemment.

### 3.2.2 Optimisation d'un protocole de piégeage des peptides

Nous avons dans un premier temps voulu caractériser la rétention des deux peptides caractéristiques sur la précolonne de piégeage en faisant varier le volume de transfert, *i.e.* le volume d'acide formique (pH 2,0) délivré par la nano-pompe 1 après basculement de la première nanovanne. Il a été décidé ici de ne pas utiliser la notion de volume de lavage contrairement aux chapitres précédents car le volume des connectiques reliant la précolonne de piégeage à la deuxième nanovanne ne sont pas connus précisément. Certaines connectiques, dont les dimensions et donc les volumes morts ne sont pas connus, sont en effet solidaires de la précolonne de piégeage. L'évolution des aires des pics de chacune des deux transitions suivies correspondant aux deux peptides ciblés en fonction du volume de transfert appliqué est représentée en Figure 95.

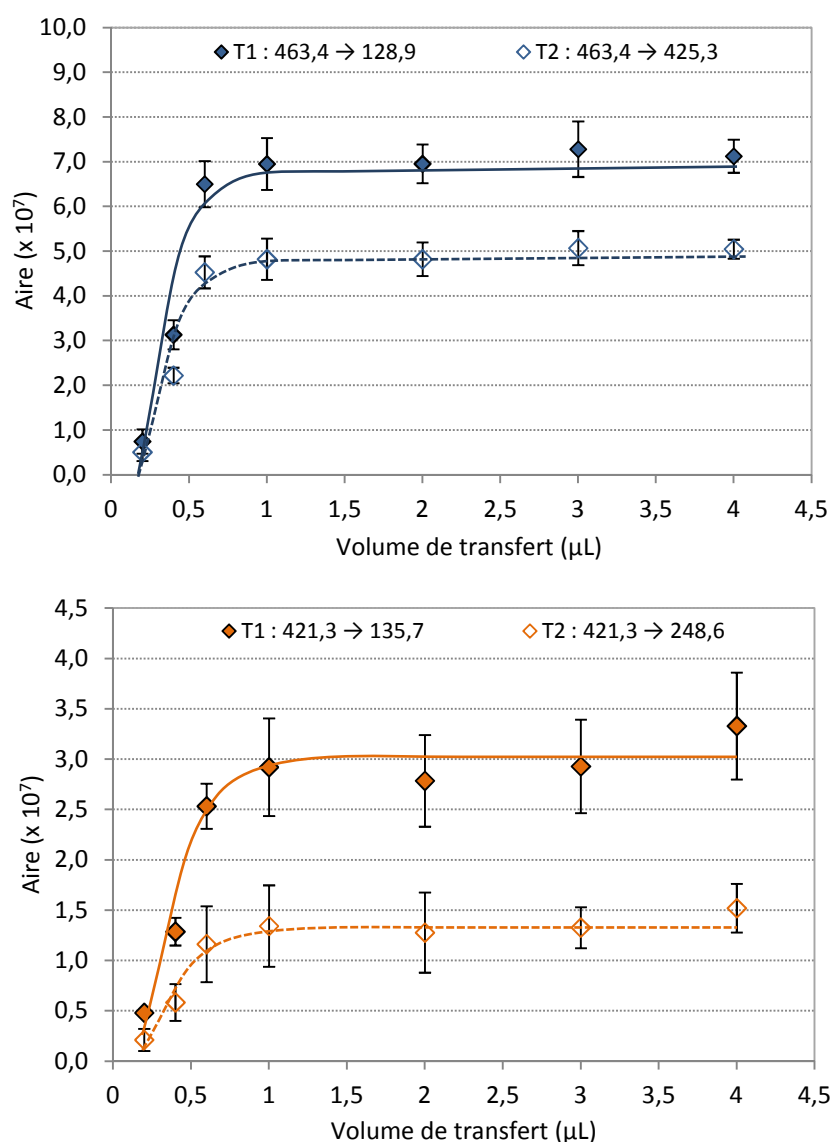


Figure 95 : Aires des pics des deux peptides spécifiques du cytochrome C de rapports  $m/z$  463,4 et 421,3 obtenus après digestion en solution à la pepsine de 25 µg de cytochrome C pendant 16 h ( $E/S = 1/25$ ) et injection puis transfert vers la précolonne de piégeage en fonction du volume de transfert utilisé.

Il est visible que les deux peptides sont intégralement transférés vers la précolonne après transfert avec un volume de 600 nL. En effet, l'aire des pics pour chacune des deux transitions caractéristiques des peptides augmentent jusqu'à atteindre un plateau au-delà de cette valeur. Après 600 nL commence réellement l'étape de lavage du support greffé C18. Il peut être constaté que les peptides restent bien piégés sur la précolonne de piégeage après un volume de transfert de 4,0  $\mu$ L correspondant donc à un volume lavage pouvant être estimé à environ 3,4  $\mu$ L correspondant à 31 fois le volume interstitiel de la précolonne en supposant une porosité de 0,7. Considérant que les connectiques reliant la première nano-vanne à la seconde ont un volume connu d'environ 70 nL, le capillaire reliant la nano-vanne à l'entrée de la précolonne a, lui, un volume qui peut être estimé comme étant inférieur à 530 nL. Ce volume est le même en sortie de la précolonne. De manière à être certain que la totalité de la matrice initiale soit poussée hors de la précolonne et de ses connectiques il est donc nécessaire de pousser l'échantillon avec environ 1,1  $\mu$ L d'acide formique (pH 2,0) au minimum.

Enfin, il est à noter que ce montage, impliquant un piégeage des peptides dans une précolonne, entraîne un décalage du temps de rétention des pics comme déjà observés dans les chapitres précédents avec les mIS ou mOS. Des exemples de chromatogrammes obtenues pour les deux premières transitions suivies pour les peptides 1 et 2 après injection directe d'un digestat de cytochrome C en nanoLC-MS<sup>2</sup> et après préconcentration préalable sur la précolonne de piégeage sont présentés en Figure 96. Les temps de rétention moyens des peptides 1 et 2 passent respectivement de 6,6 min et 13,6 min avec des injections en solutions à  $9,92 \pm 0,15$  min (C.V. = 1,5%) et  $15,95 \pm 0,14$  min (C.V. = 0,9%) soit un retard de 3,32 et 2,35 min respectivement. Cependant, malgré ce retard, aucun élargissement de pic n'a été constaté. Enfin, le rendement de piégeage s'avère élevé. En effet, une aire de pics moyenne de  $7,12 \pm 0,37 \times 10^7$  (n = 3, C.V. = 5,2%) a été obtenue pour la transition 1 du peptide 1 après un lavage avec 3,4  $\mu$ L contre  $6,22 \pm 0,34 \times 10^7$  (n = 3, C.V. = 5,4%) avec une injection directe de la même solution (25  $\mu$ g/mL CYC digérée) directement sur la colonne analytique. Ceci correspond à un taux de piégeage de 114%, dans la marge d'erreur de 16 à 17% pouvant être associée à l'analyse par nanoLC-MS<sup>2</sup> (partie 3.1.5). De la même façon, le pic de la première transition du peptide 2 présente une aire moyenne de  $3,33 \pm 0,53 \times 10^7$  (n = 3, C.V. = 15,9%) sur la précolonne de piégeage avec un lavage avec 3,4  $\mu$ L contre  $3,17 \pm 0,10 \times 10^7$  (n = 3, C.V. = 3,1%) en injection directe. Ces deux valeurs ne sont pas significativement différentes, la première représente 105% de la seconde. Les digestions qui seront menées en ligne peuvent donc être comparées directement aux injections directes en nanoLC des mêmes quantités de CYC.

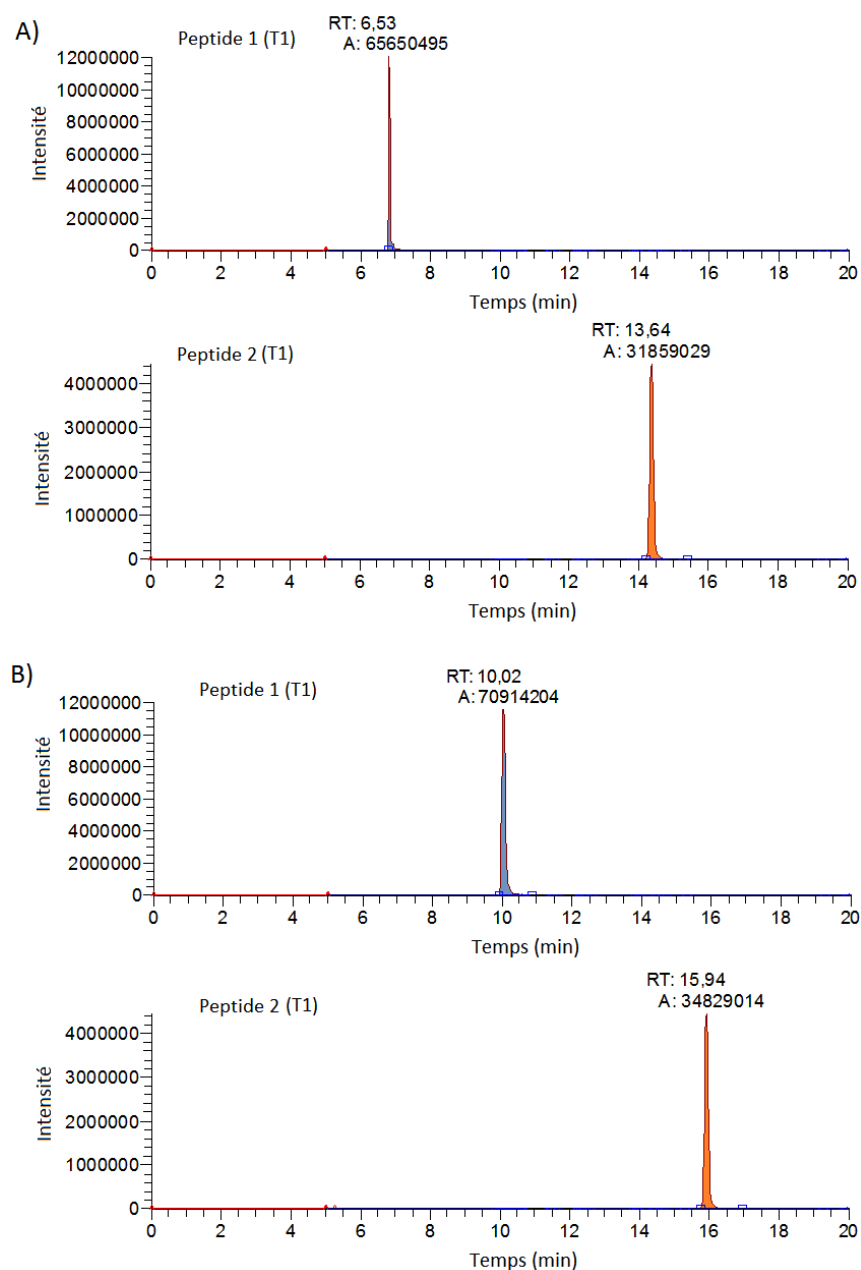


**Figure 96 :** Exemple de chromatogrammes obtenus après injection d'un digestat de cytochrome C pour les transitions 1 des deux peptides caractéristiques. Digestion en solution à la pepsine de 25 µg de cytochrome C pendant 16 h (E/S = 1/25). A) Injection directe en nanoLC-MS². B) Injection puis transfert vers la précolonne de piégeage avec un volume de transfert de 4,0 µL. Volume d'injection : 250 nL.

### 3.3 Immobilisation de pepsine

Au vu du succès de l'immobilisation des aptamères sur des monolithes en capillaire de perméabilité proche de  $6,15 \times 10^{-14} \text{ m}^2$  synthétisé à une température de 22°C, des synthèses de monolithes similaires ont à nouveau été réalisées pour envisager cette fois le greffage d'enzymes. Pour cela, sept capillaires de perméabilité moyenne  $6,28 \pm 0,64 \times 10^{-14} \text{ m}^2$  (C.V. = 10,2%) ont été préparés.



L'immobilisation de pepsine a jusqu'à maintenant été beaucoup moins largement décrite que celle de la trypsine du fait de sa moins grande spécificité de clivage [380]. Peu de protocoles peuvent ainsi être pris comme référence concernant ce greffage sur un support à base de silice activé au glutaraldéhyde. Un protocole, mis en place par Ma *et al* a permis l'immobilisation de trypsine sur un monolithe organique-inorganique à base de TEOS et d'APTES en capillaire (100  $\mu\text{m}$  d.i.) dans le cadre du développement d'un IMER de trypsine comme mentionné précédemment [269]. Ce protocole consiste, après activation au glutaraldéhyde, à percoler pendant 24h une solution de trypsine à 2 mg/mL dans du tampon phosphate (100 mM) pH 8,0, contenant également 5 mg/mL de  $\text{NaCNBH}_3$  et 50 mM de benzamidine. Le cyanoborohydrure de sodium permet de réduire l'imine formée par réaction des fonctions aldéhyde du support avec les fonctions amine des enzymes tandis que la benzamidine est un inhibiteur de l'activité de la trypsine permettant d'éviter son autolyse au cours du greffage. De manière à réaliser un IMER à base de pepsine, deux protocoles similaires à celui développé par Ma *et al* ont donc été testés. Jusqu'à maintenant, le greffage des anticorps ou des aptamères a été réalisée *via* une étape de réduction des imines ultérieure à la percolation des biomolécules considérées. De ce fait, le seul changement appliqué a été dans un cas de percoler une solution de pepsine contenant le réducteur ( $\text{NaCNBH}_3$ ) de manière similaire à Ma *et al* et dans l'autre cas de percoler une solution de pepsine ne contenant pas ce réducteur et de faire suivre cette étape de la percolation d'une solution du réducteur avant de procéder aux étapes de rinçage. D'autre part, si la benzamidine permet d'inhiber l'activité de la trypsine, il n'en est pas de même pour la pepsine. De façon à inhiber l'activité de la pepsine, une autre voie consiste à modifier le pH de la solution. En effet, si l'activité de la pepsine est maximale à pH 2,0, cette activité décroît rapidement et est pratiquement nulle au-delà d'un pH de 5,5 [405]. Toutefois, si dans une gamme de pH allant de 5,5 à 7,0-7,5 la pepsine est stable et qu'un simple retour à un pH plus faible de 2,0 permet de recouvrir une pleine activité de l'enzyme, un pH supérieur à 7,5 inactive de façon irréversible l'activité de la pepsine [405] ce qui ne permettra pas d'envisager son utilisation une fois greffée. De ce fait, une solution de pepsine à pH 5,5 a été utilisée pour le greffage. Le principe général de greffage de la pepsine sur monolithe est schématisé en Figure 97.

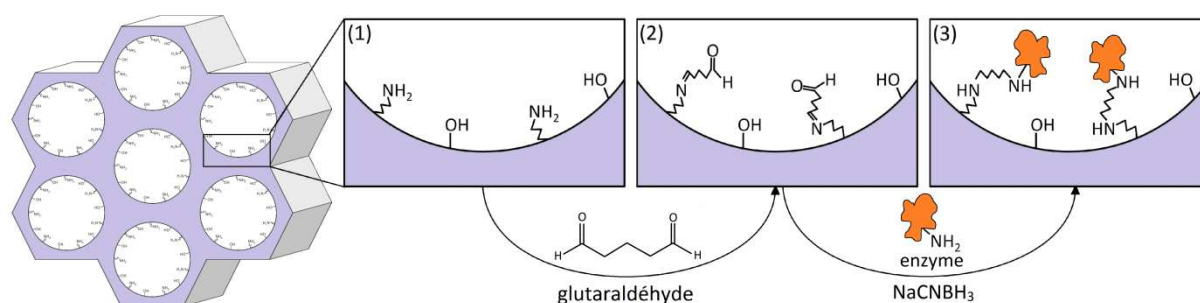


Figure 97 : Principe général du greffage d'enzymes sur le monolithe organique-inorganique synthétisé en capillaire.

L'immobilisation de pepsine a été réalisée par activation de la surface des pores du monolithe au glutaraldéhyde (10 % w/w dans tampon phosphate 100 mM pH 8,0) pendant 16 heures puis percolation de 60  $\mu$ L d'une solution de pepsine à 2 mg/mL dans du tampon phosphate (100 mM) pH 5,5 (*i.e.* 120  $\mu$ g de pepsine). Cette étape est suivie d'un premier rinçage avec un tampon phosphate (100 mM) pH 5,5. L'agent réducteur ( $\text{NaCNBH}_3$ ) permettant de stabiliser la liaison covalente au monolithe a été introduit dans le protocole de deux manières comme évoqué précédemment. Les IMER n°1, 2, 3 et 4 ont été synthétisés en introduisant cet agent directement dès la percolation de la solution d'enzymes à travers les monolithes en capillaire activés tandis que les IMER n°5, 6 et 7 ont été synthétisés en percolant une solution de tampon phosphate (100 mM) pH 5,5 contenant cet agent après percolation de la solution d'enzymes et du premier rinçage au tampon phosphate. L'ensemble de ces étapes sont ensuite suivies d'une deuxième phase de rinçage avec un tampon Tris-HCl 100 mM (pH 4,5) permettant d'inactiver les groupements aldéhyde n'ayant pas réagi et d'un deuxième rinçage au tampon phosphate. Les IMER sont alors conservés dans ce dernier tampon à 4°C avant utilisation. Ne connaissant pas encore l'efficacité du greffage des enzymes tout comme l'efficacité de digestion sur de tels supports, une longueur de 10 cm a été conservée pour chaque IMER (100  $\mu$ m d.i.)

### 3.4 Caractérisation des IMER de pepsine

#### 3.4.1 Détermination du taux de greffage

Avant de coupler les IMER avec la nanoLC-MS<sup>2</sup>, la quantité de pepsine greffée a été mesurée de manière à s'assurer du succès du greffage *via* les deux protocoles appliqués.

##### 3.4.1.1 Rappel du principe

Le taux de greffage de la pepsine sur les IMER n°1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 a été dans chaque cas déterminé indirectement en utilisant une méthode de dosage au BCA comme déjà décrit pour les anticorps (cf. Annexe 5). Pour rappel, les protéines ont la propriété de réduire l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  en ion  $\text{Cu}^+$ . La quantité d'ion  $\text{Cu}^+$  est alors proportionnelle à la quantité de protéines. La méthode de dosage est basée sur la spécificité de l'acide bicinchoninique pour l'ion  $\text{Cu}^+$  qui change de couleur en sa présence et permet, par mesure spectrophotométrique, de déterminer la concentration en protéines. Les enzymes étant disponibles en quantité suffisante (contrairement aux anticorps), les gammes d'étalonnage (standards) ont été réalisées avec la pepsine dans du tampon phosphate (100 mM, pH 5,5). Enfin, les notices d'utilisation des kits de dosage au BCA mettant en garde sur de possibles interactions de cette méthode de dosage avec le réducteur utilisé, le  $\text{NaCNBH}_3$ , l'effet de cette possible interaction a été évalué en utilisant des solutions de pepsine de concentrations croissantes préparées dans du tampon phosphate pH 5,5 contenant 0; 1,5 et 3 mg/mL de  $\text{NaCNBH}_3$ . Les résultats

présentés en Annexe 5 montrent que les gammes d'étalonnage à la pepsine réalisées ne sont pas différentes qu'elles soient réalisées dans une solution contenant ou non du  $\text{NaCNBH}_3$ . Cette méthode a donc pu être utilisée.

### 3.4.1.2 Cas d'une immobilisation en présence de réducteur

Les taux de greffage des IMER n°1, 2, 3 et 4 ont tout d'abord été déterminés en dosant pour chacun deux solutions collectées en sortie du capillaire au cours du protocole d'immobilisation de la pepsine : la première correspondant à un mélange de la solution d'enzymes après greffage et à la première phase de rinçage au tampon phosphate et la deuxième aux autres étapes de rinçage. Les résultats en termes de densité de biomolécules immobilisées au sein des capillaires et les conditions de greffage appliquées sont reportés dans le Tableau 16 et comparés avec les données déjà référencées dans les précédents chapitres pour les aptamère et les anticorps.

**Tableau 16 :** Taux de greffage de la pepsine sur les IMER n°1,2,3 et 4 et comparaison avec les aptamères et anticorps. Comparaison des conditions de greffage et rendements de greffage.

|                                                         | IMER                                 | mOS                                | mIS               |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| Biomolécule greffée                                     | Pepsine                              | Aptamère                           | Anticorps         |
| Masse biomolécule                                       | 34.5 kDa                             | 11.6 kDa                           | 150 kDa           |
| Densité de greffage ( $\text{nmol } \mu\text{L}^{-1}$ ) | $2.46 \pm 0.29$                      | $6.27 \pm 0.38$                    | 0.026             |
| <u>Conditions de greffage</u>                           |                                      |                                    |                   |
| $L_{\text{capillaire}}$                                 | 10 cm                                | 10 cm                              | 4.5 cm            |
| $V_{\text{percolé}}$                                    | 60 $\mu\text{L}$                     | 60 $\mu\text{L}$                   | 20 $\mu\text{L}$  |
| $C^{\circ}_{\text{biomolécule}}$                        | 58.0 $\mu\text{M}$                   | 86.4 $\mu\text{M}$                 | 6.7 $\mu\text{M}$ |
| $Q_{\text{té}}^{\text{biom. perc.}}$                    | 3.5 nmol                             | 5.2 nmol                           | 0.13 nmol         |
| <b>Rendement de greffage</b>                            | <b><math>44.4\% \pm 6.5\%</math></b> | <b><math>96.4 \pm 1.6\%</math></b> | <b>7.0%</b>       |

$C^{\circ}_{\text{biomolécule}}$  = concentration en biomolécules dans la solution de greffage.  $L_{\text{capillaire}}$  = longueur du capillaire,  $Q_{\text{té}}^{\text{biom. perc.}}$  = quantité totale de biomolécules percolées.  $V_{\text{percolé}}$  = volume de solution de biomolécules percolé

Un rendement moyen de  $44,4\% \pm 6,5\%$  (C.V. = 14,6%,  $n = 4$ ) a été obtenu sur les quatre IMER (IMER n°1, 2, 3 et 4) synthétisés avec présence du réducteur dans la solution de greffage (et donc dès la percolation de la pepsine à travers un capillaire activé au glutaraldéhyde). La deuxième phase de rinçage s'est avérée ne pas contenir de pepsine (quantité  $< 1 \mu\text{g}$  sur 120  $\mu\text{g}$  introduits initialement), ce qui montre que la première phase de rinçage au tampon phosphate est suffisante pour éliminer les enzymes simplement adsorbés à la surface du monolithe. La quantité moyenne de pepsine immobilisée dans un capillaire de 10 cm par cette méthode est donc de  $66,8 \mu\text{g} \pm 7,8 \mu\text{g}$  soit  $1,94 \text{ nmol} \pm 0,23 \text{ nmol}$ . Cette valeur correspond à une densité d'immobilisation moyenne de  $2,46 \text{ nmol} \pm 0,29 \text{ nmol}$  d'enzymes par  $\mu\text{L}$  de capillaire. Cette valeur est de l'ordre de 2,7 fois moins importante que la valeur rapporté pour les aptamères pour un monolithe préparé dans les mêmes conditions et

de l'ordre de 90 fois plus élevé que pour les anticorps sur un monolithe présentant une perméabilité trois fois inférieure. La pepsine présentant une masse moléculaire de 34,5 kDa ces résultats semblent cohérents avec le fait que la taille de la biomolécule greffée joue un rôle crucial dans la densité de greffage atteignable. En effet les aptamères utilisés précédemment ont, eux, une masse de l'ordre de 11,6 kDa soit trois fois inférieure à celle de la pepsine et les anticorps quant à eux ont une masse de l'ordre de 150 kDa, soit 4,4 fois supérieure à celle de la pepsine. Toutefois, comme déjà évoqué dans le chapitre 4, une comparaison rigoureuse des densités volumétriques de biomolécules immobilisées dans les capillaires impliquerait d'utiliser les mêmes concentrations molaires de biomolécules dans les solutions de greffage, ce qui n'a pas été le cas dans cette étude (cf. Tableau 16). Ces résultats permettent néanmoins d'entrevoir une tendance pour comparer le greffage de la pepsine avec celui des aptamères, ces deux biomolécules ayant été immobilisées en percolant des volumes de solutions identiques à des concentrations molaires relativement proches.

Enfin, pour l'injection de 250 nL d'une solution de cytochrome C dont la concentration se situe dans une gamme allant de 0,5 µg/mL à 50 µg/mL, soit environ 10,6 fmol à 1,06 pmol de CYC, la quantité de pepsine greffée renvoie un rapport E/S de l'ordre de  $1,8 \times 10^3$  à  $1,8 \times 10^5$ . En considérant que 2 à 5% des enzymes sont encore actives à la surface du monolithe, ce qui semblait être l'ordre de grandeur de la quantité de biomolécules actives une fois greffées dans les précédents chapitres, les rapport E/S restent extrêmement élevés et compris entre 37 et  $3,7 \times 10^3$  selon les concentrations en CYC injecté.

#### 3.4.1.3 Cas d'une immobilisation avec étape de réduction ultérieure

Les taux de greffage obtenus sur les trois supports (IMER n°5, 6 et 7) préparés avec une étape de réduction au cyanoborohydrure de sodium ultérieure à la percolation de la pepsine à travers les capillaires monolithiques activés au glutaraldéhyde ont également été mesurés.

De la même façon que précédemment, la troisième phase (rinçage) s'est avérée ne pas contenir de pepsine (quantité < 1 µg sur 60 µg introduits initialement). La deuxième phase de percolation de l'agent réducteur s'est avérée contenir entre 1,2 et 5,3 µg de pepsine pour ces trois IMER, montrant l'élimination d'une partie des enzymes simplement adsorbées à la surface du monolithe. La majorité des enzymes non greffées ont donc été récupérée lors de la première phase comprenant la percolation de la solution d'enzymes suivie d'un rinçage par 6,0 µL de tampon phosphate (100 mM), pH 5,5.

Contrairement à l'approche précédente, le greffage des enzymes s'est avéré beaucoup moins répétable avec cette procédure. En effet, des rendements de greffage moyen de 24,3%, 7,3% et 62,6% ont été obtenus respectivement sur les IMER n°5, 6 et 7. Toutefois, malgré cette faible répétabilité, les résultats indiquent bien que, dans les trois cas, des enzymes ont été greffées sur le support. Comme les quantités de CYC destinées à être injectées sur les IMER sont très faibles, même

l'IMER contenant la plus petite quantité de pepsine greffée peut permettre, en théorie, la digestion du CYC. En considérant une porosité de 0,8 pour le monolithe, le volume de l'IMER est de 630 nL. Par exemple, si une digestion est menée sur 250 nL de cytochrome C à 5 µg/mL et que l'intégralité des pepsines greffées est active, le rapport E/S théorique serait ainsi de 1000 pour l'IMER n°6. En considérant que seules 2% des enzymes sont actives, en se basant sur les résultats précédemment obtenus pour les aptamère et les anticorps, ce rapport reste de l'ordre de 20 ce qui est très élevé en comparaison du rapport de 1/25 utilisé jusqu'à maintenant avec succès pour les digestions en solution.

### 3.4.2 Présentation du montage

Les IMER préparés ont ensuite été intégrés dans un montage permettant leur couplage avec la nanoLC-MS<sup>2</sup>. Le montage utilisé est schématisé en Figure 98. Ce montage comprend deux nano-vannes six-voies. La première nano-vanne comprend une boucle d'injection de 250 nL et est reliée à une première nano-pompe (nano-pompe 1) et à l'entrée de l'IMER (10,0 cm x 100 µm d.i.). La deuxième nano-vanne est reliée quant à elle à la sortie de cet IMER, à la précolonne capillaire de piégeage caractérisée en partie 3.2.2, à une nano-pompe analytique (nano-pompe 2) délivrant la phase mobile nécessaire à l'analyse et à la colonne analytique. La température ayant un effet prononcé sur l'efficacité de la digestion, l'IMER a systématiquement été équilibré à une température de 37°C dans un four à colonne (Thermo Scientific). L'ensemble des connexions ont été réalisées au moyen de capillaires de très faible diamètre interne (20 µm d.i.) de manière à minimiser au maximum les volumes morts du système.

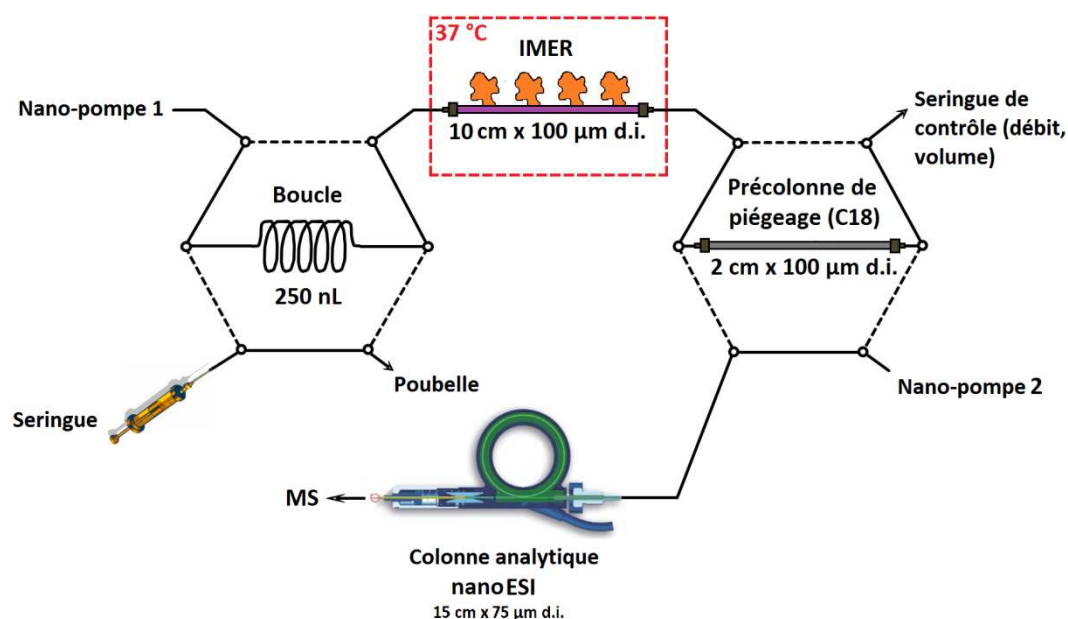


Figure 98 : Schéma du montage utilisé pour la digestion en ligne et couplage à la nanoLC-MS<sup>2</sup>

La nano-pompe 1 délivre une phase aqueuse consistant en de l'acide formique à pH 2,0. Après chargement de la boucle avec une solution de cytochrome C dans l'acide formique à pH 2,0 et basculement de la première nano-vanne, l'échantillon est transféré depuis la boucle d'injection de 250 nL vers l'IMER à un débit fixé à 50 nL/min. Les volumes morts des connectiques entre la boucle d'injection et l'IMER ont été évalués à environ 70 nL. De ce fait, le contenu de la boucle d'injection sera transféré intégralement dans l'IMER avec un volume de transfert compris entre 320 nL (250 nL + 70 nL, volume théorique à partir duquel tout l'échantillon se trouve dans l'IMER) et 700 nL (volume à partir duquel l'échantillon commence à sortir de l'IMER). Un volume de transfert de 400 nL a donc été choisi afin d'être certain d'avoir transféré l'intégralité de l'échantillon dans l'IMER. Ce volume de transfert est contrôlé au moyen d'une seringue connectée en sortie de la précolonne de piégeage. Une fois ce transfert réalisé, le débit de la nano-pompe 1 est arrêté (*stop flow*) de manière à procéder à la digestion de la protéine au sein de l'IMER. Une fois le temps nécessaire à la digestion écoulé, un débit est de nouveau imposé sur la nano-pompe 1 et fixé à une valeur de 200 nL/min de manière à transférer le digestat obtenu, de l'IMER vers la précolonne de piégeage capillaire. Le volume de transfert choisi pour cette étape est de 4,0  $\mu$ L. Le volume des connectiques entre la sortie de l'IMER et la deuxième nano-vanne est d'environ 150 nL. Si l'on considère que le volume restant à parcourir à l'échantillon pour sortir intégralement de l'IMER est de 550 nL, ce volume de connectiques (150 nL) et les volumes morts estimés pour les connectiques de la précolonne ( $\approx$  530 nL), les peptides sont intégralement transférés au-delà d'un volume de transfert de 1,23  $\mu$ L. De fait, avec un volume de transfert de 4,0  $\mu$ L, les peptides sont bien piégés dans la précolonne C18 et le lavage de la colonne est effectué avec environ 2,8  $\mu$ L d'acide formique (pH 2,0). Ce lavage est équivalent à un point à 3,4  $\mu$ L sur la Figure 95. Après que le volume d'acide formique adéquat a été percolé au travers de la précolonne de piégeage, la deuxième nano-vanne est basculée permettant ainsi à la phase mobile hydro-organique de passer au travers de celle-ci (débit = 300 nL/min) et rompre ainsi les interactions entre les peptides issus de la digestion et la phase de silice greffée C18 de la précolonne. Les peptides sont alors élués de la précolonne de piégeage et transférés vers la colonne analytique et le spectromètre de masse par la phase mobile.

### 3.4.3 Digestions en ligne sur IMER de pepsine à pH 2,0

#### 3.4.3.1 Optimisation de la durée du *stop flow*

Au regard des résultats précédents, les IMER issus du premier protocole d'immobilisation ont tout d'abord été privilégiés pour être couplés à la nanoLC-MS/MS. La première étape a été de s'assurer de la durée du *stop flow* nécessaire à la digestion. Pour cela, l'IMER n°1 a été intégré dans le montage présenté en Figure 98 et le protocole de digestion en ligne, décrit ci-avant, appliqué. Une durée de 20 min a tout d'abord été envisagée. Cette durée est la durée qui a déjà été optimisée au sein du LSABM au cours d'une précédente thèse doctorale sur des IMER au format conventionnel

préparés par greffage d'enzymes sur particules conditionnées en précolonne et couplées à la LC-MS<sup>2</sup> [86, 87, 384]. Avec une telle durée de digestion, des aires représentant de l'ordre de 2,3% des aires de pics obtenues pour les transitions des peptides caractéristiques après digestion en solution ont été obtenues, sous la limite de quantification déterminé précédemment. De façon à améliorer la digestion, la durée du *stop flow* a été augmentée lors de la deuxième injection. Une durée de 60 min a ainsi été envisagée. Avec une telle durée, des aires de pics de l'ordre de 8,8 % ont été obtenus lors de ces premières injections montrant clairement que la digestion avait lieu. Sur une troisième injection réalisée avec un *stop flow* de 2 heures les aires de pics ne se sont pas révélées être meilleures avec une moyenne de l'ordre de 10,4% des aires de pics obtenues après digestion en solution. Il peut paraître surprenant que l'augmentation de la durée de digestion entre 1h et 2h entraîne une si faible augmentation du rendement de digestion. Par ailleurs, ces faibles taux de digestion, après des durées de digestion en ligne très longues, semblent surprenants au regard des taux de digestion élevés qui ont été obtenus sur des particules greffées en précolonne au LSABM [86, 87, 384].

De manière à faire un compromis entre rendement de digestion élevé et temps de digestion raisonnable, une durée de *stop flow* de 60 min a finalement été choisie pour la suite de l'étude bien que cette durée soit déjà élevée, un IMER étant supposé permettre une digestion en moins de 20 min [406].

### 3.4.3.2 Comparaison des digestions en ligne et des digestions en solution

#### *a Digestions en solution à pH 2,0 à quantité de pepsine fixée*

De façon à évaluer la linéarité des digestions avec une quantité de pepsine constante (rapport E/S variable) nous avons également envisagé de digérer du cytochrome C en présence d'une quantité de pepsine fixée. L'ensemble des digestions en solution est toujours effectuée dans un volume de 1 mL de solution d'acide formique pH 2,0. La quantité de pepsine introduite dans ce volume de solution a été fixée à 0,58 µg soit un rapport E/S de 1/25 pour une concentration de CYC de 5 µg/mL. Le rapport E/S minimal est obtenu pour une concentration en CYC de 50 µg/mL avec une valeur de 1/250. Les résultats de ces digestions sont présentés en Figure 99.

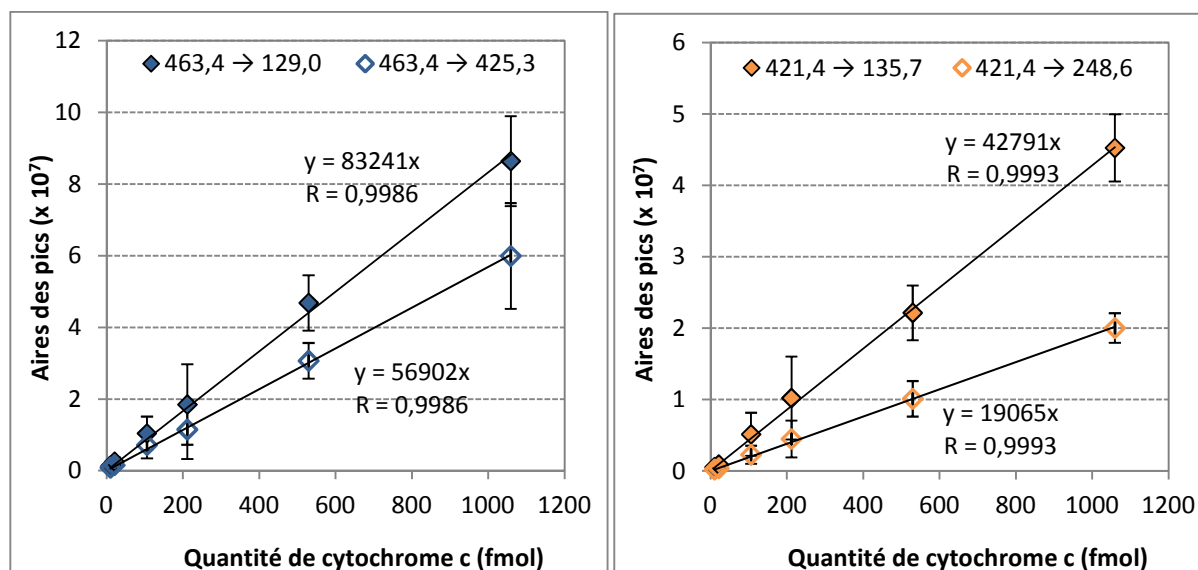


Figure 99 : Aires des pics correspondant aux deux transitions sélectionnées pour chacun des deux peptides spécifiques du cytochrome C de rapports  $m/z$  463,4 et 421,3 obtenus après digestion en solution à la pepsine à pH 2,0 de quantités croissantes de cytochrome C pendant 16 h avec une quantité de pepsine fixée à 0,6  $\mu\text{g}$  (rapport E/S = 1/25 pour 5  $\mu\text{g}$  de cytochrome C).

Il est visible que les digestions en solution réalisées avec une quantité de pepsine fixée conduisent à une réponse linéaire de l'aire des peptides avec la quantité de cytochrome C introduite et digérée. De bons C.V. sont également obtenus pour les concentrations les plus hautes avec notamment des valeurs de l'ordre de 14 % pour des injections de 1,06 pmol en équivalent de cytochrome C (ici avec un E/S = 1/250). Les C.V. se sont avérés cependant plus élevés pour les petites concentrations avec des C.V. compris entre 33 % et 55% pour les quatre points de concentration les plus bas qui pourtant correspondent eux à des digestions avec des rapports E/S proches voire égaux à 1/25. Enfin, si les pentes obtenues pour chacun des peptides permettent de calculer un taux de digestion compris entre 72,3 et 80,0% comparées aux pentes reportées en Figure 93 et obtenues avec un rapport E/S constant de 1/25, l'efficacité des digestions en solution réalisée avec une quantité de pepsine fixée (et donc avec un rapport E/S pouvant être 100 fois inférieur) semble malgré tout similaire à l'efficacité des digestions de rapport E/S égal à 1/25 après 16 heures dans l'acide formique (pH 2,0) à 37°C au vu de la variabilité des mesures observée aux différentes concentrations.

#### b Digestions sur IMER à pH 2,0

Des digestions en ligne ont été réalisées sur les IMER n°2, 3 et 4 préparés de manière similaire avec présence du réducteur  $\text{NaCNBH}_3$  dès la phase de greffage de l'enzyme. Des digestions de solutions de cytochrome C à 5  $\mu\text{g/mL}$  dans l'acide formique ont été conduites avec un arrêt du débit pendant 1 heure. Les résultats relatifs aux trois premières digestions réalisées sur IMER sont reportés en Figure 100 et comparés aux résultats obtenus après digestion en solution 16 heures (E/S = 1/25). Les résultats relatifs aux digestions effectuées sur l'IMER n°1 ne sont ici pas reportés, les



trois premières digestions ayant été réalisées avec une valeur de *stop flow* variable comme décrit en partie 3.4.3.1.

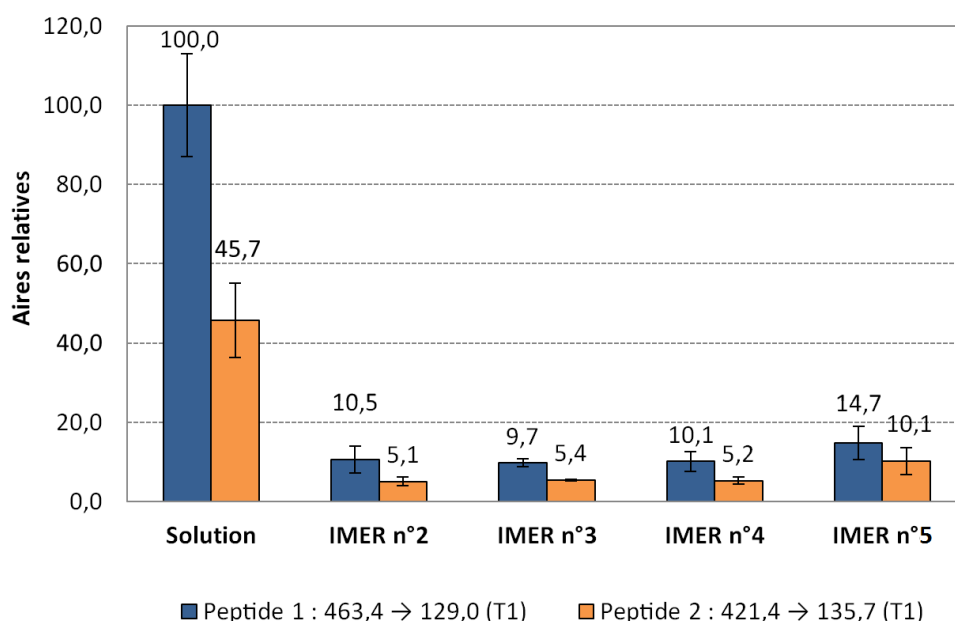


**Figure 100 :** Aires relatives des pics correspondant aux transitions T1 les plus intenses des deux peptides spécifiques du cytochrome C après digestion de 106 fmol de cytochrome C (*inj* = 250 nL, 5 µg/mL) en solution (*E/S* = 1/25) et en ligne sur les IMER n°2, 3, 4 et 5 (3 premières digestions) avec un *stop flow* de 1 heure (*n* = 3).

Ces résultats mettent tout d'abord en évidence la répétabilité satisfaisante du protocole de digestion en ligne appliqué sur des IMER préparés indépendamment les uns des autres (synthèses de monolithe et greffages d'enzymes indépendants). En effet, il peut être calculé, à partir des résultats présentés en Figure 100, qu'une aire relative moyenne de  $10,1 \pm 0,4$  (C.V. = 4,0 %) est obtenue sur les IMER n°2, 3 et 4 ce qui montre une bonne répétabilité inter-IMER. Ensuite, la répétabilité sur chacun des IMER pour les trois premières injections présentées s'avère moyenne. En effet, si un très bon C.V. de 10,5 % peut être calculé pour l'IMER n°3 sur les aires des pics du peptide n°1, les C.V. sur les deux autres IMER sont eux plus élevés et de l'ordre de 24,8 % et 32,5 % respectivement pour les IMER n°4 et 2. Des C.V. moins élevés ont pu être calculés pour la transition 1 du peptide 2 avec des valeurs de 22,6 %, 5,2 % et 17,3 % pour les IMER n°2, 3 et 4. L'ensemble de ces coefficients de variation paraissent malgré tout satisfaisant au vu de la variabilité déjà observées sur des digestions en solution indépendantes dont les C.V. sont ici, en Figure 100, de 13,0 % et 20,4 % pour les peptides 1 et 2, respectivement.

Outre la répétabilité, il apparaît clairement en Figure 100 que le rendement des digestions en ligne sur les IMER n°2, 3 et 4 reste bien inférieur à celui obtenu en solution. En effet, il est visible que quel que soit l'IMER considéré l'aire des pics correspondant aux peptides 1 et 2 n'est que de l'ordre de 10 à 11 % des mêmes aires de pics après digestion en solution.

Comme déjà évoqué, un autre protocole de greffage consistant cette fois à percoler l'agent réducteur NaCNBH<sub>3</sub> après l'immobilisation des enzymes réalisées et plus proche des protocoles

appliqués jusqu'à maintenant pour les anticorps et aptamères a aussi été envisagé. Pour cela l'IMER n°5 a été lui aussi utilisé pour réaliser des digestions en ligne de façon à voir l'effet de ce changement de protocole sur le rendement de la digestion en ligne. Il est visible en Figure 100 que les aires relatives des pics des peptides 1 et 2 sont respectivement de  $14,7 \pm 4,2$  ( $n = 3$ , C.V = 28,6%) et  $10,1 \pm 3,4$  ( $n = 3$ , C.V = 33,7%) sur les trois premières digestions réalisées sur le support. Si l'aire des pics du peptide 1 n'est pas significativement différente de celles obtenues avec les autres IMER, celle du peptide 2 par contre l'est ( $p < 0,05$ ). Il est donc difficile de conclure quant à un effet marqué de ce léger changement de protocole sur le rendement de digestion. Il semblerait que ce rendement soit de 1,4 à près de 2 fois supérieur à celui obtenu sur les trois premiers IMER. Malgré cela, l'aire des pics reste plus faible comparée à celles résultant des digestions en solution.

### 3.4.3.3 Stabilité du support

Les résultats présentés jusqu'à maintenant correspondent aux trois premières digestions réalisées sur chacun des supports. Outre les faibles rendements de digestion obtenus, il a également été observé que le rendement de digestion diminuait au fur et à mesure des injections de cytochrome C au-delà de la troisième injection. Les aires de pics moyennes obtenues après chacune des injections réalisées sur les IMER n° 2, 3 et 4 sont représentées en Figure 101.

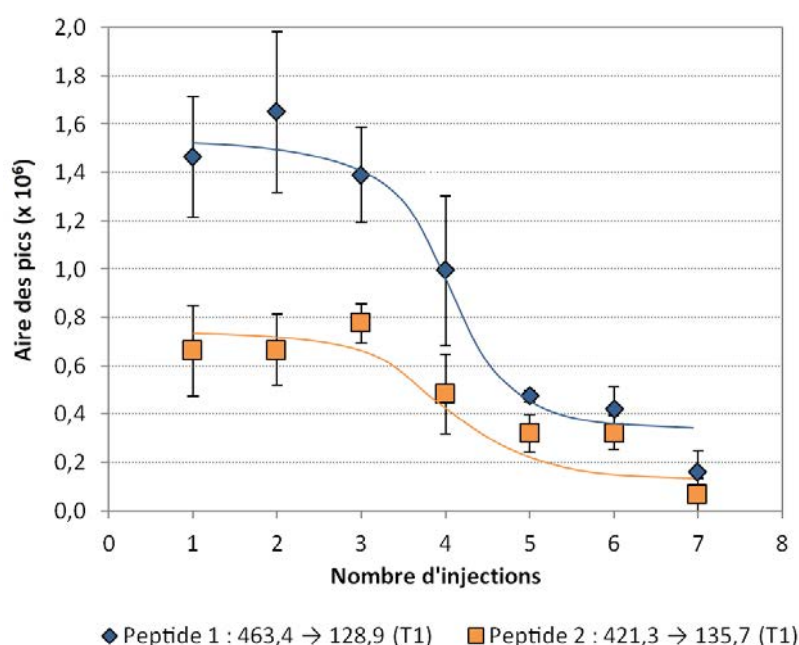


**Figure 101 :** Aires moyennes des pics relatifs aux transitions 1 de chacun des deux peptides caractéristiques après digestion de 5 µg/mL de cytochrome C (106 fmol, inj = 250 nL) en fonction du nombre d'injections réalisé sur les IMER n°2,3 et 4. Stop flow = 1 heure.

Il est clairement visible qu'au-delà de trois injections et digestions de cytochrome C en ligne (correspondant aux digestions présentées en Figure 100), les aires des pics commencent à diminuer.

Ces aires relatives aux peptides 1 et 2 passent en effet de moyennes égales à  $1,5 \times 10^6$  et  $7,0 \times 10^5$  lors des trois premières digestions à  $1,0 \times 10^5$  à la 4<sup>ème</sup> injection puis continue de décroître jusqu'à une aire de pic difficilement mesurable de l'ordre de  $2,0 \times 10^5$  et  $1,0 \times 10^5$  pour les peptides 1 et 2 après 7 injections en ligne rendant l'IMER totalement inutilisable. Ceci démontre la mauvaise stabilité du support. Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer cette diminution rapide des rendements de digestion. Tout d'abord une dénaturation irréversible de la pepsine pourrait être envisagée, cependant, l'ensemble des solutions utilisé au cours des diverses digestions en ligne (acide formique pH 2,0) et de la conservation de l'IMER lors de sa déconnexion (tampon phosphate 100 mM pH 5,5) n'est pas situé dans une gamme de pH pouvant provoquer une telle dénaturation. Une autre explication, plus plausible, serait l'hydrolyse progressive de certains greffons liés à la pepsine du fait d'une stabilité du support à base de silice insuffisante à un pH aussi faible.

Outre le suivi des différentes transitions des deux peptides caractéristiques en mode MRM, chaque analyse par nanoLC-MS a consisté à enregistrer également le courant ionique total en MS simple ce qui a permis d'observer la présence d'un très grand nombre de composés interférents retenus eux aussi sur la précolonne de piégeage après digestion en ligne. Un exemple de chromatogramme du courant ionique total est représenté en Figure 102.

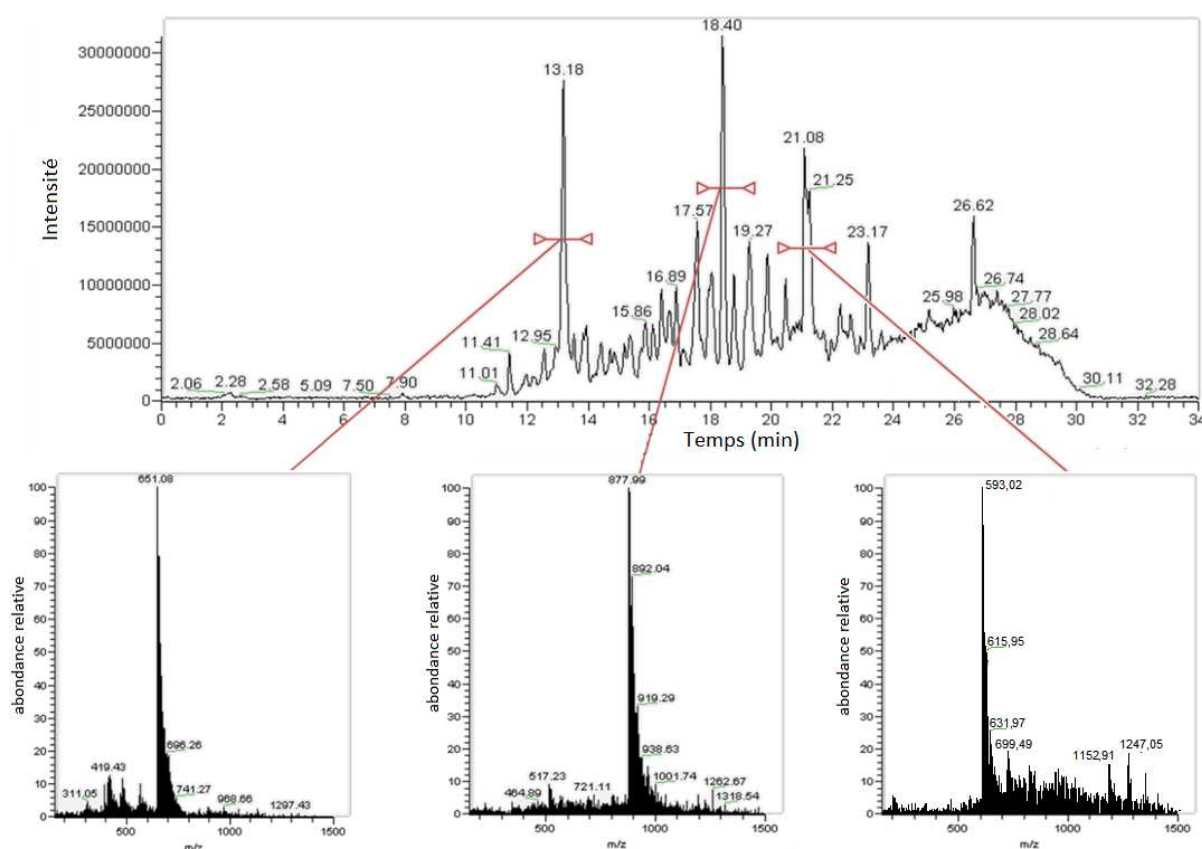


Figure 102 : Chromatogramme du courant ionique total obtenu après digestion en ligne d'une solution de cytochrome C dans l'acide formique pH 2,0 et spectres de masse moyens correspondant à trois pics chromatographiques ( $t_r = 13,2$  min ;  $t_r = 18,4$  min ;  $t_r = 21,1$  min).

Il est visible qu'un très grand nombre de pics, dont l'intensité est très élevée, sont présents sur ce chromatogramme. L'analyse des spectres de masse moyens correspondant à ces différents pics montrent la présence d'ions de rapports  $m/z$  étalés et à des intervalles répétés dans une gamme de  $m/z$  allant de 285 à environ 1200 uma. Des enveloppes spectrales très similaires ont été déjà rapportées dans la littérature. L'utilisation de polydiméthylsiloxane dans un système microfluidique a entraîné l'observation d'un tel spectre de masse à unités répétées s'étalant de 650 uma à 1200 uma lors de rinçage du support à l'acétonitrile, enveloppe attribuée par les auteurs à des monomères de siloxanes [407]. Des spectres de masse très similaires ont également été rapportés dans une étude centrée sur la caractérisation par spectrométrie de masse des intermédiaires réactionnels de condensation et d'hydrolyse de tétraéthoxysilane (TEOS) [408], l'un des précurseurs utilisé dans ce projet de thèse. De ce fait, il semble possible que la complexité du chromatogramme soit liée à des pertes de monomères de siloxanes de tailles et de masses variables. Se pose alors la question de la cause de ces pertes potentielles. Le relargage de monomères résultant d'une dissolution de la matrice de silice ne semble pas cohérente avec le pH d'utilisation, ici de l'ordre de 2,0 alors qu'une dissolution de la silice aurait plutôt lieu de façon graduelle au-delà de pH 8,0. Il est aussi possible, comme déjà observé, que seuls les greffons liés aux fonctions silane soient éliminés du support à pH 2,0 par hydrolyse de la liaison siloxane connectant le silane à la silice [409].

De façon à évaluer la stabilité du monolithe à pH acide, un monolithe synthétisé en bloc en flacon a été plongé dans une solution d'acide formique pH 2,0. Après plusieurs semaines, une partie du monolithe s'est avérée n'être plus qu'un « gel » visqueux composé de petites particules. Le surnageant de la solution a alors été filtré sur un « filtre à seringue » de 0,45  $\mu\text{m}$  puis analysé en l'injectant sur la précolonne de piégeage en poussant l'échantillon de la boucle d'injection à la précolonne par 4  $\mu\text{L}$  de solution d'acide formique (pH 2,0). Le spectre de masse moyen obtenu sur l'ensemble de la durée d'analyse a présenté un profil similaire à celui obtenu lors des digestions en ligne, *i.e.* une enveloppe d'ions de rapports  $m/z$  débutant par un ion intense et d'intensités décroissantes. Le rapport  $m/z$  observé pour l'ion le plus intense s'est révélé plus petit que ceux obtenus dans le cas des digestions en ligne ( $m/z$  de 288,0). Une hypothèse serait que l'hydrolyse des greffons aminopropyl serait plus avancée puisque le monolithe a été laissé dans la solution plusieurs semaines et non une ou plusieurs heures.

En définitive, les digestions en solution à pH 2,0 se sont avérées presque impossible à mettre en œuvre de façon répétée. Bien que seules des hypothèses aient pu être avancées pour l'instant sur le mécanisme conduisant à la perte d'efficacité de digestions sur les IMER après digestions à pH 2,0 il semble que cette valeur de pH en soit une des causes. De ce fait, une augmentation du pH de travail a été envisagée.

### 3.4.4 Digestions en ligne sur IMER de pepsine à pH 3,0

Au vu des résultats peu encourageants des digestions sur IMER à pH 2,0, des digestions à un pH égal à 3,0 ont été envisagées. Une modification du pH de la solution de digestion peut avoir un effet prononcé sur l'activité de la pepsine et sur l'apparition des peptides caractéristiques. Ainsi, de façon à envisager des digestions sur IMER à pH 3,0 et s'assurer d'une bonne comparaison avec l'efficacité des digestions en solution, des digestions en solution à pH 3,0 ont, dans un premier temps, été menées avec un rapport E/S variable et donc une quantité de pepsine fixée. Les quantités utilisées sont identiques à celles utilisées précédemment pour les digestions en solution à pH 2,0 avec une quantité d'enzyme fixée. Les aires de pics obtenues pour chacune des transitions suivies pour chacun des peptides spécifiques du CYC sont reportées en Figure 103 en fonction de la quantité de cytochrome C digérée et injectée.

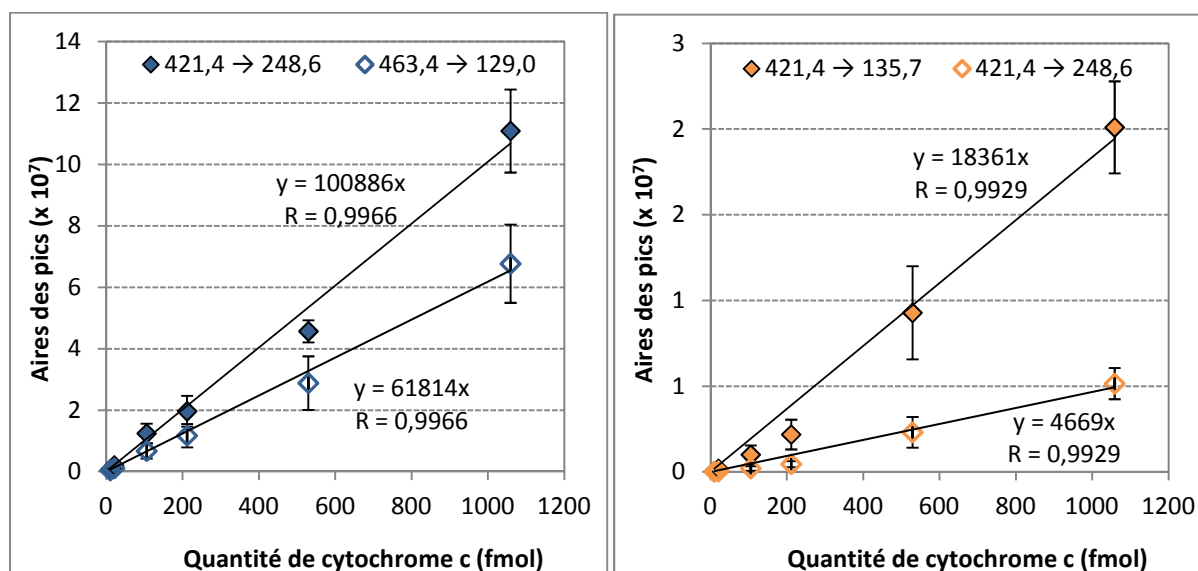


Figure 103 : Aires des pics correspondant aux deux transitions sélectionnées pour chacun des deux peptides spécifiques du cytochrome C de rapports  $m/z$  463,4 et 421,3 obtenus après digestion en solution à la pepsine à pH 3,0 de quantités croissantes de cytochrome C pendant 16 h avec une quantité de pepsine fixée à 0,6 µg (rapport E/S = 1/25 pour 5 µg de cytochrome C).

Il est visible, tout comme à pH 2,0, que la réponse des deux peptides est linéaire avec la concentration de cytochrome C digérée. Par ailleurs, l'apparition du peptide 1 semble ne pas être affectée par la valeur de pH. En effet, il est visible que des pentes de 100886 et de 61814 sont obtenues pour les deux transitions suivies pour ce peptide. Au vu de la variabilité observée sur chaque point de concentration, ces pentes ne semblent pas différentes des pentes obtenues avec une digestion à pH 2,0 et qui étaient respectivement de 83241 et 56902 (cf. Figure 99). Par contre, la digestion enzymatique du CYC à pH 3,0 conduit à une apparition plus faible du peptide 2. En effet les pentes observées en Figure 103 sont de l'ordre de 18361 et 4669 pour les deux transitions du peptide 2 à pH 3,0 alors qu'elles étaient de 42791 et 19065 à pH 2,0 (cf. Figure 99), soit 2 à 4 fois plus

élevées. Le pH de digestion a donc bien une influence sur l'apparition des peptides spécifiques. Ces courbes ont donc été utilisées pour les comparaisons ultérieures.

Nous avons ensuite tenté de réaliser des digestions sur IMER, cette fois à pH 3,0, le protocole restant identique à celui appliqué jusqu'à maintenant pour les digestions à pH 2,0. Seul le pH de la phase permettant de pousser l'échantillon vers l'IMER et vers la précolonne de piégeage a été modifié et a consisté dans ces essais en une solution d'acide formique à un pH de 3,0. L'IMER n°6, *i.e.* celui présentant le taux de greffage le moins élevé, a tout d'abord été utilisé. Au total, trois injections ont été réalisées sur deux jours.

Sur les trois injections, les aires des pics correspondant aux transitions sélectionnées pour les deux peptides caractéristiques se sont avérées être très faibles. Les peptides n'ont le plus souvent pas pu être quantifiés voire même détectés. La digestion s'est donc révélée être peu efficace. Afin de confirmer que ces observations ne sont pas le résultat du faible taux de greffage qui a été mesuré sur l'IMER n°6 en partie 3.4.1.3, une digestion a été réalisée dans les mêmes conditions sur le dernier IMER, l'IMER n°7, qui lui présente un taux de greffage élevé ( $\approx 62,6\%$ , *i.e.* supérieur aux IMER n°1 à 5 utilisés jusqu'à maintenant). Cependant, les aires obtenues se sont révélées être du même ordre de grandeur que celles obtenues pour l'IMER n°6. L'absence de digestion semble donc bien être le résultat de la valeur de pH utilisé. En effet, la différence de réactivité de la pepsine entre son action en solution et lorsqu'elle est immobilisée a déjà été observée par Tomono *et al* [410]. Ceux-ci ont montré que l'immobilisation de la pepsine sur un support de sépharose activée au glutaraldéhyde réduisait la gamme d'activité de cette enzyme. Ainsi, si des digestions sont possibles à un pH de 3,0 en solution, celles-ci ne le sont plus une fois l'enzyme immobilisée. Le degré de liberté manquant doit jouer sur la capacité de l'enzyme, ou du complexe enzyme-substrat à récupérer les ions  $H^+$  nécessaires à l'hydrolyse acide des liaisons peptidiques [410]. Or, dans une solution d'acide formique, à pH 3,0 les protons sont 10 fois moins concentrés qu'à pH 2,0 ce qui réduit l'activité de la pepsine greffée.

### 3.4.5 Conclusions

Un IMER à base de pepsine immobilisée sur un monolithe hybride à base de silice ne semble pas être indiqué pour une utilisation répétée. En effet, pour l'instant les conditions optimales permettant une utilisation répétée de cet IMER n'ont pas encore été déterminées. A pH 2,0, pH d'activité optimal de la pepsine, le microréacteur enzymatique perd rapidement en efficacité et si le pH est augmenté à une valeur 3,0, la pepsine greffée ne présente plus d'activité.

Pour réaliser un IMER fonctionnel deux voies sont possibles. L'utilisation d'un monolithe organique à base de dérivés d'acrylates, déjà largement étudié [411], peut être envisagée. Cette voie reste toutefois longue à mettre en œuvre puisqu'elle nécessite l'optimisation d'une nouvelle synthèse de monolithe. L'autre voie consiste à immobiliser une autre enzyme ayant un pH d'activité plus élevé, telle que la trypsine par exemple [269] dont le pH optimum est autour de 7,0-8,0.

## 4 Caractérisation d'un IMER de trypsine

Au vu des difficultés rencontrées dans les conditions de digestion acide de la pepsine, il a été envisagé, en dernière approche, d'immobiliser une autre enzyme protéolytique sur le monolithe organique-inorganique synthétisé en capillaire : la trypsine. La trypsine est, comme déjà mentionné, l'enzyme la plus couramment utilisée. Il s'agit d'une enzyme extrêmement spécifique hydrolysant la liaison peptidique côté C-terminal après les acides aminés lysine et arginine sauf si ces acides aminés sont suivis par une proline. La trypsine est active dans les milieux légèrement basiques (de l'ordre de pH 8,0) en présence de sels (tampons salins).

### 4.1 Mise au point de l'analyse par nanoLC-MS<sup>2</sup>

La digestion enzymatique à la trypsine n'étant pas conduite dans les mêmes conditions que la digestion par la pepsine, la méthode d'analyse par nanoLC-MS<sup>2</sup> a dû être ré-optimisée. Il est ainsi nécessaire d'identifier les peptides issus de la digestion du cytochrome C par la trypsine puis de choisir, après fragmentation, des transitions caractéristiques afin de quantifier ces peptides. Afin de pouvoir aboutir rapidement à une méthode utilisable pour analyser des digestats tryptiques, la nouvelle méthode d'analyse a été développée en se basant sur celle déjà utilisée pour les digestats de pepsine.

Pour cela, une digestion tryptique de 1 mg de cytochrome C a été réalisée dans 1 mL de tampon Tris 50 mM (pH 8,0) contenant 10 mM de CaCl<sub>2</sub> avec un rapport E/S de 1/25. La digestion a été menée pendant 16 h à 37°C. Le protocole de digestion est plus amplement détaillé en Annexe 8. Ce digestat a ensuite été dilué 20 fois dans l'eau pure. La solution ainsi obtenue a été injectée sur le montage déjà présenté en Figure 94 en page 228 et permettant de dessaler le digestat au moyen de la précolonne de piégeage. La percolation du digestat au travers de la précolonne capillaire et l'étape de lavage qui s'en suit ont été réalisées en poussant l'échantillon avec 4,0 µL d'eau. Après basculement de la seconde nano-vanne, le gradient utilisé pour l'analyse des digestats à la pepsine a été utilisé pour l'analyse de ce digestat tryptique. La détection a été effectuée en mode MS simple en enregistrant les masses comprises entre  $m/z = 150$  et  $m/z = 1500$ . Le chromatogramme résultant de cette analyse est présenté en Figure 104.

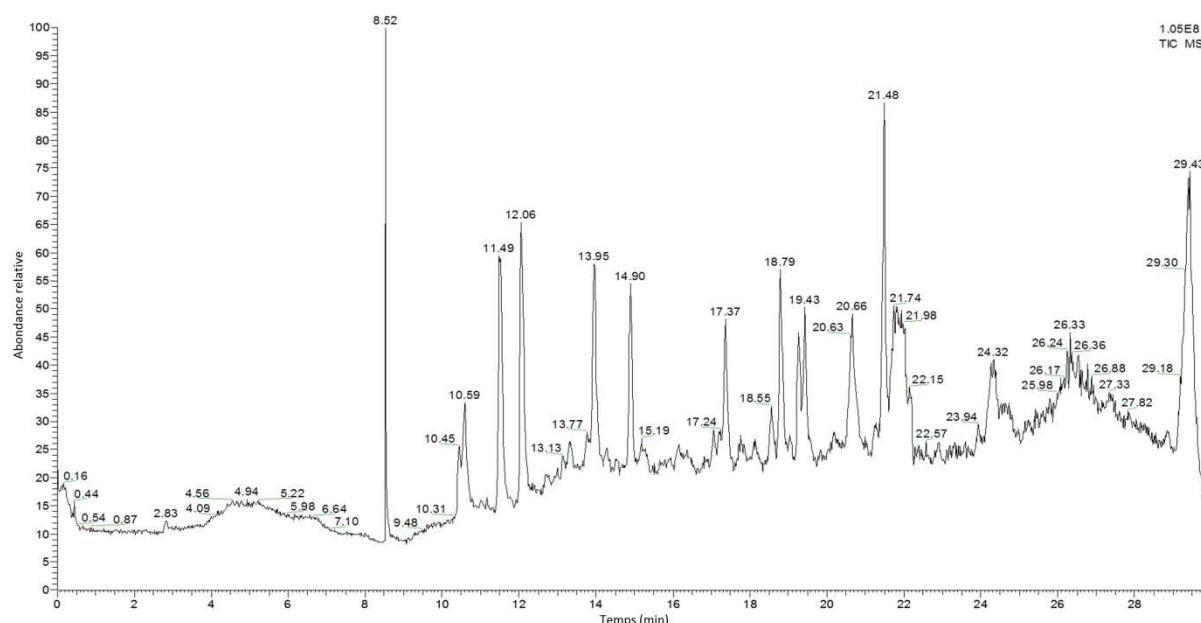


**Figure 104 :** Chromatogramme résultant de l'analyse par nanoLC-MS d'un digestat trypsique dilué 20 fois (courant ionique total). Digestion de 1 mg/mL de cytochrome C. Rapport E/S = 1/25. Inj = 250 nL ( $q^{te}$  injectée  $\approx 1,06$  pmol).

Les peptides correspondant aux pics obtenus sur le chromatogramme ont été identifiés grâce aux rapports  $m/z$  correspondants. Contrairement à la pepsine, de nombreux peptides ont été reconnus facilement par le logiciel MASCOT. En effet, l'analyse des données a permis la reconnaissance de 23 ions de rapports  $m/z$  différents correspondant à 11 peptides spécifiques du cytochrome C avec un recouvrement de séquence de 68 %. Le rapport MASCOT obtenu est présenté en Annexe 9.

**Tableau 17 :** Peptides identifiés après digestion en solution à la trypsine (E/S : 1/25) de 1 mg/mL de cytochrome C et dilution au vingtième (250 nL injectés soit 1,06 pmol en équivalent de cytochrome C). En vert : peptides identifiés par MASCOT. Les autres peptides ont été identifiés manuellement grâce à MS-Digest.

| $t_r$ (min) | $m/z$ observés        | Charges        | Masse (Da)<br>du peptide | Séquences peptidiques    | Positions    | MD | M |
|-------------|-----------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------|----|---|
| 10.5        | 589.3                 | 1+             | 588.3                    | MGDVEK + 1 Ox. + 1 Acet. | 1-6          | ✓  | - |
| <b>11.5</b> | <b>339.7 ; 678.3</b>  | <b>2+ ; 1+</b> | <b>677.4</b>             | <b>MGDVEK</b>            | <b>1-6</b>   | ✓  | ✓ |
| 12.1        | 317.7 ; 634.4         | 2+ ; 1+        | 633.4                    | IFVQK                    | 10-14        | ✓  | ✓ |
| 13.3        | 533.9 ; 800.1         | 3+ ; 2+        | 1597.8                   | KTGQAPGFTYTDANK          | 40-54        | ✓  | ✓ |
| 13.8        | 479.2 ; 718.0         | 3+ ; 2+        | 1433.9                   | HKTGPNLHGLFGR            | 27-39        | ✓  | ✓ |
| 14.0        | 302.7 ; 604.3         | 2+ ; 1+        | 603.4                    | GITWK                    | 57-61        | ✓  | ✓ |
| <b>14.9</b> | <b>736.3 ; 1470.6</b> | <b>2+ ; 1+</b> | <b>1469.7</b>            | <b>TGQAPGFTYTDANK</b>    | <b>41-54</b> | ✓  | ✓ |
| 15.2        | 275.2 ; 549.3         | 2+ ; 1+        | 548.3                    | MGDVEK + 1 Ox.           | 2-6          | ✓  | ✓ |
| 17.0        | 293.7 ; 586.4         | 4+ ; 2+        | 1168.3                   | TGPNLHGLFGR              | 29-39        | ✓  | ✓ |
| 17.4        | 390.3 ; 779.3         | 2+ ; 1+        | 778.4                    | MIFAGIK                  | 81-87        | ✓  | ✓ |
| 20.7        | 409.5 ; 545.5 ; 817.4 | 4+ ; 3+ ; 2+   | 1632.8                   | IFVQKCAQCHTVEK           | 10-23        | ✓  | ✓ |
| 21.5        | 749.2 ; 1495.8        | 2+ ; 1+        | 1494.7                   | EETLMEYLENPK             | 62-73        | ✓  | ✓ |

**Nombre de peptides totaux reconnus par MASCOT = 11**  
**Recouvrement de séquence correspondant = 68 %**

MD : logiciel MS-Digest, PC : logiciel PeptideCutter, M : MASCOT



Compte tenu du grand nombre de peptides reconnus et du recouvrement de séquence important, la digestion en solution du cytochrome C par la trypsine permet une digestion efficace du cytochrome C dans les conditions de digestion choisies. Parmi l'ensemble des peptides identifiés, deux peptides, parmi les plus intenses observés sur le chromatogramme de la Figure 104, ont été choisis comme peptides cibles. Ceux-ci ont des temps de rétention (après piégeage sur la précolonne de dessalage) de 11,5 min et 14,9 min. Ces ions ont des rapports  $m/z = 339,7$  (chargé 2+) et  $m/z = 736,3$  (chargé 2+) pour le peptide 1 et le peptide 2, respectivement. Ces deux ions ont été ensuite fragmentés en utilisant une énergie de collision de 20 V sans optimiser la valeur de cette énergie de façon à gagner en temps d'optimisation. Deux transitions répertoriées dans le Tableau 18 ont été sélectionnées pour leur intensité. La valeur de *skimmer offset* de 10 V a quant à elle été conservée.

**Tableau 18 :** Transitions choisies pour les deux peptides cibles ainsi que la séquence des fragments associés et les énergies de collision permettant d'avoir un signal optimal.

| Peptides                    | Ions parents (m/z) | Tube Lens offset (V) | Energie de collision (V) | Ions fils (m/z) | Séquence fragment | Séquence charge |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| Peptide 1<br>MGDVEK         | 339.7              | 111                  | 20                       | 248.7           | TK                | $y_2$           |
|                             |                    |                      | 20                       | 401.8           | PGTK              | $y_4$           |
| Peptide 2<br>TGQAPGFTYTDANK | 736.3              | 111                  | 20                       | 1113.7          | PGFTYTDANK        | $y_{10}$        |
|                             |                    |                      | 20                       | 286.6           | TGQ               | $b_3$           |

Les ions finalement choisis pour suivre le peptide 1 ( $t_r = 11,5$  min) après fragmentation de l'ion parent de rapport  $m/z$  339,7 sont les ions de rapports  $m/z$  248,7 et 401,8. De manière similaire, les ions fils choisis après fragmentation de l'ion parent de rapport  $m/z$  736,3 sont les ions de rapports  $m/z$  1113,7 et 286,6 pour le peptide 2 ( $t_r = 14,9$  min).

## 4.2 Analyse d'un digestat trypsique après digestion en solution

Comme pour la pepsine, une gamme de digestion de quantités croissantes de cytochrome C à quantité d'enzyme constante a été réalisée. En plus de donner une indication sur les limites de quantification des peptides considérés, cette gamme permet d'avoir une référence pour évaluer les performances des IMER. Pour cela, la digestion de concentrations de cytochrome C allant de 1  $\mu\text{g}$  à 25  $\mu\text{g/mL}$  dans 1 mL de tampon Tris 50 mM pH 8,0 contenant 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  a été réalisée pendant 16 h à 37°C. Les aires des pics correspondant à chacune des deux transitions de peptides ciblés en fonction de la quantité de cytochrome C digérée et injectée sont représentées sur la Figure 105.

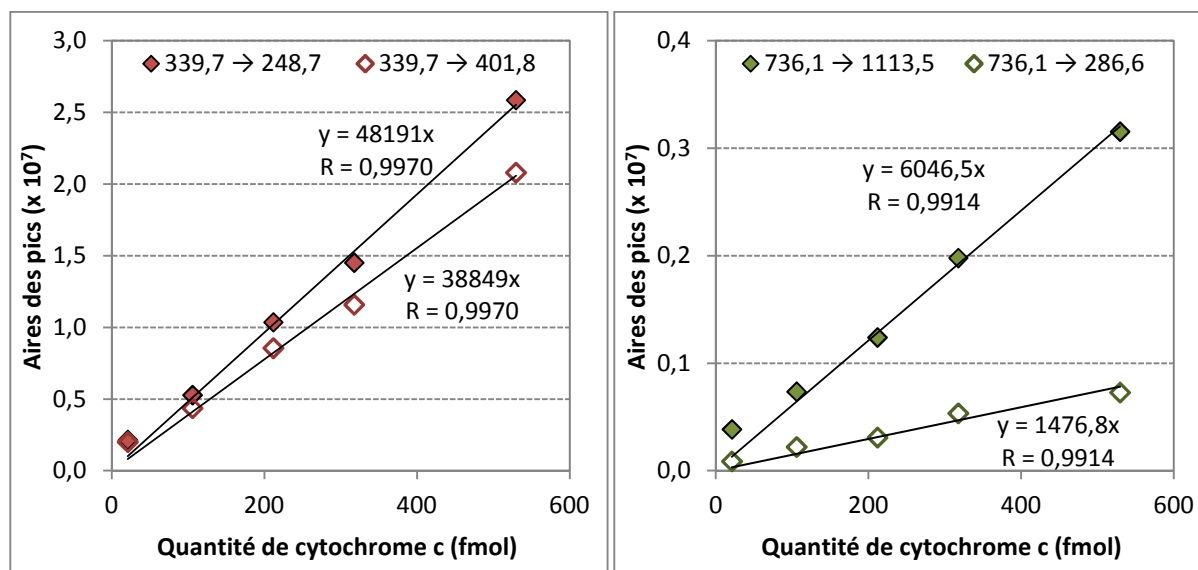


Figure 105 : Aires des pics correspondant aux deux transitions sélectionnées pour chacun des deux peptides spécifiques du cytochrome C de rapports  $m/z$  463,4 et 421,3 obtenus après digestion en solution à la trypsine à pH 8,0 de quantités croissantes de cytochrome C pendant 16 h avec une quantité de trypsine fixée à 0,4  $\mu\text{g}$  (rapport E/S = 1/25 pour 5  $\mu\text{g}$  de cytochrome C).

Comme le montre la Figure 105, les aires des pics des deux transitions spécifiques des deux peptides sont bien proportionnelles à la quantité de cytochrome C digérée, entre 21,2 et 529,7 fmol injectés. La limite basse de 21,2 fmol s'est révélée être la limite de quantification du système dans ces conditions. Cette limite est plus élevée que la LOQ précédemment observée avec la pepsine. Ceci est en partie le résultat de l'optimisation rapide qui a dû être menée, pour laquelle les énergies de collision de fragmentation n'ont pas été optimisées. Elle reste cependant largement suffisante pour permettre l'évaluation de l'IMER.

### 4.3 Caractérisation de l'IMER de trypsine

Un IMER de trypsine a été préparé par immobilisation de cette enzyme sur un monolithe en capillaire. Au vu du temps imparti, un monolithe synthétisé deux ans auparavant a été utilisé. Ce capillaire présentait au moment du greffage une perte de charge de 6,5 bars à 0,3  $\mu\text{L}/\text{min}$  dans l'eau pure soit une perméabilité de  $9,79 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ . Ce monolithe présentait après synthèse, soit deux ans plus tôt, une perméabilité de  $2,86 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ . Ceci laisse transparaître l'effet du vieillissement sur le monolithe et d'effondrements locaux de la structure du monolithe. Malgré, cette forte augmentation de la perméabilité et le vieillissement avancé du monolithe, l'immobilisation de la trypsine a tout de même été tentée en se basant sur le protocole rapporté par Ma *et al* [269]. Pour cela, tout comme décrit précédemment en Figure 97 en page 232, le support a d'abord été activé au glutaraldéhyde (10% w/w dans du tampon phosphate 100 mM pH 8,0) puis 60  $\mu\text{L}$  d'une solution de trypsine à 2 mg/mL (*i.e.* 120  $\mu\text{g}$  d'enzymes) dans du tampon phosphate 100 mM pH 8,0 contenant 50 mM de benzamidine et 5 mg/mL de  $\text{NaCNBH}_3$  a été percolée pendant 24 h au travers du monolithe en

capillaire (10 cm x 100 µm d.i.). Différentes phases de rinçage ont ensuite été appliquées et sont plus amplement décrites en Annexe 3. Le capillaire a finalement été conservé dans du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contenant 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  et 0,1 % de  $\text{NaN}_3$  à 4°C avant utilisation.

L'IMER de trypsine obtenu a ensuite été introduit dans un montage en tout point identique à celui présenté en Figure 98 en page 236 permettant le couplage de l'IMER avec une analyse par nanoLC-MS<sup>2</sup>. Du fait des limites de quantification plus élevées, l'injection d'une quantité plus importante de cytochrome C par rapport aux essais avec la pepsine a été envisagée. Des injections de 212 pmol de cytochrome C (250 nL de solution à 10 µg/mL) ont été réalisées. L'injection a été réalisée dans du tampon de digestion (Tampon Tris pH 8,0 (50 mM) et  $\text{CaCl}_2$  (10 mM)) et la phase de transfert a consisté en du tampon Tris pH 8,0 (50 mM). La durée du *stop flow* appliquée est de 1 heure. Dans ces conditions, trois injections ont été faites sur une journée. Les aires relatives des pics des transitions les plus intenses correspondant à chacun des deux peptides caractéristiques obtenues après digestion 1 heure sur l'IMER sont reportées en Figure 106 et comparées avec les aires de pics obtenues après digestion pendant 16 heures en solution.

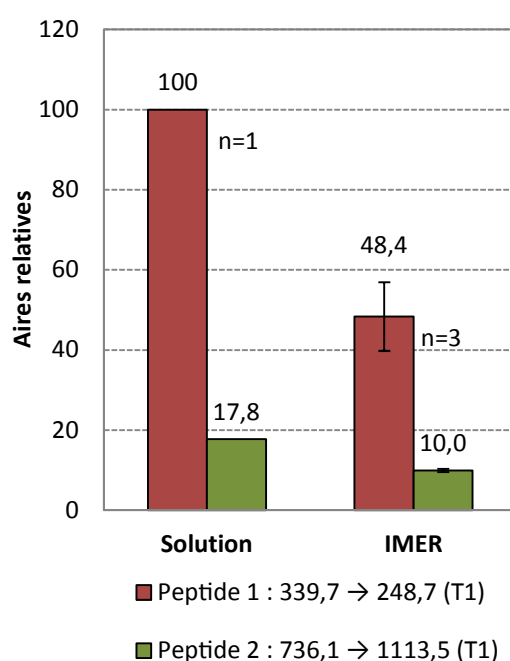


**Figure 106** : Aires relatives des transitions 1 de chacun des peptides caractéristiques du cytochrome C après digestion sur l'IMER de trypsine. Injection de 250 nL de CYC à 10 µg/mL dans tampon Tampon Tris pH 8,0 (50 mM) et  $\text{CaCl}_2$  (10 mM).

Il est visible en Figure 106 que les trois premières digestions effectuées sur l'IMER de trypsine présentent des aires de pics importantes en comparaison de la digestion en solution. En effet, une aire relative moyenne de  $48,4 \pm 8,6$  ( $n = 3$ , C.V = 17,8%) a été obtenue sur l'IMER de trypsine après seulement une heure de digestion pour la transition 1 du peptide 1. Une aire relative de  $10,0 \pm 0,4$  ( $n = 3$ , C.V = 4,0%) a été en outre observée pour la transition 1 du peptide 2 alors que cette même digestion renvoie une aire relative de 17,8 en solution. La digestion sur l'IMER pendant 1 heure permet donc d'obtenir une efficacité de digestion de l'ordre de 48,4 à 56,2% de la digestion en

solution. D'autre part, les C.V. s'avèrent très bons lorsque l'on considère le fait que l'erreur est le fait de deux contributions : la variabilité inhérente à la digestion enzymatique ainsi que l'erreur due à la détection par spectrométrie de masse (de l'ordre de 10-15%). D'autre part, les chromatogrammes du courant ionique total enregistré en parallèle des transitions suivies en mode MRM n'ont pas semblé présenter de pics très intenses comme évoqué dans le cas des digestions à la pepsine à pH très faible. En effet, les spectres de masse observés lors de ces analyses ne présentent pas de pics similaires à ceux décrits en partie 3.4.3.3 et pouvant potentiellement être caractéristiques de monomères de siloxane.

L'ensemble de ces résultats semblent donc très encourageants. Si les conditions de digestion à la pepsine se sont révélées difficile à utiliser avec le monolithe organique-inorganique développé au cours de ce projet de thèse, la trypsine pourrait, elle, tout à fait être utilisée. Il reste à confirmer le taux de greffage d'une telle enzyme, la stabilité du support et le nombre de digestions réalisables avec cet IMER. Les conditions de pH proche d'un pH neutre laissent tout de même espérer de pouvoir réaliser un grand nombre d'injections sur l'IMER comme ce fût le cas notamment avec les anticorps utilisés dans un milieu tamponné neutre. Il reste principalement à déterminer les conditions de couplage d'un tel outil bioanalytique avec un mIS, voire un mOS, spécifique du cytochrome C.

## 5 Conclusions et perspectives

L'analyse totale de protéines dans des matrices complexes implique une étape d'extraction sélective suivie d'une étape de digestion enzymatique permettant de cliver la protéines en peptides caractéristiques de taille moins importante et permettant d'envisager une analyse par LC-MS<sup>2</sup> au moyen de spectromètres de masse peu résolutifs. Le couplage de tels outils au format miniaturisé avec la nanoLC-MS<sup>2</sup> a été envisagé. Si le greffage d'anticorps ou d'aptamères a été déjà décrit dans les chapitres précédents, le greffage d'enzymes a du lui être considéré sur le monolithe hybride organique-inorganique en capillaire.

Le couplage d'un mIS spécifique du cytochrome C impliquant l'élution de cette protéine modèle vers l'IMER au moyen d'une solution acide ayant été envisagé en première approche, l'immobilisation de pepsine a tout d'abord été explorée. Les IMER obtenus par greffage de cette enzyme se sont avérés présenter un taux de greffage très satisfaisants de l'ordre de  $2,46 \pm 0,29$  nmol d'enzymes par  $\mu\text{L}$  de capillaire avec le protocole de greffage le plus répétable. Cependant, des rendements de digestion de l'ordre de 10 fois inférieurs, après 1 heure de *stop flow*, aux rendements observés en solution après 16 heures dans les mêmes conditions de digestions, *i.e.* dans une solution d'acide formique à pH 2,0, ont pu être obtenus. Ces conditions de digestion ont de plus entraîné une diminution rapide de l'efficacité des IMER au fur et à mesure des digestions en ligne effectuées. Des

digestions à un pH plus élevé de 3,0 n'ont pas non plus conduit à une meilleure efficacité de digestion en ligne. De ce fait, l'immobilisation de trypsine a également été étudiée. Les premiers essais menés montrent des taux de digestion après 1 heure de *stop flow* de l'ordre de 50 % comparés à ceux obtenus en solution au bout de 16 heures, ce qui constitue des résultats très encourageants.

Il reste maintenant à considérer le couplage d'un outil sélectif avec ce type d'IMER. Au vu des conditions de digestions de l'IMER de trypsine, dans un tampon salin à pH 7-8, le couplage avec l'IMER d'un mOS spécifique du cytochrome C pourrait peut-être se révéler plus facile à réaliser qu'avec un mIS du fait de conditions de liaison puis d'élution pouvant être compatibles avec les conditions de digestion en ligne. Zhao *et al* [238] ont ainsi immobilisé un aptamère anti-cytochrome C en capillaire et ont démontré qu'un tel support utilisé avec une phase mobile constituée d'un tampon de liaison (50 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 120 mM NaCl) à pH 7,4 permettait de séparer la transferrine du cytochrome C, ce dernier présentant une affinité pour l'aptamère contrairement à la transferrine. Toutefois, du fait de la constante de dissociation élevée entre l'aptamère et sa cible ( $K_D \approx 4,6 \mu\text{M}$  [238]), le volume de fin de fixation du cytochrome C dans ce tampon de liaison reste faible. Il reste donc à déterminer si la rétention du cytochrome C sur le mOS peut être suffisante pour permettre une étape de lavage permettant l'élimination des protéines interférentes liées non spécifiquement au monolithe avec percolation d'une grande quantité de tampon sans provoquer une élution prématurée de la protéine cible du support.

## Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ce projet de recherche était la miniaturisation d'outils analytiques basés sur le greffage de biomolécules en vue de leur couplage à la nanochromatographie liquide pour l'analyse d'échantillons complexes.

Dans un premier temps, la synthèse d'un monolithe hybride organique-inorganique, présentant des fonctions amines propices au greffage des biomolécules a été optimisée en capillaire de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre interne de manière à obtenir une synthèse répétable. Cette étude a ainsi permis de mettre en évidence l'effet de divers paramètres tels que la température et la quantité de porogène sur la perméabilité et la macroporosité du matériau.

Dans un second temps, l'immobilisation de deux types de biomolécules sur le support en capillaire développé a pu être envisagée pour développer des outils d'extraction sélectifs miniaturisés. Ainsi, des anticorps et des aptamères dirigés contre des molécules de faible poids moléculaire ont tout d'abord été immobilisés. Des immunoadsorbants miniaturisés (mIS) et oligoadsorbants miniaturisés (mOS) ont donc été préparés par greffage covalent d'anticorps et d'aptamères spécifiques de toxines modèles puis couplés en ligne avec la nanoLC. La répétabilité des rendements d'extraction a permis de mettre en évidence la répétabilité des protocoles d'extraction développés sur chacun des supports miniaturisés. Leur sélectivité a été démontrée par les hauts rendements d'extraction des analytes cibles obtenus sur les mIS et mOS et les faibles rendements mesurés sur des monolithes en capillaire contrôles greffés avec des biomolécules dirigés contre d'autres analytes et n'ayant aucune affinité pour les molécules cibles. Pour chacun des supports préparés, une caractérisation complète a été réalisée en termes de taux de greffage des biomolécules et de capacités des supports, permettant d'estimer le nombre de biomolécules restant actives une fois immobilisées ainsi que la répétabilité des protocoles d'immobilisation. Les capacités et taux de greffage mesurés sur monolithe se sont révélés être bien plus élevés dans le cas des aptamères que dans le cas des anticorps du fait de l'encombrement stérique bien plus important de ces derniers. Ces outils ont enfin été appliqués à l'analyse des molécules ciblées dans des matrices complexes environnementales (extraits d'algues, eaux de rivière et de lac) et alimentaires (bière).

Dans un troisième temps, l'application de tels outils miniaturisés pour l'analyse de protéines a été envisagée. Cet objectif a impliqué le développement de microréacteurs enzymatiques en capillaire (IMER) basés sur l'immobilisation d'enzymes protéolytiques permettant la digestion en peptides des protéines avant leur analyse par nanoLC-MS<sup>2</sup>. Deux enzymes ont été étudiées : la pepsine dont l'activité est maximale à faible pH et la trypsine active dans des tampons neutres. Un protocole permettant d'atteindre des taux de greffage de pepsine élevés et répétables a été mis en place. Cependant, des conditions de digestion acides se sont avérées remettre en cause la stabilité du greffage de cette enzyme ainsi que du support rendant la réutilisation de ces IMER difficile à

envisager. Des IMER à base de trypsine pourraient alors se révéler plus facile d'utilisation à un pH de 7-8. Les premiers résultats semblent d'ailleurs très encourageants mais les taux de greffage de cette dernière enzyme ainsi que la durée d'utilisation d'un tel support restent encore à évaluer. Ces résultats prometteurs pourraient ainsi permettre de considérer ensuite le couplage de mIS ou de mOS dirigés contre des protéines avec les IMER développés et la nanoLC-MS<sup>2</sup> pour pouvoir ensuite les appliquer à des matrices complexes.

Le grand potentiel des monolithes hybride organique-inorganique en capillaire étudiés au cours de ce projet de recherche nous encourage à poursuivre leur développement. Ce travail exploratoire a permis notamment d'entrevoir des différences de taux de greffage en fonction des biomolécules considérées. Si la preuve de principe du greffage et la caractérisation des supports développés a été réalisée, il semble maintenant tout à fait possible de faire varier les différents paramètres des protocoles de greffage de manière à déterminer les conditions optimales d'immobilisation ainsi que réaliser des comparaisons rigoureuses des taux de greffage et capacités en fonction des biomolécules considérées. Les capacités de greffage élevées, notamment dans le cas des aptamères, pourraient également permettre de diminuer les longueurs de capillaires utilisées ainsi que d'améliorer la qualité du couplage avec la nanoLC et de poursuivre la miniaturisation des supports. A termes, l'intégration de tels outils sélectifs dans des microcanaux de puces pourrait également être envisagée ce qui nécessiterait la transposition de la synthèse du monolithe hybride dans des canaux de puce de chimie de surface adaptée.

## Références bibliographiques

- [1] Lucci P., Pacetti D., Frega N.G., Núñez O., Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis, 2012.
- [2] Valérie P., Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques, *Techniques de l'ingénieur Chromatographie et techniques séparatives*, **2006**, base documentaire : TIB385DUO.
- [3] Fanfan P., Mabon N., Thonart P., Lognay G., Copin A., Barthélemy J., Investigations on Cationic Exchange Capacity and Unused Bed Zone according to operational conditions in a Fixed Bed Reactor for water lead removal by a natural zeolite, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2006**, 10 (2), p. 93.
- [4] Poole C.F., New trends in solid-phase extraction, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2003**, 22, p. 362.
- [5] Kole P.L., Venkatesh G., Kotecha J., Sheshala R., Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods, *Biomed. Chromatogr.*, **2011**, 25, p. 199.
- [6] León-González M.E., Pérez-Arribas L.V., Chemically modified polymeric sorbents for sample preconcentration, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 902, p. 3.
- [7] Rogeberg M., Malerod H., Roberg-Larsen H., Aass C., Wilson S.R., On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems, *J Pharm Biomed Anal*, **2014**, 87, p. 120.
- [8] Souverain S., Rudaz S., Veuthey J.L., Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis, *J. Chromatogr. B*, **2004**, 801, p. 141.
- [9] Wu J.-T., Zeng H., Qian M., Brogdon B.L., Unger S.E., Direct Plasma Sample Injection in Multiple-Component LC-MS-MS Assays for High-Throughput Pharmacokinetic Screening, *Anal. Chem.*, **1999**, 72, p. 61.
- [10] Boyd B., Björk H., Billing J., Shimelis O., Axelsson S., Leonora M., Yilmaz E., Development of an improved method for trace analysis of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1174, p. 63.
- [11] Pichon V., Chapuis-Hugon F., Hennion M.C., *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Academic Press, **2012**, p. 359.
- [12] Fernández R.R., Desarrollo de un polímero de impronta molecular para la determinación de metilmercurio en productos pesqueros *Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatología*, **2012**, *Master en Química Avanzada*, Universidade de Santiago de Compostela / Universidade de Vigo
- [13] He C., Long Y., Pan J., Li K., Liu F., Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples, *J Biochem Biophys Methods*, **2007**, 70, p. 133.
- [14] Pichon V., Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers, *Journal of chromatography. A*, **2007**, 1152, p. 41.
- [15] Tamayo F.G., Turiel E., Martín-Esteban A., Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: recent developments and future trends, *Journal of chromatography. A*, **2007**, 1152, p. 32.
- [16] Pichon V., Haupt K., Affinity Separations on Molecularly Imprinted Polymers with Special Emphasis on Solid-Phase Extraction, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **2006**, 29, p. 989.
- [17] Caro E., Marce R., Borrull F., Cormack P., Sherrington D., Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2006**, 25, p. 143.
- [18] Qiao F., Sun H., Yan H., Row K.H., Molecularly Imprinted Polymers for Solid Phase Extraction, *Chromatographia*, **2006**, 64, p. 625.



- [19] Beltran A., Borrull F., Marcé R.M., Cormack P.A.G., Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2010**, 29, p. 1363.
- [20] Tse Sum Bui B., Haupt K., Molecularly imprinted polymers: synthetic receptors in bioanalysis, *Anal Bioanal Chem*, **2010**, 398, p. 2481.
- [21] Pichon V., Chapuis-Hugon F., Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants--a review, *Anal Chim Acta*, **2008**, 622, p. 48.
- [22] Brüggemann O., Haupt K., Ye L., Yilmaz E., Mosbach K., New configurations and applications of molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 889, p. 15.
- [23] Mayes A.G., Mosbach K., Molecularly Imprinted Polymer Beads: Suspension Polymerization Using a Liquid Perfluorocarbon as the Dispersing Phase, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, p. 3769.
- [24] Turiel E., Tadeo J.L., Cormack P.A., Martin-Esteban A., HPLC imprinted-stationary phase prepared by precipitation polymerisation for the determination of thiabendazole in fruit, *Analyst*, **2005**, 130, p. 1601.
- [25] Carabias-Martinez R., Rodriguez-Gonzalo E., Herrero-Hernandez E., Diaz-Garcia M.E., Development and characterisation of a molecularly imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation for the determination of phenylurea herbicides, *J Sep Sci*, **2005**, 28, p. 453.
- [26] Hosoya K., Yoshizako K., Shirasu Y., Kimata K., Araki T., Tanaka N., Haginaka J., Molecularly imprinted uniform-size polymer-based stationary phase for high-performance liquid chromatography structural contribution of cross-linked polymer network on specific molecular recognition, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 728, p. 139.
- [27] Hosoya K., Yoshizako K., Tanaka N., Kimata K., Araki T., Haginaka J., Uniform-size Macroporous Polymer-based Stationary Phase for HPLC Prepared through Molecular Imprinting Technique, *Chem. Lett.*, **1994**, 23, p. 1437.
- [28] Hosoya K., Yoshizako K., Sasaki H., Kimata K., Tanaka N., Molecular recognition towards coplanar polychlorinated biphenyls based on the porogen imprinting effects of xylenes, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 828, p. 91.
- [29] Ali W.H., Derrien D., Alix F., Perollier C., Lepine O., Bayoudh S., Chapuis-Hugon F., Pichon V., Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals, *Journal of chromatography. A*, **2010**, 1217, p. 6668.
- [30] Janeway C.J., Travers P., Walport M., Shlomchik M., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. , Garland Science, New York, 2001.
- [31] <http://www.virology.ws/2009/07/22/adaptive-immune-defenses-antibodies/>
- [32] Wang X.-c., Bao M., Wu J.-j., Luo Y., Ma L.-y., Wang Y., Zhang A.-h., He C.-h., Zhang H.-b., Characterization and Comparison of Ochratoxin A-Ovalbumin (OTA-OVA) Conjugation by Three Methods, *Journal of Integrative Agriculture*, **2014**, 13, p. 1130.
- [33] Mhadhbi H., Ben-Rejeb S., Cléroux C., Martel A., Delahaut P., Generation and characterization of polyclonal antibodies against microcystins—Application to immunoassays and immunoaffinity sample preparation prior to analysis by liquid chromatography and UV detection, *Talanta*, **2006**, 70, p. 225.
- [34] Rajesh K., Rana K.V., Suri C.R., Characterization of Hapten–Protein Conjugates: Antibody Generation and Immunoassay Development for Pesticides Monitoring, *BioNanoSci.*, **2013**, 3, p. 137.
- [35] Li L., Wang J., Zhou S., Zhao M., Development and characterization of an immunoaffinity monolith for selective on-line extraction of bisphenol A from environmental water samples, *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 620, p. 1.
- [36] Bouzige M., Legeay P., Pichon V., Hennion M.C., Selective on-line immunoextraction coupled to liquid chromatography for the trace determination of benzidine, congeners and related azo dyes in surface water and industrial effluents, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 846, p. 317.
- [37] Liang Y., Zhou S., Hu L., Li L., Zhao M., Liu H., Class-specific immunoaffinity monolith for efficient on-line clean-up of pyrethroids followed by high-performance liquid chromatography analysis, *J. Chromatogr. B*, **2010**, 878, p. 278.

- [38] Moser A.C., Hage D.S., Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments, *Bioanalysis*, **2010**, 2, p. 769.
- [39] Kohler G., Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, **1975**, 256, p. 495.
- [40] Hennion M.-C., Pichon V., Immuno-based sample preparation for trace analysis, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, p. 29.
- [41] Delaunay N., Pichon V., Hennion M.-C., Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **2000**, 745, p. 15.
- [42] Ouyang S., Xu Y., Chen Y.H., Selective Determination of a Group of Organic Compounds in Complex Sample Matrixes by LC/MIMS with On-Line Immunoaffinity Extraction, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, p. 931.
- [43] Bouzige M., Pichon V., Hennion M.C., On-line coupling of immunosorbent and liquid chromatographic analysis for the selective extraction and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples at the ng l<sup>-1</sup> level, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 823, p. 197.
- [44] Rivasseau C., Hennion M.-C., Potential of immunoextraction coupled to analytical and bioanalytical methods (liquid chromatography, ELISA kit and phosphatase inhibition test) for an improved environmental monitoring of cyanobacterial toxins, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 399, p. 75.
- [45] Schiel J.E., Mallik R., Soman S., Joseph K.S., Hage D.S., Applications of silica supports in affinity chromatography, *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, p. 719.
- [46] Lawrence J.F., Menard C., Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 922, p. 111.
- [47] Hage M.J.Y.a.D.S., *Monolithic chromatography and its modern applications*, P.G. Wang, ILM Publications, **2010**, p. 3.
- [48] Mallik R., Hage D.S., Affinity monolith chromatography, *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, p. 1686.
- [49] Pfaunmiller E., Paulemond M., Dupper C., Hage D., Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications, *Anal Bioanal Chem*, **2013**, 405, p. 2133.
- [50] Tetala K.K.R., van Beek T.A., Bioaffinity chromatography on monolithic supports, *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33, p. 422.
- [51] Brne P., Lim Y.P., Podgornik A., Barut M., Pihlar B., Štrancar A., Development and characterization of methacrylate-based hydrazide monoliths for oriented immobilization of antibodies, *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, p. 2658.
- [52] Rucevic M., Clifton J.G., Huang F., Li X., Callanan H., Hixson D.C., Josic D., Use of short monolithic columns for isolation of low abundance membrane proteins, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1123, p. 199.
- [53] Delmotte N., Kobold U., Meier T., Gallusser A., Strancar A., Huber C.G., Miniaturized monolithic disks for immunoabsorption of cardiac biomarkers from serum, *Anal Bioanal Chem*, **2007**, 389, p. 1065.
- [54] Calleri E., Marrubini G., Brusotti G., Massolini G., Caccialanza G., Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B1 in aqueous solutions, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 44, p. 396.
- [55] Jiang T., Mallik R., Hage D.S., Affinity Monoliths for Ultrafast Immunoextraction, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, p. 2362.
- [56] Faye C., Chamieh J., Moreau T., Granier F., Faure K., Dugas V., Demesmay C., Vandenabeele-Trambouze O., In situ characterization of antibody grafting on porous monolithic supports, *Anal. Biochem.*, **2012**, 420, p. 147.
- [57] Corey O., David S.H., Raychelle B., Min B., Chunling W., Elizabeth K., *Handbook of Affinity Chromatography, Second Edition* CRC Press, **2005** (Chromatographic Science Series), p. 101.

- [58] Kandimalla V.B., Tripathi V.S., Ju H., Immobilization of Biomolecules in Sol–Gels: Biological and Analytical Applications, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2006**, 36, p. 73.
- [59] Tsagkogeorgas F., Ochsenkühn-Petropoulou M., Niessner R., Knopp D., Encapsulation of biomolecules for bioanalytical purposes: Preparation of diclofenac antibody-doped nanometer-sized silica particles by reverse micelle and sol–gel processing, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 573–574, p. 133.
- [60] Vera-Avila L.E., Márquez-Lira B.P., Villanueva M., Covarrubias R., Zelada G., Thibert V., Determination of carbofuran in surface water and biological tissue by sol–gel immunoaffinity extraction and on-line preconcentration/HPLC/UV analysis, *Talanta*, **2012**, 88, p. 553.
- [61] Cichna-Markl M., Selective sample preparation with bioaffinity columns prepared by the sol–gel method, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1124, p. 167.
- [62] Van Emon J.M., Chuang J.C., Development and application of immunoaffinity chromatography for coplanar PCBs in soil and sediment, *Chemosphere*, **2013**, 90, p. 1.
- [63] Reiter E.V., Cichna-Markl M., Tansakul N., Shim W.-B., Chung D.-H., Zentek J., Razzazi-Fazeli E., Sol–gel immunoaffinity chromatography for the clean up of ochratoxin A contaminated grains, *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, p. 7627.
- [64] Zhao X., Yuan Y., Zhang X., Yue T., Identification of ochratoxin A in Chinese spices using HPLC fluorescent detectors with immunoaffinity column cleanup, *Food Control*, **2014**, 46, p. 332.
- [65] Zhao M., Liu Y., Li Y., Zhang X., Chang W., Development and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of bisphenol A from serum samples, *J. Chromatogr. B*, **2003**, 783, p. 401.
- [66] Degelmann P., Egger S., Jürling H., Müller J., Niessner R., Knopp D., Determination of Sulfonylurea Herbicides in Water and Food Samples Using Sol–Gel Glass-Based Immunoaffinity Extraction and Liquid Chromatography–Ultraviolet/Diode Array Detection or Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *J. Agric. Food. Chem.*, **2006**, 54, p. 2003.
- [67] Schoenzetter E., Pichon V., Thiebaut D., Fernandez-Alba A., Hennion M.-C., Rapid sample handling in microcolumn-liquid chromatography using selective on-line immunoaffinity extraction, *J. Microcolumn Sep.*, **2000**, 12, p. 316.
- [68] Dallüge J., Hankemeier T., Vreuls R.J.J., Brinkman U.A.T., On-line coupling of immunoaffinity-based solid-phase extraction and gas chromatography for the determination of s-triazines in aqueous samples, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 830, p. 377.
- [69] Chamieh J., Faye C., Dugas V., Moreau T., Vandenabeele-Trambouze O., Demesmay C., Preparation and full characterization of a micro-immunoaffinity monolithic column and its in-line coupling with capillary zone electrophoresis with Ochratoxin A as model solute, *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1232, p. 93.
- [70] Delaunay-Bertoncini N., Pichon V., Hennion M.C., Comparison of immunoextraction sorbents prepared from monoclonal and polyclonal anti-isoproturon antibodies and optimization of the appropriate monoclonal antibody-based sorbent for environmental and biological applications, *Chromatographia*, **2001**, 53, p. S224.
- [71] Solfrizzo M., Panzarini G., Visconti A., Determination of Ochratoxin A in Grapes, Dried Vine Fruits, and Winery Byproducts by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection (HPLC–FLD) and Immunoaffinity Cleanup, *J. Agric. Food. Chem.*, **2008**, 56, p. 11081.
- [72] Visconti A., Pascale M., Centonze G., Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 888, p. 321.
- [73] Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A., Analytical methods for determination of mycotoxins: A review, *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 632, p. 168.
- [74] Sharma M., Márquez C., Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **2001**, 93, p. 109.
- [75] Visconti A., Pascale M., Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 815, p. 133.

- [76] Mateo J.J., Mateo R., Hinojo M.J., Llorens A., Jiménez M., Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 955, p. 245.
- [77] Solfrizzo M., Avataggiato G., Visconti A., Use of various clean-up procedures for the analysis of ochratoxin A in cereals, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 815, p. 67.
- [78] Scudamore K.A., MacDonald S.J., A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up, *Food Addit. Contam.*, **1998**, 15, p. 401.
- [79] Algül I., Kara D., Determination and chemometric evaluation of total aflatoxin, aflatoxin B1, ochratoxin A and heavy metals content in corn flours from Turkey, *Food Chem.*, **2014**, 157, p. 70.
- [80] Chan D., MacDonald S.J., Boughtflower V., Brereton P., Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography–fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1059, p. 13.
- [81] Garcia-Villanova R.J., Cordón C., González Paramás A.M., Aparicio P., Garcia Rosales M.E., Simultaneous Immunoaffinity Column Cleanup and HPLC Analysis of Aflatoxins and Ochratoxin A in Spanish Bee Pollen, *J. Agric. Food. Chem.*, **2004**, 52, p. 7235.
- [82] Hernández Hierro J.M., Garcia-Villanova R.J., Rodríguez Torrero P., Toruño Fonseca I.M., Aflatoxins and Ochratoxin A in Red Paprika for Retail Sale in Spain: Occurrence and Evaluation of a Simultaneous Analytical Method, *J. Agric. Food. Chem.*, **2008**, 56, p. 751.
- [83] Turcotte A.-M., Scott P., Tague B., Analysis of cocoa products for ochratoxin A and aflatoxins, *Mycotoxin Res*, **2013**, 29, p. 193.
- [84] Villa P., Markaki P., Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from athens market: Occurrence and risk assessment, *Food Control*, **2009**, 20, p. 455.
- [85] Issaq H.J., Xiao Z., Veenstra T.D., Serum and Plasma Proteomics, *Chem. Rev.*, **2007**, 107, p. 3601.
- [86] Cingoz A., Hugon-Chapuis F., Pichon V., Total on-line analysis of a target protein from plasma by immunoextraction, digestion and liquid chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2010**, 878, p. 213.
- [87] Cingoz A., Thèse : Analyse d'une protéine cible par immunoaffinité et digestion sur micro-réacteur enzymatique couplés en ligne à une analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse : synthèse, caractérisation et miniaturisation des outils bioanalytiques., *LSABM (ex-LECA)*, **2009**, Doctorat, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)
- [88] Tubbs K.A., Kiernan U.A., Niederkofer E.E., Nedelkov D., Bieber A.L., Nelson R.W., Development of Recombinant-Based Mass Spectrometric Immunoassay with Application to Resistin Expression Profiling, *Anal. Chem.*, **2006**, 78, p. 3271.
- [89] Radom F., Jurek P.M., Mazurek M.P., Otlewski J., Jelen F., Aptamers: molecules of great potential, *Biotechnol Adv*, **2013**, 31, p. 1260.
- [90] Kyung-Mi Song S.L.a.C.B., Aptamers and Their Biological Applications, *Sensors*, **2012**, 12(1), p. 612.
- [91] Song S., Wang L., Li J., Fan C., Zhao J., Aptamer-based biosensors, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2008**, 27, p. 108.
- [92] Sonia Amaya-González N.d.-I.-S.-Á., Arturo J. Miranda-Ordieres and María Jesús Lobo-Castañón, Aptamer-Based Analysis: A Promising Alternative for Food Safety Control, *Sensors*, **2013**, 13(12), p. 16292.
- [93] Zhou J., Battig M., Wang Y., Aptamer-based molecular recognition for biosensor development, *Anal Bioanal Chem*, **2010**, 398, p. 2471.
- [94] Lodish H B.A., Zipursky SL, et al. , *Molecular Cell Biology. 4th edition.*, W.H. Freeman, **2000**.
- [95] Chauveau F., Pestourie C., Tavitian B., [Aptamers: selection and scope of applications], *Pathologie-biologie*, **2006**, 54, p. 251.
- [96] Fan P., Suri A.K., Fiala R., Live D., Patel D.J., Molecular Recognition in the FMN – RNA Aptamer Complex, *J. Mol. Biol.*, **1996**, 258, p. 480.

- [97] Lorsch J.R., Szostak J.W., In vitro selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin, *Biochemistry*, **1994**, 33, p. 973.
- [98] Macaya R.F., Schultze P., Smith F.W., Roe J.A., Feigon J., Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, 90, p. 3745.
- [99] Girardot M., Gareil P., Varenne A., Interaction study of a lysozyme-binding aptamer with mono- and divalent cations by ACE, *Electrophoresis*, **2010**, 31, p. 546.
- [100] Padmanabhan K., Padmanabhan K.P., Ferrara J.D., Sadler J.E., Tulinsky A., The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, p. 17651.
- [101] Schultze P., Macaya R.F., Feigon J., Three-dimensional Solution Structure of the Thrombin-binding DNA Aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG), *J. Mol. Biol.*, **1994**, 235, p. 1532.
- [102] Ellington A.D., Szostak J.W., In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, **1990**, 346, p. 818.
- [103] Tuerk C G.L., Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase., *Science*, **1990**, 249, p. 505.
- [104] Robertson D.L., Joyce G.F., Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA, *Nature*, **1990**, 344, p. 467.
- [105] Han K., Liang Z., Zhou N., Design Strategies for Aptamer-Based Biosensors, *Sensors*, **2010**, 10, p. 4541.
- [106] Hamula C.L.A., Guthrie J.W., Zhang H., Li X.-F., Le X.C., Selection and analytical applications of aptamers, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2006**, 25, p. 681.
- [107] Irvine D., Tuerk C., Gold L., Selexion: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis, *J. Mol. Biol.*, **1991**, 222, p. 739.
- [108] Levine H.A., Nilsen-Hamilton M., A mathematical analysis of SELEX, *Comput. Biol. Chem.*, **2007**, 31, p. 11.
- [109] Sampson T., Aptamers and SELEX: the technology, *World Patent Information*, **2003**, 25, p. 123.
- [110] Kusser W., Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution, *Rev. Mol. Biotechnol.*, **2000**, 74, p. 27.
- [111] Ruckman J., Green L.S., Beeson J., Waugh S., Gillette W.L., Henninger D.D., Claesson-Welsh L., Janjic N., 2'-Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165): Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, p. 20556.
- [112] Lin Y., Qiu Q., Gill S.C., Jayasena S.D., Modified RNA sequence pools for in vitro selection, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, p. 5229.
- [113] Lupold S.E., Hicke B.J., Lin Y., Coffey D.S., Identification and Characterization of Nuclease-stabilized RNA Molecules That Bind Human Prostate Cancer Cells via the Prostate-specific Membrane Antigen, *Cancer Res.*, **2002**, 62, p. 4029.
- [114] Cummins L.L., Owens S.R., Risen L.M., Lesnik E.A., Freier S.M., McGee D., Guinosso C.J., Cook P.D., Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity, *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, p. 2019.
- [115] Ito Y., Fukusaki E., DNA as a 'Nanomaterial', *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, 28, p. 155.
- [116] Ueno Y., Mikawa M., Matsuda A., Nucleosides and Nucleotides. 170. Synthesis and Properties of Oligodeoxynucleotides Containing 5-[N-[2-[N,N-Bis(2-aminoethyl)- amino]ethyl]carbamoyl]-2'-deoxyuridine and 5-[N-[3-[N,N- Bis(3-aminopropyl)amino]propyl]carbamoyl]-2'-deoxyuridine†, *Bioconjugate Chem.*, **1998**, 9, p. 33.
- [117] Thiviyanathan V., Somasunderam A., Gorenstein D., Combinatorial selection and delivery of thioaptamers, *Biochem. Soc. Trans.*, **2007**, 35 (Pt 1), p. 50.
- [118] Pristoupil TI K.M., Microchromatographic separation of ribonucleic acids from proteins on nitrocellulose membranes., *J. Chromatogr.*, **1968**, 32, p. 769.

- [119] Gopinath S., Methods developed for SELEX, *Anal Bioanal Chem*, **2007**, 387, p. 171.
- [120] Tombelli S., Minunni M., Mascini M., Analytical applications of aptamers, *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20, p. 2424.
- [121] Song K.-M., Cho M., Jo H., Min K., Jeon S.H., Kim T., Han M.S., Ku J.K., Ban C., Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer, *Anal. Biochem.*, **2011**, 415, p. 175.
- [122] Vianini E., Palumbo M., Gatto B., In vitro selection of DNA aptamers that bind l-tyrosinamide, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2001**, 9, p. 2543.
- [123] Lévesque D., Beaudoin J.-D., Roy S., Perreault J.-P., In vitro selection and characterization of RNA aptamers binding thyroxine hormone, *Biochem J*, **2007**, 403, p. 129.
- [124] Tombelli S., Minunni M., Luzi E., Mascini M., Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein, *Bioelectrochemistry*, **2005**, 67, p. 135.
- [125] Liu J., Stormo G.D., Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein–DNA interactions, *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, p. e141.
- [126] Stoltenburg R., Reinemann C., Strehlitz B., SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands, *Biomol. Eng*, **2007**, 24, p. 381.
- [127] Wang C., Yang G., Luo Z., Ding H., In vitro selection of high-affinity DNA aptamers for streptavidin, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **2009**, 41, p. 335.
- [128] Niazi J.H., Lee S.J., Gu M.B., Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, 16, p. 7245.
- [129] Joeng C.B., Niazi J.H., Lee S.J., Gu M.B., ssDNA aptamers that recognize diclofenac and 2-anilinophenylacetic acid, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, p. 5380.
- [130] Kikuchi K., Umehara T., Fukuda K., Hwang J., Kuno A., Hasegawa T., Nishikawa S., RNA Aptamers Targeted to Domain II of Hepatitis C Virus IRES That Bind to Its Apical Loop Region, *J. Biochem.*, **2003**, 133, p. 263.
- [131] Murphy M.B., Fuller S.T., Richardson P.M., Doyle S.A., An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, p. e110.
- [132] Mendonsa S.D., Bowser M.T., In Vitro Selection of Aptamers with Affinity for Neuropeptide Y Using Capillary Electrophoresis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, p. 9382.
- [133] Mendonsa S.D., Bowser M.T., In Vitro Selection of High-Affinity DNA Ligands for Human IgE Using Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, p. 5387.
- [134] Yang Y., Yang D., Schluesener H.J., Zhang Z., Advances in SELEX and application of aptamers in the central nervous system, *Biomol. Eng*, **2007**, 24, p. 583.
- [135] Hybarger G., Bynum J., Williams R., Valdes J., Chambers J., A microfluidic SELEX prototype, *Anal Bioanal Chem*, **2006**, 384, p. 191.
- [136] Lou X., Qian J., Xiao Y., Viel L., Gerdon A.E., Lagally E.T., Atzberger P., Tarasow T.M., Heeger A.J., Soh H.T., Micromagnetic selection of aptamers in microfluidic channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2009**, 106, p. 2989.
- [137] Huang C.-J., Lin H.-I., Shiesh S.-C., Lee G.-B., Integrated microfluidic system for rapid screening of CRP aptamers utilizing systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX), *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 25, p. 1761.
- [138] Cruz-Aguado J.A., Penner G., Determination of Ochratoxin A with a DNA Aptamer, *J. Agric. Food. Chem.*, **2008**, 56, p. 10456.
- [139] Stojanovic M.N., de Prada P., Landry D.W., Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, p. 4928.
- [140] Ruta J., Ravelet C., Désiré J., Décout J.-L., Peyrin E., Covalently bonded DNA aptamer chiral stationary phase for the chromatographic resolution of adenosine, *Anal Bioanal Chem*, **2008**, 390, p. 1051.
- [141] Brumbt A., Ravelet C., Grosset C., Ravel A., Villet A., Peyrin E., Chiral Stationary Phase Based on a Biostable l-RNA Aptamer, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, p. 1993.

- [142] Michaud M., Jourdan E., Ravelet C., Villet A., Ravel A., Grosset C., Peyrin E., Immobilized DNA Aptamers as Target-Specific Chiral Stationary Phases for Resolution of Nucleoside and Amino Acid Derivative Enantiomers, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, p. 1015.
- [143] Michaud M., Jourdan E., Villet A., Ravel A., Grosset C., Peyrin E., A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, p. 8672.
- [144] Peyrin E., Nucleic acid aptamer molecular recognition principles and application in liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J Sep Sci*, **2009**, 32, p. 1531.
- [145] Chapuis-Hugon F., Boisbaudry A., Madru B., Pichon V., New extraction sorbent based on aptamers for the determination of ochratoxin A in red wine, *Anal Bioanal Chem*, **2011**, 400, p. 1199.
- [146] Hadj Ali W., Pichon V., Characterization of oligosorbents and application to the purification of ochratoxin A from wheat extracts, *Anal Bioanal Chem*, **2013**, p. 1.
- [147] Madru B., Chapuis-Hugon F., Peyrin E., Pichon V.r., Determination of Cocaine in Human Plasma by Selective Solid-Phase Extraction Using an Aptamer-Based Sorbent, *Anal. Chem.*, **2009**, 81, p. 7081.
- [148] Madru B., Chapuis-Hugon F., Pichon V., Novel extraction supports based on immobilised aptamers: Evaluation for the selective extraction of cocaine, *Talanta*, **2011**, 85, p. 616.
- [149] Han B., Zhao C., Yin J., Wang H., High performance aptamer affinity chromatography for single-step selective extraction and screening of basic protein lysozyme, *J. Chromatogr. B*, **2012**, 903, p. 112.
- [150] Hu X., Mu L., Zhou Q., Wen J., Pawliszyn J., ssDNA Aptamer-Based Column for Simultaneous Removal of Nanogram Per Liter Level of Illicit and Analgesic Pharmaceuticals in Drinking Water, *Environ. Sci. Technol.*, **2011**, 45, p. 4890.
- [151] Kökpınar Ö., Walter J.-G., Shoham Y., Stahl F., Scheper T., Aptamer-based downstream processing of his-tagged proteins utilizing magnetic beads, *Biotechnol. Bioeng.*, **2011**, 108, p. 2371.
- [152] Zhao Q., Li X.-F., Shao Y., Le X.C., Aptamer-Based Affinity Chromatographic Assays for Thrombin, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, p. 7586.
- [153] Gulbakan B., Yasun E., Shukoor M.I., Zhu Z., You M., Tan X., Sanchez H., Powell D.H., Dai H., Tan W., A Dual Platform for Selective Analyte Enrichment and Ionization in Mass Spectrometry Using Aptamer-Conjugated Graphene Oxide, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, p. 17408.
- [154] Yasun E., Gulbakan B., Ocsoy I., Yuan Q., Shukoor M.I., Li C., Tan W., Enrichment and Detection of Rare Proteins with Aptamer-Conjugated Gold Nanorods, *Anal. Chem.*, **2012**, 84, p. 6008.
- [155] Shao N., Zhang K., Chen Y., He X., Zhang Y., Preparation and characterization of DNA aptamer based spin column for enrichment and separation of histones, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, p. 6684.
- [156] Deng Q., Watson C.J., Kennedy R.T., Aptamer affinity chromatography for rapid assay of adenosine in microdialysis samples collected in vivo, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1005, p. 123.
- [157] Romig T.S., Bell C., Drolet D.W., Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **1999**, 731, p. 275.
- [158] Mu L., Hu X., Wen J., Zhou Q., Robust aptamer sol-gel solid phase microextraction of very polar adenosine from human plasma, *Journal of chromatography. A*, **2013**, 1279, p. 7.
- [159] Yang X., Kong W., Hu Y., Yang M., Huang L., Zhao M., Ouyang Z., Aptamer-affinity column clean-up coupled with ultra high performance liquid chromatography and fluorescence detection for the rapid determination of ochratoxin A in ginger powder, *J. Sep. Sci.*, **2014**, 37, p. 853.
- [160] Huang Y.-F., Chang H.-T., Analysis of Adenosine Triphosphate and Glutathione through Gold Nanoparticles Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, p. 4852.
- [161] Wu X., Hu J., Zhu B., Lu L., Huang X., Pang D., Aptamer-targeted magnetic nanospheres as a solid-phase extraction sorbent for determination of ochratoxin A in food samples, *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, p. 7341.
- [162] Dick Jr L.W., Swintek B.J., McGown L.B., Albumins as a model system for investigating separations of closely related proteins on DNA stationary phases in capillary electrochromatography, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 519, p. 197.

- [163] Cole J.R., Dick L.W., Morgan E.J., McGown L.B., Affinity Capture and Detection of Immunoglobulin E in Human Serum Using an Aptamer-Modified Surface in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2006**, 79, p. 273.
- [164] Connor A.C., McGown L.B., Aptamer stationary phase for protein capture in affinity capillary chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1111, p. 115.
- [165] Dong Huy G., Jin N., Yin B.-C., Ye B.-C., A novel separation and enrichment method of 17 $\beta$ -estradiol using aptamer-anchored microbeads, *Bioprocess Biosyst Eng*, **2011**, 34, p. 189.
- [166] Aslipashaki S.N., Khayamian T., Hashemian Z., Aptamer based extraction followed by electrospray ionization-ion mobility spectrometry for analysis of tetracycline in biological fluids, *J. Chromatogr. B*, **2013**, 925, p. 26.
- [167] Zhang X., Zhu S., Deng C., Zhang X., Highly sensitive thrombin detection by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with aptamer functionalized core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C@Au magnetic microspheres, *Talanta*, **2012**, 88, p. 295.
- [168] De Girolamo A., McKeague M., Miller J.D., DeRosa M.C., Visconti A., Determination of ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer-based solid phase extraction column, *Food Chem.*, **2011**, 127, p. 1378.
- [169] Dick L.W., McGown L.B., Aptamer-Enhanced Laser Desorption/Ionization for Affinity Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, p. 3037.
- [170] Stead S.L., Ashwin H., Johnston B.H., Dallas A., Kazakov S.A., Tarbin J.A., Sharman M., Kay J., Keely B.J., An RNA-Aptamer-Based Assay for the Detection and Analysis of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish Tissue, *Anal. Chem.*, **2010**, 82, p. 2652.
- [171] Pichon V., Bouzige M., Miège C., Hennion M.-C., Immunosorbents: natural molecular recognition materials for sample preparation of complex environmental matrices, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **1999**, 18, p. 219.
- [172] Deng Q., German I., Buchanan D., Kennedy R.T., Retention and Separation of Adenosine and Analogues by Affinity Chromatography with an Aptamer Stationary Phase, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, p. 5415.
- [173] Zimmermann G.R., Jenison R.D., Wick C.L., Simorre J.-P., Pardi A., Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **1997**, 4, p. 644.
- [174] Mu L., Hu X., Wen J., Zhou Q., Robust aptamer sol-gel solid phase microextraction of very polar adenosine from human plasma, *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1279, p. 7.
- [175] Faure K., Liquid chromatography on chip, *Electrophoresis*, **2010**, 31, p. 2499.
- [176] Maximilien Blas N.D.-B., Jean-Louis Rocca, Microsystèmes lab-on-chip et séparations de type chromatographique, *Spectra Anal.*, **2005**, 246, p. 17.
- [177] Landers J.P., Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques, CRC press, 2007.
- [178] Liu J., Chen C.-F., Tsao C.-W., Chang C.-C., Chu C.-C., DeVoe D.L., Polymer Microchips Integrating Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Using Reversed-Phase Polymethacrylate Monoliths, *Anal. Chem.*, **2009**, 81, p. 2545.
- [179] Hodgson R.J., Brook M.A., Brennan J.D., Capillary-scale monolithic immunoaffinity columns for immunoextraction with in-line laser-induced fluorescence detection, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, p. 4404.
- [180] Faure K., Delaunay N., Alloncle G., Cotte S., Rocca J.-L., Optimization of in-situ monolithic synthesis for immunopreconcentration in capillary, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1149, p. 145.
- [181] Chen H.-X., Huang T., Zhang X.-X., Immunoaffinity extraction of testosterone by antibody immobilized monolithic capillary with on-line laser-induced fluorescence detection, *Talanta*, **2009**, 78, p. 259.
- [182] Yin H., Killeen K., The fundamental aspects and applications of Agilent HPLC-Chip, *J Sep Sci*, **2007**, 30, p. 1427.



- [183] Collins D.A., Nesterenko E.P., Paull B., Porous layer open tubular columns in capillary liquid chromatography, *Analyst*, **2014**, 139, p. 1292.
- [184] Pumera M., Microchip-based electrochromatography: designs and applications, *Talanta*, **2005**, 66, p. 1048.
- [185] Li H.-F., Zeng H., Chen Z., Lin J.-M., Chip-based enantioselective open-tubular capillary electrochromatography using bovine serum albumin-gold nanoparticle conjugates as the stationary phase, *Electrophoresis*, **2009**, 30, p. 1022.
- [186] Forster S., Kolmar H., Altmaier S., Preparation and kinetic performance assessment of thick film 10–20 µm open tubular silica capillaries in normal phase high pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1315, p. 127.
- [187] He B., Ji J., Regnier F.E., Capillary electrochromatography of peptides in a microfabricated system, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 853, p. 257.
- [188] He B., Regnier F., Microfabricated liquid chromatography columns based on collocated monolith support structures, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1998**, 17, p. 925.
- [189] He B., Tait N., Regnier F., Fabrication of Nanocolumns for Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, p. 3790.
- [190] Slentz B.E., Penner N.A., Lugowska E., Regnier F., Nanoliter capillary electrochromatography columns based on collocated monolithic support structures molded in poly(dimethyl siloxane), *Electrophoresis*, **2001**, 22, p. 3736.
- [191] Slentz B.E., Penner N.A., Regnier F., Geometric effects of collocated monolithic support structures on separation performance in microfabricated systems, *J. Sep. Sci.*, **2002**, 25, p. 1011.
- [192] Slentz B.E., Penner N.A., Regnier F.E., Capillary electrochromatography of peptides on microfabricated poly(dimethylsiloxane) chips modified by cerium(IV)-catalyzed polymerization, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 948, p. 225.
- [193] Slentz B.E., Penner N.A., Regnier F.E., Protein proteolysis and the multi-dimensional electrochromatographic separation of histidine-containing peptide fragments on a chip, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 984, p. 97.
- [194] Desmet G., Eeltink S., Fundamentals for LC Miniaturization, *Anal. Chem.*, **2012**, 85, p. 543.
- [195] Illa X., De Malsche W., Bomer J., Gardeniers H., Eijkel J., Morante J.R., Romano-Rodriguez A., Desmet G., An array of ordered pillars with retentive properties for pressure-driven liquid chromatography fabricated directly from an unmodified cyclo olefin polymer, *Lab Chip*, **2009**, 9, p. 1511.
- [196] Cheong W.J., Fritting techniques in chromatography, *J Sep Sci*, **2014**, 37, p. 603.
- [197] Lynen F., Buica A., de Villiers A., Crouch A., Sandra P., An efficient slurry packing procedure for the preparation of columns applicable in capillary electrochromatography and capillary electrochromatography-electrospray-mass spectrometry, *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28, p. 1539.
- [198] Mayer M., Rapp E., Marck C., Bruin G.J.M., Fritless capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, **1999**, 20, p. 43.
- [199] Oleschuk R.D., Shultz-Lockyear L.L., Ning Y., Harrison D.J., Trapping of Bead-Based Reagents within Microfluidic Systems: On-Chip Solid-Phase Extraction and Electrochromatography, *Anal. Chem.*, **1999**, 72, p. 585.
- [200] Jemere A.B., Oleschuk R.D., Ouchen F., Fajuyigbe F., Harrison D.J., An integrated solid-phase extraction system for sub-picomolar detection, *Electrophoresis*, **2002**, 23, p. 3537.
- [201] Ceriotti L., de Rooij N.F., Verpoorte E., An Integrated Fritless Column for On-Chip Capillary Electrochromatography with Conventional Stationary Phases, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, p. 639.
- [202] Gaspar A., Piyasena M.E., Gomez F.A., Fabrication of Fritless Chromatographic Microchips Packed with Conventional Reversed-Phase Silica Particles, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, p. 7906.
- [203] Calleri E., Ambrosini S., Temporini C., Massolini G., New monolithic chromatographic supports for macromolecules immobilization: Challenges and opportunities, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, 69, p. 64.

- [204] Bakry R., Huck C.W., Bonn G.K., Recent Applications of Organic Monoliths in Capillary Liquid Chromatographic Separation of Biomolecules, *J. Chromatogr. Sci.*, **2009**, 47, p. 418.
- [205] Wang Q.C., Svec F., Frechet J.M.J., Macroporous polymeric stationary-phase rod as continuous separation medium for reversed-phase chromatography, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, p. 2243.
- [206] Zeng C.-M., Liao J.-L., Nakazato K.i., Hjertén S., Hydrophobic-interaction chromatography of proteins on continuous beds derivatized with isopropyl groups, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 753, p. 227.
- [207] Li Y., Lee M.L., Biocompatible polymeric monoliths for protein and peptide separations, *J. Sep. Sci.*, **2009**, 32, p. 3369.
- [208] Xie S., Svec F., Fréchet J.M.J., Rigid porous polyacrylamide-based monolithic columns containing butyl methacrylate as a separation medium for the rapid hydrophobic interaction chromatography of proteins, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 775, p. 65.
- [209] Hage D.S., Anguizola J.A., Bi C., Li R., Matsuda R., Papastavros E., Pfaunmiller E., Vargas J., Zheng X., Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, 69, p. 93.
- [210] Tanaka N., Kobayashi H., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Hosoya K., Ikegami T., Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 965, p. 35.
- [211] Zhu T., Row K.H., Preparation and applications of hybrid organic–inorganic monoliths: A review, *J. Sep. Sci.*, **2012**, 35, p. 1294.
- [212] Kohler I., Schappler J., Rudaz S., Microextraction techniques combined with capillary electrophoresis in bioanalysis, *Anal Bioanal Chem*, **2013**, 405, p. 125.
- [213] Ramautar R., Ratnayake C.K., Somsen G.W., de Jong G.J., Capillary electrophoresis-mass spectrometry using an in-line sol–gel concentrator for the determination of methionine enkephalin in cerebrospinal fluid, *Talanta*, **2009**, 78, p. 638.
- [214] Thabano J.R.E., Breadmore M.C., Hutchinson J.P., Johns C., Haddad P.R., Capillary electrophoresis of neurotransmitters using in-line solid-phase extraction and preconcentration using a methacrylate-based weak cation-exchange monolithic stationary phase and a pH step gradient, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1175, p. 117.
- [215] Thabano J.R.E., Breadmore M.C., Hutchinson J.P., Johns C., Haddad P.R., Silica nanoparticle-templated methacrylic acid monoliths for in-line solid-phase extraction–capillary electrophoresis of basic analytes, *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, p. 4933.
- [216] Puig P., Borrull F., Calull M., Aguilar C., Sorbent preconcentration procedures coupled to capillary electrophoresis for environmental and biological applications, *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 616, p. 1.
- [217] Ramautar R., de Jong G.J., Somsen G.W., Developments in coupled solid-phase extraction–capillary electrophoresis 2009–2011, *Electrophoresis*, **2012**, 33, p. 243.
- [218] Proczek G., Augustin V., Descroix S., Hennion M.-C., Integrated microdevice for preconcentration and separation of a wide variety of compounds by electrochromatography, *Electrophoresis*, **2009**, 30, p. 515.
- [219] Tempels F.W.A., Underberg W.J.M., Somsen G.W., de Jong G.J., On-line coupling of SPE and CE-MS for peptide analysis, *Electrophoresis*, **2007**, 28, p. 1319.
- [220] Ramsey J.D., Collins G.E., Integrated Microfluidic Device for Solid-Phase Extraction Coupled to Micellar Electrokinetic Chromatography Separation, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, p. 6664.
- [221] Franciosi L., Govorukhina N., Fusetti F., Poolman B., Lodewijk M.E., Timens W., Postma D., ten Hacken N., Bischoff R., Proteomic analysis of human epithelial lining fluid by microfluidics-based nanoLC-MS/MS: A feasibility study, *Electrophoresis*, **2013**, 34, p. 2683.
- [222] Liu J., Chen C.-F., Chang C.-W., DeVoe D.L., Flow-through immunosensors using antibody-immobilized polymer monoliths, *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 26, p. 182.
- [223] Sun X., Yang W., Pan T., Woolley A.T., Affinity Monolith-Integrated Poly(methyl methacrylate) Microchips for On-Line Protein Extraction and Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, p. 5126.

- [224] Yang W., Sun X., Pan T., Woolley A.T., Affinity monolith preconcentrators for polymer microchip capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2008**, 29, p. 3429.
- [225] Nguyen T., Pei R., Stojanovic M., Lin Q., An aptamer-based microfluidic device for thermally controlled affinity extraction, *Microfluid Nanofluid*, **2009**, 6, p. 479.
- [226] Nguyen T.H., Pei R., Stojanovic M., Lin Q., Demonstration and characterization of biomolecular enrichment on microfluidic aptamer-functionalized surfaces, *Sens. Actuators, B*, **2011**, 155, p. 58.
- [227] Nguyen T., Pei R., Landry D.W., Stojanovic M.N., Lin Q., Microfluidic aptameric affinity sensing of vasopressin for clinical diagnostic and therapeutic applications, *Sens. Actuators, B*, **2011**, 154, p. 59.
- [228] Chung W.-J., Kim M.-S., Cho S., Park S.-S., Kim J.-H., Kim Y.-K., Kim B.-G., Lee Y.-S., Microaffinity purification of proteins based on photolytic elution: Toward an efficient microbead affinity chromatography on a chip, *Electrophoresis*, **2005**, 26, p. 694.
- [229] Gao C., Sun X., Woolley A.T., Fluorescent measurement of affinity binding between thrombin and its aptamers using on-chip affinity monoliths, *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1291, p. 92.
- [230] Wellner E.F., Kalish H., A chip-based immunoaffinity capillary electrophoresis assay for assessing hormones in human biological fluids, *Electrophoresis*, **2008**, 29, p. 3477.
- [231] Dalluge J.J., Sander L.C., Precolumn Affinity Capillary Electrophoresis for the Identification of Clinically Relevant Proteins in Human Serum: Application to Human Cardiac Troponin I, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, p. 5339.
- [232] Chen B., Peng H., Zheng F., Hu B., He M., Zhao W., Pang D., Immunoaffinity monolithic capillary microextraction coupled with ICP-MS for immunoassay with quantum dot labels, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2010**, 25, p. 1674.
- [233] Chaves A.R., Queiroz M.E.C., Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography with fluorescence detection for determination of interferon  $\alpha$  in plasma samples, *J. Chromatogr. B*, **2013**, 928, p. 37.
- [234] Morales-Cid G., Diez-Masa J.C., de Frutos M., On-line immunoaffinity capillary electrophoresis based on magnetic beads for the determination of alpha-1 acid glycoprotein isoforms profile to facilitate its use as biomarker, *Anal Chim Acta*, **2013**, 773, p. 89.
- [235] Medina-Casanellas S., Benavente F., Barbosa J., Sanz-Nebot V., Preparation and evaluation of an immunoaffinity sorbent for the analysis of opioid peptides by on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis–mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 717, p. 134.
- [236] Thomas D.H., Rakestraw D.J., Schoeniger J.S., Lopez-Avila V., Van Emon J., Selective trace enrichment by immunoaffinity capillary electrochromatography on-line with capillary zone electrophoresis — laser-induced fluorescence, *Electrophoresis*, **1999**, 20, p. 57.
- [237] Deng N., Liang Z., Liang Y., Sui Z., Zhang L., Wu Q., Yang K., Zhang L., Zhang Y., Aptamer Modified Organic–Inorganic Hybrid Silica Monolithic Capillary Columns for Highly Selective Recognition of Thrombin, *Anal. Chem.*, **2012**, 84, p. 10186.
- [238] Zhao Q., Li X.-F., Le X.C., Aptamer-Modified Monolithic Capillary Chromatography for Protein Separation and Detection, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, p. 3915.
- [239] Queiroz M.E.C., Oliveira E.B., Breton F., Pawliszyn J., Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry for analysis of fluoxetine in serum samples, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1174, p. 72.
- [240] Xu Y., Yang X., Wang E., Review: Aptamers in microfluidic chips, *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 683, p. 12.
- [241] Zhu J., Nguyen T., Pei R., Stojanovic M., Lin Q., Specific capture and temperature-mediated release of cells in an aptamer-based microfluidic device, *Lab Chip*, **2012**, 12, p. 3504.
- [242] Phillips J.A., Xu Y., Xia Z., Fan Z.H., Tan W., Enrichment of Cancer Cells Using Aptamers Immobilized on a Microfluidic Channel, *Anal. Chem.*, **2008**, 81, p. 1033.
- [243] Xu Y., Phillips J.A., Yan J., Li Q., Fan Z.H., Tan W., Aptamer-Based Microfluidic Device for Enrichment, Sorting, and Detection of Multiple Cancer Cells, *Anal. Chem.*, **2009**, 81, p. 7436.

- [244] Chen L., Liu X., Su B., Li J., Jiang L., Han D., Wang S., Aptamer-Mediated Efficient Capture and Release of T Lymphocytes on Nanostructured Surfaces, *Adv. Mater.*, **2011**, 23, p. 4376.
- [245] Guzman N.A., Determination of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in serum and urine by on-line immunoaffinity capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **2000**, 749, p. 197.
- [246] Koh Y., Lee B.-R., Yoon H.-J., Jang Y.-H., Lee Y.-S., Kim Y.-K., Kim B.-G., Bead affinity chromatography in a temperature-controllable microsystem for biomarker detection, *Anal Bioanal Chem*, **2012**, 404, p. 2267.
- [247] Cho S., Lee S.-H., Chung W.-J., Kim Y.-K., Lee Y.-S., Kim B.-G., Microbead-based affinity chromatography chip using RNA aptamer modified with photocleavable linker, *Electrophoresis*, **2004**, 25, p. 3730.
- [248] Charles J.A.M., McGown L.B., Separation of Trp-Arg and Arg-Trp using G-quartet-forming DNA oligonucleotides in open-tubular capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, **2002**, 23, p. 1599.
- [249] Rehder M.A., McGown L.B., Open-tubular capillary electrochromatography of bovine  $\beta$ -lactoglobulin variants A and B using an aptamer stationary phase, *Electrophoresis*, **2001**, 22, p. 3759.
- [250] Rehder-Silinski M.A., McGown L.B., Capillary electrochromatographic separation of bovine milk proteins using a G-quartet DNA stationary phase, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1008, p. 233.
- [251] Clark S.L., Remcho V.T., Open tubular liquid chromatographic separations using an aptamer stationary phase, *J. Sep. Sci.*, **2003**, 26, p. 1451.
- [252] Clark S.L., Remcho V.T., Electrochromatographic Retention Studies on a Flavin-Binding RNA Aptamer Sorbent, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, p. 5692.
- [253] Zhang Y.P., Zhang Y.J., Gong W.J., Chen N., Gopalan A.-I., Lee K.P., Novel fabrication of on-column capillary inlet frits through flame induced sintering of stainless steel particles, *Microchem. J.*, **2010**, 95, p. 67.
- [254] Krenkova J., Lacher N.A., Svec F., Highly Efficient Enzyme Reactors Containing Trypsin and Endoproteinase LysC Immobilized on Porous Polymer Monolith Coupled to MS Suitable for Analysis of Antibodies, *Anal. Chem.*, **2009**, 81, p. 2004.
- [255] Krenkova J., Lacher N.A., Svec F., Multidimensional system enabling deglycosylation of proteins using a capillary reactor with peptide-N-glycosidase F immobilized on a porous polymer monolith and hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry of glycans, *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, p. 3252.
- [256] Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Hosoya K., Tanaka N., Chromatographic Properties of Miniaturized Silica Rod Columns, *J. High. Resolut. Chromatogr.*, **1998**, 21, p. 477.
- [257] Guiochon G., Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1168, p. 101.
- [258] Kato M., Sakai-Kato K., Toyo'oka T., Silica sol-gel monolithic materials and their use in a variety of applications, *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28, p. 1893.
- [259] Ou J., Lin H., Zhang Z., Huang G., Dong J., Zou H., Recent advances in preparation and application of hybrid organic-silica monolithic capillary columns, *Electrophoresis*, **2013**, 34, p. 126.
- [260] Roux R., Abi Jaoudé M., Demesmay C., Improvement of chromatographic performances of in-situ synthesized hybrid C8 silica monoliths by reduction of structural radial heterogeneities, *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, p. 3857.
- [261] Roux R., Jaoudé M.A., Demesmay C., Rocca J.L., Optimization of the single-step synthesis of hybrid C8 silica monoliths dedicated to nano-liquid chromatography and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1209, p. 120.
- [262] Roux R., Puy G., Demesmay C., Rocca J.-L., Synthesis of propyl-functionalized hybrid monolithic silica capillaries and evaluation of their performances in nano-LC and CEC, *J. Sep. Sci.*, **2007**, 30, p. 3035.

- [263] Yan L., Zhang Q., Zhang J., Zhang L., Li T., Feng Y., Zhang L., Zhang W., Zhang Y., Hybrid organic–inorganic monolithic stationary phase for acidic compounds separation by capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1046, p. 255.
- [264] Hayes J.D., Malik A., Sol–Gel Monolithic Columns with Reversed Electroosmotic Flow for Capillary Electrochromatography, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, p. 4090.
- [265] Yan L., Zhang Q., Zhang W., Feng Y., Zhang L., Li T., Zhang Y., Hybrid organic–inorganic phenyl monolithic column for capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, **2005**, 26, p. 2935.
- [266] Colon H., Zhang X., Murphy J.K., Rivera J.G., Colon L.A., Allyl-functionalized hybrid silica monoliths, *Chem. Commun.*, **2005**, p. 2826.
- [267] Yan L.-J., Zhang Q.-H., Feng Y.-Q., Zhang W.-B., Li T., Zhang L.-H., Zhang Y.-K., Octyl-functionalized hybrid silica monolithic column for reversed-phase capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1121, p. 92.
- [268] Ding G., Da Z., Yuan R., Bao J.J., Reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode silica-based monolithic column for capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, **2006**, 27, p. 3363.
- [269] Ma J., Liang Z., Qiao X., Deng Q., Tao D., Zhang L., Zhang Y., Organic–Inorganic Hybrid Silica Monolith Based Immobilized Trypsin Reactor with High Enzymatic Activity, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, p. 2949.
- [270] Fabien M., Pierre A., Procédé sol-gel de polymérisation, *Techniques de l'ingénieur Procédés industriels de base en chimie et pétrochimie*, **2005**, base documentaire : TIB329DUO.
- [271] Kanamori K., Nakanishi K., Hanada T., Spinodal decomposition in siloxane sol-gel systems in macroporous media, *Soft Matter*, **2009**, 5, p. 3106.
- [272] Hoffmann F., Cornelius M., Morell J., Fröba M., Silica-Based Mesoporous Organic–Inorganic Hybrid Materials, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, p. 3216.
- [273] Hoffmann F., Froba M., Vitalising porous inorganic silica networks with organic functions-PMOs and related hybrid materials, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, p. 608.
- [274] Soler-Illia G.J.d.A.A., Sanchez C., Lebeau B., Patarin J., Chemical Strategies To Design Textured Materials: from Microporous and Mesoporous Oxides to Nanonetworks and Hierarchical Structures, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, p. 4093.
- [275] Zhang L., Chen B., Peng H., He M., Hu B., Aminopropyltriethoxysilane-silica hybrid monolithic capillary microextraction combined with inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of trace elements in biological samples, *J. Sep. Sci.*, **2011**, 34, p. 2247.
- [276] Mehdi A., Reye C., Corriu R., From molecular chemistry to hybrid nanomaterials. Design and functionalization, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, p. 563.
- [277] Wight A.P., Davis M.E., Design and Preparation of Organic–Inorganic Hybrid Catalysts, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, p. 3589.
- [278] Li W., Zhang M., Zhang J., Han Y., Self-assembly of cetyl trimethylammonium bromide in ethanol-water mixtures, *Front. Chem. China*, **2006**, 1, p. 438.
- [279] Zheng M.-M., Ruan G.-D., Feng Y.-Q., Hybrid organic–inorganic silica monolith with hydrophobic/strong cation-exchange functional groups as a sorbent for micro-solid phase extraction, *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, p. 7739.
- [280] Puy G., Demesmay C., Rocca J.-L., Iapichella J., Galarneau A., Brunel D., Electrochromatographic behavior of silica monolithic capillaries of different skeleton sizes synthesized with a simplified and shortened sol–gel procedure, *Electrophoresis*, **2006**, 27, p. 3971.
- [281] Hüsing N., Schubert U., Mezei R., Fratzl P., Riegel B., Kiefer W., Kohler D., Mader W., Formation and Structure of Gel Networks from  $\text{Si}(\text{OEt})_4/(\text{MeO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NR}'_2$  Mixtures ( $\text{NR}'_2 = \text{NH}_2$  or  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), *Chem. Mater.*, **1999**, 11, p. 451.
- [282] Ma J., Zhang L., Liang Z., Zhang W., Zhang Y., Monolith-based immobilized enzyme reactors: Recent developments and applications for proteome analysis, *J. Sep. Sci.*, **2007**, 30, p. 3050.
- [283] Nakanishi K., Pore Structure Control of Silica Gels Based on Phase Separation, *Journal of Porous Materials*, **1997**, 4, p. 67.

- [284] Wu M., Wu R.a., Zhang Z., Zou H., Preparation and application of organic-silica hybrid monolithic capillary columns, *Electrophoresis*, **2011**, 32, p. 105.
- [285] Youssef H., Ali Z., El-Nemr K., Bekhit M., Thermal and Structural Characterization Behavior of Electron Beam Irradiated Rubber/Clay Nanocomposites, *Adv. Polym. Tech.*, **2014**, 33, p. n/a.
- [286] Sui Z., Chen X., Wang L., Chai Y., Yang C., Zhao J., An Improved Approach for Synthesis of Positively Charged Silver Nanoparticles, *Chem. Lett.*, **2005**, 34, p. 100.
- [287] Wang B., Zhou M., Rozynek Z., Fossum J.O., Electrorheological properties of organically modified nanolayered laponite: influence of intercalation, adsorption and wettability, *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, p. 1816.
- [288] Zhang T., Xu G., Puckette J., Blum F.D., Effect of Silica on the Structure of Cetyltrimethylammonium Bromide, *J. Phys. Chem. C*, **2012**, 116, p. 11626.
- [289] Rahman I.A., Jafarzadeh M., Sipaut C.S., Synthesis of organo-functionalized nanosilica via a co-condensation modification using  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane (APTES), *Ceram. Int.*, **2009**, 35, p. 1883.
- [290] Maria Chong A.S., Zhao X.S., Functionalization of SBA-15 with APTES and Characterization of Functionalized Materials, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, p. 12650.
- [291] Gaudon A., Thèse : Matériaux composites nanostructurés par séparation de phases dans le système silice – zircone, **2005**, Université de Limoges
- [292] Jaoudé M.A., Thèse : Développement de phases monolithiques à base de dioxyde de titane pour la séparation et l'enrichissement des produits phosphorylés, *ISA*, **2011**, Doctorat, Université Lyon 1
- [293] Zhang Z., Lin H., Ou J., Qin H., Wu R.a., Dong J., Zou H., Preparation of phenyl-silica hybrid monolithic column with "one-pot" process for capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1228, p. 263.
- [294] Foley J.O., Nelson K.E., Mashadi-Hossein A., Finlayson B.A., Yager P., Concentration Gradient Immunoassay. 2. Computational Modeling for Analysis and Optimization, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, p. 3549.
- [295] Hagedorn J., Kasper C., Freitag R., Tennikova T., High performance flow injection analysis of recombinant Protein G, *J. Biotechnol.*, **1999**, 69, p. 1.
- [296] Platonova G.A., Pankova G.A., Il'ina I.Y., Vlasov G.P., Tennikova T.B., Quantitative fast fractionation of a pool of polyclonal antibodies by immunoaffinity membrane chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 852, p. 129.
- [297] Claire R., Toxines des cyanobactéries d'eau douces : méthodes de détection analytiques et bioanalytiques, détermination et identification dans l'environnement, élimination lors du traitement des eaux., *LSABM (ex-LECA)*, **1998**, Doctorat, UPMC - Paris 6
- [298] Rivasseau C., Martins S., Hennion M.-C., Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 799, p. 155.
- [299] Rivasseau C., Vanhoenacker G., Sandra P., Hennion M.C., On-line solid-phase extraction in microcolumn- liquid chromatography coupled to UV or MS detection: Application to the analysis of cyanobacterial toxins, *J. Microcolumn Sep.*, **2000**, 12, p. 323.
- [300] Sivonen K. J.G., *Cyanobacterial toxins*, C.a.B. J., E & FN Spon, **1999**, p. 41.
- [301] Roegner A.F., Brena B., González-Sapienza G., Puschner B., Microcystins in potable surface waters: toxic effects and removal strategies, *J. Appl. Toxicol.*, **2014**, 34, p. 441.
- [302] Falconer I.R., Humpage A.R., Tumour promotion by cyanobacterial toxins, *Phycologia*, **1996**, 35, p. 74.
- [303] Carmichael W.W., *Advances in Botanical Research*, J.A. Callow, Academic Press, **1997**, p. 211.
- [304] Sarazin G. Q.-L.C., Bertru G., Brient L., Vezie C., Bernard C., Couté A., Hennion M. C., Robillot C., Tandeau De Marsac N. , Première évaluation du risque toxique lié aux cyanobactéries d'eau douce en France : le programme " EFFLOCYA ", *Rev. Sci. Eau*, **2002**, 15, p. 315.

- [305] Merel S., Walker D., Chicana R., Snyder S., Baurès E., Thomas O., State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins, *Environ. Int.*, **2013**, 59, p. 303.
- [306] Harada K.-i., Tsuji K., Watanabe M.F., Kondo F., Stability of microcystins from cyanobacteria—III.\* Effect of pH and temperature, *Phycologia*, **1996**, 35, p. 83.
- [307] Lahti K., Rapala J., Färdig M., Niemelä M., Sivonen K., Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water, *Water Res.*, **1997**, 31, p. 1005.
- [308] Cousins I.T., Bealing D.J., James H.A., Sutton A., Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations, *Water Res.*, **1996**, 30, p. 481.
- [309] de Maagd P.G.-J., Hendriks A.J., Seinen W., Sijm D.T.H.M., pH-Dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR, *Water Res.*, **1999**, 33, p. 677.
- [310] Dawson R.M., the toxicology of microcystins, *Toxicon*, **1998**, 36, p. 953.
- [311] Ito E., Kondo F., Harada K.-i., Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR, *Toxicon*, **1997**, 35, p. 231.
- [312] Ding W.-X., Shen H.-M., Ong C.-N., Calpain Activation after Mitochondrial Permeability Transition in Microcystin-Induced Cell Death in Rat Hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2002**, 291, p. 321.
- [313] Chong M.W.K., Wong B.S.F., Lam P.K.S., Shaw G.R., Seawright A.A., Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes, *Toxicon*, **2002**, 40, p. 205.
- [314] Falconer I.R., Yeung D.S.K., Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by Microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins, *Chem. Biol. Interact.*, **1992**, 81, p. 181.
- [315] Liu Y., Song L., Li X., Liu T., The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misgurinus mizolepis* Gunthe, *Toxicon*, **2002**, 40, p. 395.
- [316] Freitas de Magalhães V., Moraes Soares R., Azevedo S.M.F.O., Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk, *Toxicon*, **2001**, 39, p. 1077.
- [317] Zimba P.V., Grimm C.C., A synoptic survey of musty/muddy odor metabolites and microcystin toxin occurrence and concentration in southeastern USA channel catfish (*Ictalurus punctatus* Rafinesque) production ponds, *Aquaculture*, **2003**, 218, p. 81.
- [318] Hoeger S.J., Hitzfeld B.C., Dietrich D.R., Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2005**, 203, p. 231.
- [319] Sangolkar L.N., Maske S.S., Chakrabarti T., Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria, *Water Res.*, **2006**, 40, p. 3485.
- [320] Ward C.J., Beattie K.A., Lee E.Y.C., Codd G.A., Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-performance liquid chromatographic analysis for microcystins, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1997**, 153, p. 465.
- [321] Fastner J., Flieger I., Neumann U., Optimised extraction of microcystins from field samples — a comparison of different solvents and procedures, *Water Res.*, **1998**, 32, p. 3177.
- [322] Kaya K., Sano T., Inoue H., Takagi H., Selective determination of total normal microcystin by colorimetry, LC/UV detection and/or LC/MS, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 450, p. 73.
- [323] Aranda-Rodriguez R., Kubwabo C., Benoit F.M., Extraction of 15 microcystins and nodularin using immunoaffinity columns, *Toxicon*, **2003**, 42, p. 587.
- [324] Tsutsumi T., Nagata S., Hasegawa A., Ueno Y., Immunoaffinity column as clean-up tool for determination of trace amounts of microcystins in tap water, *Food Chem. Toxicol.*, **2000**, 38, p. 593.
- [325] Kondo F., Matsumoto H., Yamada S., Tsuji K., Ueno Y., Harada K.-i., Immunoaffinity purification method for detection and quantification of microcystins in lake water, *Toxicon*, **2000**, 38, p. 813.
- [326] Kondo F., Matsumoto H., Yamada S., Ishikawa N., Ito E., Nagata S., Ueno Y., Suzuki M., Harada K.-i., Detection and Identification of Metabolites of Microcystins Formed in Vivo in Mouse and Rat Livers, *Chem. Res. Toxicol.*, **1996**, 9, p. 1355.

- [327] McElhiney J., Drever M., Lawton L.A., Porter A.J., Rapid Isolation of a Single-Chain Antibody against the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR by Phage Display and Its Use in the Immunoaffinity Concentration of Microcystins from Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2002**, 68, p. 5288.
- [328] Aguete E.C., Gago-Martínez A., Leão J.M., Rodríguez-Vázquez J.A., Menàrd C., Lawrence J.F., HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction, *Talanta*, **2003**, 59, p. 697.
- [329] Kondo F., Ito Y., Oka H., Yamada S., Tsuji K., Imokawa M., Niimi Y., Harada K.-i., Ueno Y., Miyazaki Y., Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column, *Toxicon*, **2002**, 40, p. 893.
- [330] Msagati T.A.M., Siame B.A., Shushu D.D., Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins, *Aquat. Toxicol.*, **2006**, 78, p. 382.
- [331] Zeck A., Eikenberg A., Weller M.G., Niessner R., Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 441, p. 1.
- [332] Cabrera K., Wieland G., Lubda D., Nakanishi K., Soga N., Minakuchi H., Unger K.K., SilicaROD™ — A new challenge in fast high-performance liquid chromatography separations, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **1998**, 17, p. 50.
- [333] Flinois C., Thèse : Miniaturisation du couplage en ligne de l'extraction sur phase solide à la microchromatographie en phase liquide associée à la détection par spectrométrie de masse. Applications à l'analyse de traces de métabolites polaires de pesticides et de toxines algales., *LSABM (ex-LECA)*, **2006**, Doctorat, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)
- [334] McElhiney J., Lawton L.A., Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2005**, 203, p. 219.
- [335] Gurbuz F., Metcalf J.S., Karahan A.G., Codd G.A., Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey, *Sci. Total Environ.*, **2009**, 407, p. 4038.
- [336] Gurbuz F., Metcalf J.S., Codd G.A., Karahan A.G., Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) for the Determination of Microcystins in Cyanobacteria, *Environ. Forensics*, **2012**, 13, p. 105.
- [337] Sghaier L., Stage de Master : Utilisation d'outils bioanalytiques pour l'analyse de toxines algales dans les milieux environnementaux., *LSABM*, **2011**, Master de Chimie de Paris Centre, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)
- [338] Bister B., Keller S., Baumann H.I., Nicholson G., Weist S., Jung G., Süßmuth R.D., Jüttner F., Cyanopeptolin 963A, a Chymotrypsin Inhibitor of Microcystis PCC 7806, *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, p. 1755.
- [339] Yéprémian C., Gugger M.F., Briand E., Catherine A., Berger C., Quiblier C., Bernard C., Microcystin ecotypes in a perennial Planktothrix agardhii bloom, *Water Res.*, **2007**, 41, p. 4446.
- [340] Catherine A., Quiblier C., Yéprémian C., Got P., Groleau A., Vinçon-Leite B., Bernard C., Troussellier M., Collapse of a Planktothrix agardhii perennial bloom and microcystin dynamics in response to reduced phosphate concentrations in a temperate lake, *FEMS Microbiology Ecology*, **2008**, 65, p. 61.
- [341] Djediat C., Moyenga D., Malécot M., Comte K., Yéprémian C., Bernard C., Puiseux-Dao S., Edery M., Oral toxicity of extracts of the microcystin-containing cyanobacterium Planktothrix agardhii to the medaka fish (*Oryzias latipes*), *Toxicon*, **2011**, 58, p. 112.
- [342] Delaunay-Bertoncini N., Thèse : Développement d'immunoabsorbants à base d'anticorps monoclonaux pour l'extraction sélective de familles de micropolluants organiques contenus dans des matrices complexes - Comparaison avec des polymères à empreinte moléculaire, *LSABM (ex-LECA)*, **2001**, Doctorat, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)
- [343] Kotia R.B., Li L., McGown L.B., Separation of Nontarget Compounds by DNA Aptamers, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, p. 827.
- [344] Barthelmebs L., Hayat A., Limiadi A.W., Marty J.-L., Noguer T., Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection, using superparamagnetic nanoparticles, *Sens. Actuators, B*, **2011**, 156, p. 932.



- [345] Rhouati A., Hayat A., Hernandez D.B., Meraihi Z., Munoz R., Marty J.-L., Development of an automated flow-based electrochemical aptasensor for on-line detection of Ochratoxin A, *Sens. Actuators, B*, **2013**, 176, p. 1160.
- [346] Sylviane D., Frédéric G., Jean-Marc F., Analyse et détection des mycotoxines, *Techniques de l'ingénieur Sécurité au laboratoire*, **2005**, base documentaire : TIB378DUO.
- [347] Malir F., Ostry V., Pfohl-Leskowicz A., Novotna E., Ochratoxin A: Developmental and Reproductive Toxicity—An Overview, *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, **2013**, 98, p. 493.
- [348] Malir F., Ostry V., Novotna E., Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data, *Toxin Rev.*, **2013**, 32, p. 19.
- [349] Ostry V., Malir F., Ruprich J., Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin, *Toxins*, **2013**, 5 p. 1574.
- [350] Kabak B., Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: Occurrence and exposure assessment, *Food Chem. Toxicol.*, **2009**, 47, p. 348.
- [351] Zaied C., Abid S., Zorgui L., Bouaziz C., Chouchane S., Jomaa M., Bacha H., Natural occurrence of ochratoxin A in Tunisian cereals, *Food Control*, **2009**, 20, p. 218.
- [352] Flajs D., Domijan A.M., Ivić D., Cvjetković B., Peraica M., ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia, *Food Control*, **2009**, 20, p. 590.
- [353] Soleas G.J., Yan J., Goldberg D.M., Assay of Ochratoxin A in Wine and Beer by High-Pressure Liquid Chromatography Photodiode Array and Gas Chromatography Mass Selective Detection, *J. Agric. Food. Chem.*, **2001**, 49, p. 2733.
- [354] Napolitano A., Fogliano V., Tafuri A., Ritieni A., Natural Occurrence of Ochratoxin A and Antioxidant Activities of Green and Roasted Coffees and Corresponding Byproducts, *J. Agric. Food. Chem.*, **2007**, 55, p. 10499.
- [355] Serra Bonvehí J., Occurrence of Ochratoxin A in Cocoa Products and Chocolate, *J. Agric. Food. Chem.*, **2004**, 52, p. 6347.
- [356] Pfohl-Leskowicz A., Manderville R.A., Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans, *Mol. Nutr. Food Res.*, **2007**, 51, p. 61.
- [357] Dohnal V., Pavlíková L., Kuca K., The pH and Mobile Phase Composition Effects Ochratoxin A Fluorescence at Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.*, **2010**, 48, p. 766.
- [358] Pfohl-Leskowicz A., Molinié A., Castegnaro M., Presence of Ochratoxin A (OTA), Citrinin and Fumonisin B1 in breakfast cereals collected in french markets. Comparison of OTA analysis using or not immunoaffinity clean-up before HPLC., *Rev Mex Micol.*, **2004**, 19, p. 7.
- [359] Wangikar P.B., Dwivedi P., Sinha N., Sharma A.K., Telang A.G., Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1 with special reference to microscopic effects, *Toxicology*, **2005**, 215, p. 37.
- [360] Hernández M.J., García-Moreno M.V., Durán E., Guillén D., Barroso C.G., Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 566, p. 117.
- [361] Leitner A., Zöllner P., Paolillo A., Stroka J., Papadopoulou-Bouraoui A., Jaborek S., Anklam E., Lindner W., Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine, *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 453, p. 33.
- [362] Medina Á., Jiménez M., Gimeno-Adelantado J.V., Valle-Algarra F.M., Mateo R., Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1083, p. 7.
- [363] Sibanda L., De Saeger S., Barna-Vetro I., Van Peteghem C., Development of a Solid-Phase Cleanup and Portable Rapid Flow-Through Enzyme Immunoassay for the Detection of Ochratoxin A in Roasted Coffee, *J. Agric. Food. Chem.*, **2002**, 50, p. 6964.

- [364] Aresta A., Vatinno R., Palmisano F., Zambonin C.G., Determination of Ochratoxin A in wine at sub ng/mL levels by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1115, p. 196.
- [365] Prella A., Spadaro D., Denca A., Garibaldi A., Gullino M., Comparison of Clean-Up Methods for Ochratoxin A on Wine, Beer, Roasted Coffee and Chili Commercialized in Italy, *Toxins*, **2013**, 5, p. 1827.
- [366] Lee T.P., Saad B., Khayoon W.S., Salleh B., Molecularly imprinted polymer as sorbent in micro-solid phase extraction of ochratoxin A in coffee, grape juice and urine, *Talanta*, **2012**, 88, p. 129.
- [367] Vidal J.C., Duato P., Bonel L., Castillo J.R., Molecularly Imprinted On-Line Solid-Phase Extraction Coupled with Fluorescence Detection for the Determination of Ochratoxin A in Wheat Samples, *Anal. Lett.*, **2011**, 45, p. 51.
- [368] Rhouati A., Paniel N., Meraihi Z., Marty J.-L., Development of an oligosorbent for detection of ochratoxin A, *Food Control*, **2011**, 22, p. 1790.
- [369] Muñoz K., Vega M., Rios G., Muñoz S., Madariaga R., Preliminary study of Ochratoxin A in human plasma in agricultural zones of Chile and its relation to food consumption, *Food Chem. Toxicol.*, **2006**, 44, p. 1884.
- [370] Brera C., Debegnach F., Minardi V., Prantera E., Pannunzi E., Faleo S., de Santis B., Miraglia M., Ochratoxin A Contamination in Italian Wine Samples and Evaluation of the Exposure in the Italian Population, *J. Agric. Food. Chem.*, **2008**, 56, p. 10611.
- [371] Karbancioğlu-Güler F., Heperkan D., Natural occurrence of ochratoxin A in dried figs, *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 617, p. 32.
- [372] Nguyen M.T., Tozlovanu M., Tran T.L., Pfohl-Leszkowicz A., Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam, *Food Chem.*, **2007**, 105, p. 42.
- [373] Studer-Rohr I., Dietrich D.R., Schlatter J., Schlatter C., The occurrence of ochratoxin A in coffee, *Food Chem. Toxicol.*, **1995**, 33, p. 341.
- [374] Peraica M., Domijan A.-M., Fuchs R., Lucić A., Radić B., The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia, *Toxicology Letters*, **1999**, 110, p. 105.
- [375] Dall'Asta C., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R., Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1024, p. 275.
- [376] Madru B., Thèse : Développement d'un support d'extraction sélective à base d'aptamères : synthèse, caractérisation et application à des matrices complexes, *LSABM (ex-LECA)*, **2010**, Doctorat, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)
- [377] Bazin I., Faucet-Marquis V., Monje M.-C., El Khoury M., Marty J.-L., Pfohl-Leszkowicz A., Impact of pH on the Stability and the Cross-Reactivity of Ochratoxin A and Citrinin, *Toxins*, **2013**, 5, p. 2324.
- [378] Anderson N.L., Anderson N.G., The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects, *Mol. Cell. Proteomics*, **2002**, 1, p. 845.
- [379] Kelleher N.L., Lin H.Y., Valaskovic G.A., Aaserud D.J., Fridriksson E.K., McLafferty F.W., Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, p. 806.
- [380] Safdar M., Sproß J., Jänis J., Microscale immobilized enzyme reactors in proteomics: Latest developments, *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1324, p. 1.
- [381] Keil B., Specificity of proteolysis, Springer, 1992.
- [382] Vlakh E.G., Tennikova T.B., Flow-through immobilized enzyme reactors based on monoliths: I. Preparation of heterogeneous biocatalysts, *J. Sep. Sci.*, **2013**, 36, p. 110.
- [383] Ma J., Hou C., Liang Y., Wang T., Liang Z., Zhang L., Zhang Y., Efficient proteolysis using a regenerable metal-ion chelate immobilized enzyme reactor supported on organic-inorganic hybrid silica monolith, *Proteomics*, **2011**, 11, p. 991.

- [384] Cingöz A., Hugon-Chapuis F., Pichon V., Evaluation of various immobilized enzymatic microreactors coupled on-line with liquid chromatography and mass spectrometry detection for quantitative analysis of cytochrome c, *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1209, p. 95.
- [385] Hoos J.S., Sudergat H., Hoelck J.-P., Stahl M., de Vlieger J.S.B., Niessen W.M.A., Lingeman H., Irth H., Selective quantitative bioanalysis of proteins in biological fluids by on-line immunoaffinity chromatography–protein digestion–liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **2006**, 830, p. 262.
- [386] Temporini C., Perani E., Mancini F., Bartolini M., Calleri E., Lubda D., Felix G., Andrisano V., Massolini G., Optimization of a trypsin-bioreactor coupled with high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for quality control of biotechnological drugs, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1120, p. 121.
- [387] Calleri E., Temporini C., Perani E., De Palma A., Lubda D., Mellerio G., Sala A., Galliano M., Caccialanza G., Massolini G., Trypsin-Based Monolithic Bioreactor Coupled On-Line with LC/MS/MS System for Protein Digestion and Variant Identification in Standard Solutions and Serum Samples, *J. Proteome Res.*, **2005**, 4, p. 481.
- [388] Calleri E., Temporini C., Perani E., Stella C., Rudaz S., Lubda D., Mellerio G., Veuthey J.L., Caccialanza G., Massolini G., Development of a bioreactor based on trypsin immobilized on monolithic support for the on-line digestion and identification of proteins, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1045, p. 99.
- [389] Nicoli R., Rudaz S., Stella C., Veuthey J.L., Trypsin immobilization on an ethylenediamine-based monolithic minidisk for rapid on-line peptide mass fingerprinting studies, *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, p. 2695.
- [390] Nicoli R., Gaud N., Stella C., Rudaz S., Veuthey J.L., Trypsin immobilization on three monolithic disks for on-line protein digestion, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, 48, p. 398.
- [391] Freije R., Klein T., Ooms B., Kauffman H.F., Bischoff R., An integrated high-performance liquid chromatography–mass spectrometry system for the activity-dependent analysis of matrix metalloproteases, *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1189, p. 417.
- [392] Carol J., Gorseling M.C.J.K., de Jong C.F., Lingeman H., Kientz C.E., van Baar B.L.M., Irth H., Determination of denaturated proteins and biotoxins by on-line size-exclusion chromatography–digestion–liquid chromatography–electrospray mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **2005**, 346, p. 150.
- [393] Garrett R.H., Grisham C.M., Lubochinsky B., Biochimie, De Boeck Supérieur, 2000.
- [394] Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X., Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c, *Cell*, **1996**, 86, p. 147.
- [395] Narita M., Shimizu S., Ito T., Chittenden T., Lutz R.J., Matsuda H., Tsujimoto Y., Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1998**, 95, p. 14681.
- [396] Barczyk K., Kreuter M., Pryjma J., Booy E.P., Maddika S., Ghavami S., Berdel W.E., Roth J., Los M., Serum cytochrome c indicates in vivo apoptosis and can serve as a prognostic marker during cancer therapy, *International Journal of Cancer*, **2005**, 116, p. 167.
- [397] <http://www.expasy.org/>.
- [398] Banerjee S., Mazumdar S., Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte, *International Journal of Analytical Chemistry*, **2012**, 2012, p. 40.
- [399] Karas M., Bahr U., Dülcks T., Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine, *Fresenius J Anal Chem*, **2000**, 366, p. 669.
- [400] Schmidt A., Karas M., Dülcks T., Effect of different solution flow rates on analyte ion signals in nano-ESI MS, or: when does ESI turn into nano-ESI?, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **2003**, 14, p. 492.
- [401] Marie G., Serani L., Laprévotte O., An On-Line Protein Digestion Device for Rapid Peptide Mapping by Electrospray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, p. 5423.

- [402] Bondarenko P.V., Chelius D., Shaler T.A., Identification and Relative Quantitation of Protein Mixtures by Enzymatic Digestion Followed by Capillary Reversed-Phase Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, p. 4741.
- [403] Roepstorff P., Fohlman J., Letter to the editors, *Biological Mass Spectrometry*, **1984**, 11, p. 601.
- [404] Biemann K., *Methods in Enzymology*, A.M. James, Academic Press, **1990**, p. 455.
- [405] Piper D.W., Fenton B.H., pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance, *Gut*, **1965**, 6, p. 506.
- [406] Switzer L., Giera M., Niessen W.M.A., Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments, *J. Proteome Res.*, **2013**, 12, p. 1067.
- [407] Hao C.C., Manager I.D., Unger M.A., Google Patents, 2002.
- [408] Söger N., Binnewies M., Hydrolyse und Kondensation von Si(OEt)<sub>4</sub>: Trennung und massenspektrometrische Charakterisierung der Zwischenprodukte, *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, **2003**, 629, p. 232.
- [409] Kirkland J.J., Henderson J.W., Reversed-Phase HPLC Selectivity and Retention Characteristics of Conformationally Different Bonded Alkyl Stationary Phases, *J. Chromatogr. Sci.*, **1994**, 32, p. 473.
- [410] Tsugikazu Tomono T.S., Eiichi Tokunaga, *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 2), 1981, p. 186.
- [411] Laurent Geiser S.E., Frantisek Svec, Jean M.J. Fréchet, *Journal of Chromatography A* (Vol. 2), 2008, p. 88.



# Annexe 1 : Microscopie électronique à balayage

## 1 Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière.

Un faisceau d'électrons est projeté sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre les électrons et l'échantillon génère des électrons secondaires, de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. A chaque point d'impact correspond ainsi un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact qui détermine le rendement en électrons secondaires et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée.

Les images par microscopie électronique à balayage reproduite dans ce rapport ont été réalisées grâce à un microscope S-3600N (Hitachi) propriété du LPEM (Laboratoire de Physique et d'Etude des Matériaux, UMR 8213 UPMC/ESPCI/CNRS). La résolution maximale est de 3 nm à 25 kV. La tension d'accélération peut varier de 0,3 kV à 30 kV.

## 2 Préparation des échantillons

Une étape de métallisation est nécessaire avant toute observation. Une pastille de carbone adhésive ( $d = 7$  mm) est collée sur un support métallique et une section de capillaire y est déposée. L'échantillon est ensuite métallisé en déposant une couche d'or d'une épaisseur de l'ordre de 2,5 nm. La métallisation est réalisée à l'aide d'un appareil Polaron 550 sous vide et sous balayage d'argon ce qui permet d'obtenir un dépôt d'épaisseur homogène et contrôlée sur toute la surface des échantillons.

## Annexe 2 : Matériel analytique utilisé

### 1 Description des pompes utilisées

#### 1.1 Nano-pompes analytiques



**Système Ultimate 3000 (Dionex) composé d'une pompe DGP-3600 et d'un gestionnaire de débit FLM-3100**

Le contrôle du débit est réalisé grâce à un diviseur de débit comprenant un système de rétrocontrôle intégré. Ce diviseur de débit comprend deux sorties : une sortie vers la colonne analytique (débit de quelques centaines de nanolitres) et une sortie vers un flacon de collecte des solvants usagés. Le ratio entre le débit dans la colonne et le débit d'entrée en sortie de la pompe DGP-3600 est de l'ordre de 1/1000. Ce diviseur de débit est équipé de deux résistances fluidiques qui divisent le débit provenant de la micro-pompe DGP-3600 selon un ratio inversement proportionnel à la résistance. Pour assurer une pression identique sur les deux résistances, les deux sorties du diviseur de débit sont connectées via un bras transversal comprenant un débitmètre. Un système de rétrocontrôle ajuste le débit dans ce bras à un débit proche de zéro. Pour ceci, la sortie du diviseur de débit allant vers la poubelle inclut une vanne qui ajuste le débit de sortie. Le débit est donc contrôlé en fonction de la pression de la colonne connectée en sortie du système. Ce système est contrôlé par le logiciel Chroméléon™.

#### **Système Ultimate 3000 (Thermo Scientific Dionex) composé d'une pompe NCP-3200RS**



Contrairement au système précédent, le système NCP délivre un débit de sortie indépendamment de la perte de charge générée par la colonne connectée en sortie. Il s'agit d'un système à deux voies (A et B). Chaque voie possède une pompe et un restricteur de débit. Les flux en provenance des deux pompes sont mélangés au niveau d'une pièce en Y. Chaque pompe comprend un système de deux pistons capables de délivrer une pression de façon bien contrôlée. Le débit en sortie de cette pompe est extrêmement bien contrôlé et le système peut monter jusqu'à des pressions de plusieurs centaines de bars. Ce contrôle précis nécessite une mesure fréquente de la viscosité des solvants des voies A et B ainsi qu'un

contrôle précis de la température interne du système de pompe. Ce système est contrôlé par le logiciel Chroméléon™.

## 1.2 Nano-pompes de préconcentration

### Pompe HPLC Shimadzu LC-5A



La pompe LC-5A présente en théorie un débit de travail compris entre 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  et environ 9,9  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Cependant, cette pompe nous a permis d'atteindre des débits beaucoup plus faibles inférieurs à 100 nL/min. Elle comprend une seule voie, il n'est donc pas possible de changer de solvant par simple basculement de voie.

Le débit doit par ailleurs être constamment contrôlé par une seringue placée en sortie de l'ensemble du système miniaturisé d'extraction (mIS ou mOS) de manière à faire varier les paramètres affichés sur la pompe pour ajuster le débit.

### Système Ultimate<sup>Plus</sup> (LC-Packings) composé d'une micro-pompe et d'un calibrateur NAN-75 (diviseur de débit)



Le contrôle du débit est réalisé grâce à un diviseur de débit. Ce diviseur de débit comprend deux sorties : une sortie vers la colonne analytique (débit de quelques centaines de nanolitres) et une sortie vers la poubelle. Ce système est contrôlé par le logiciel Chroméléon™. Le rétrocontrôle du débit doit être effectué manuellement en contrôlant le débit de sortie au moyen d'une seringue et en rentrant un coefficient correcteur dans le logiciel Chroméléon™. Le ratio entre le débit dans la colonne et le débit d'entrée en sortie de la pompe Ultimate<sup>Plus</sup> est de l'ordre de 1/100.

Cette pompe comprend quatre voies mais les volumes morts du système rendent l'arrivée des solvants potentiellement longue.

## 2 Description des détecteurs

Trois détecteurs UV ont été utilisés :

- Un détecteur VWD 3400RS Detector, Dionex Thermo Scientific, combiné avec la nano-pompe NCP-3200RS



- Deux détecteurs Ultimate™ UV associés respectivement à la nano-pompe DGP-3600/FLM-3100 (Dionex) et à la nano-pompe Ultimate<sup>plus</sup> (LC-Packings)

La détection LIF (*Laser Induced Fluorescence*) a été réalisée d'un équipement composé de plusieurs éléments. La radiation d'excitation en fluorescence a été obtenue grâce à un laser HeCd de longueur d'onde 325 nm, sortie 15 mW (Modèle 3056-M-A02, Melles Griot, Voisins-le-Bretonneux, France) couplé à un détecteur Zetalif Evolution (Picometrics, Toulouse, France). Ce système est présenté sur la Figure A-1.

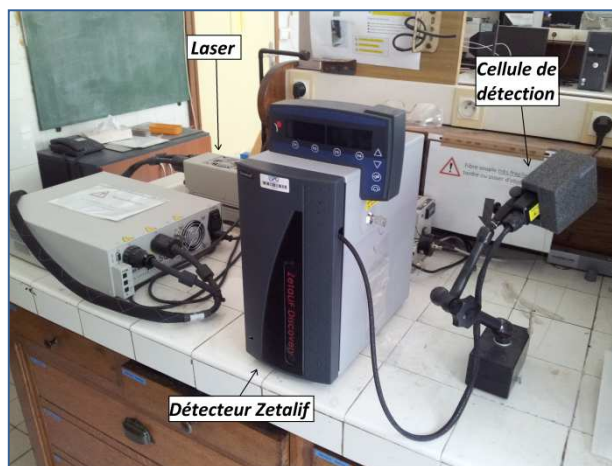


Figure A-1 : Détecteur LIF

### 3 Montage de préconcentration

Les nano-vannes utilisés dans ce projet de thèse sont des nano-vannes 6-voies à basculement manuel (Cheminert nanovolume 6 ports 2 pos 1/32", manual CN2-4346). Le montage de préconcentration présenté dans les Chapitre 4, 5 et 6 est similaire à celui présenté en Figure A-2

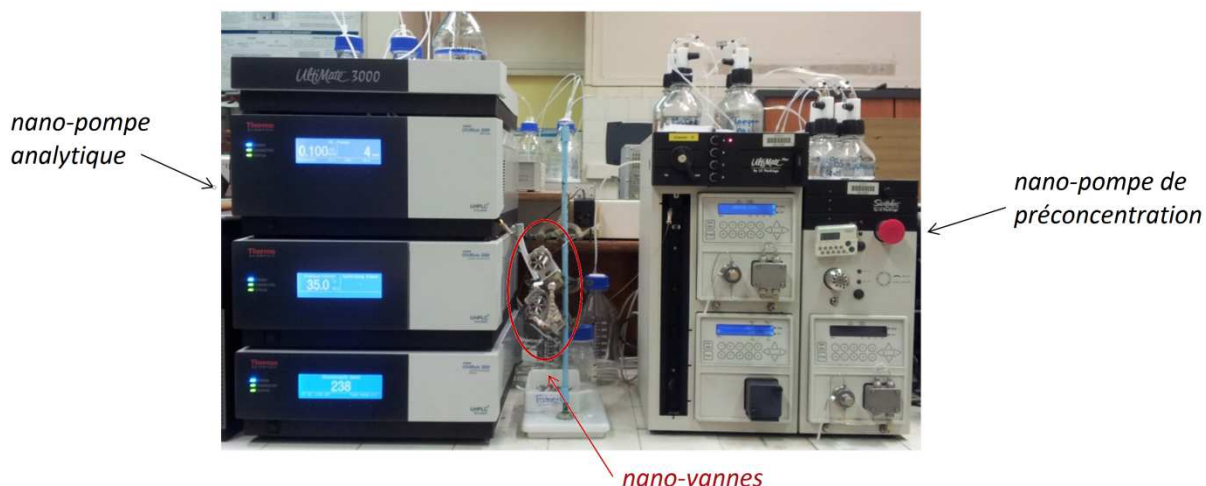


Figure A-2 : Photographie d'un montage de préconcentration couplé à la nanoLC

## Annexe 3 : Procédure d'immobilisation de biomolécules

La première étape du protocole consiste à activer un capillaire pendant 16h au glutaraldéhyde (10% w/w dans Tampon Phosphate pH 8.0 100 mM), après synthèse *in situ* du monolithe hybride à base de TEOS et d'APTES, au moyen d'un pousse-seringue, la solution de glutaraldéhyde étant introduite dans une seringue Hamilton® de 100  $\mu$ L (sans aiguille) connectée au capillaire.

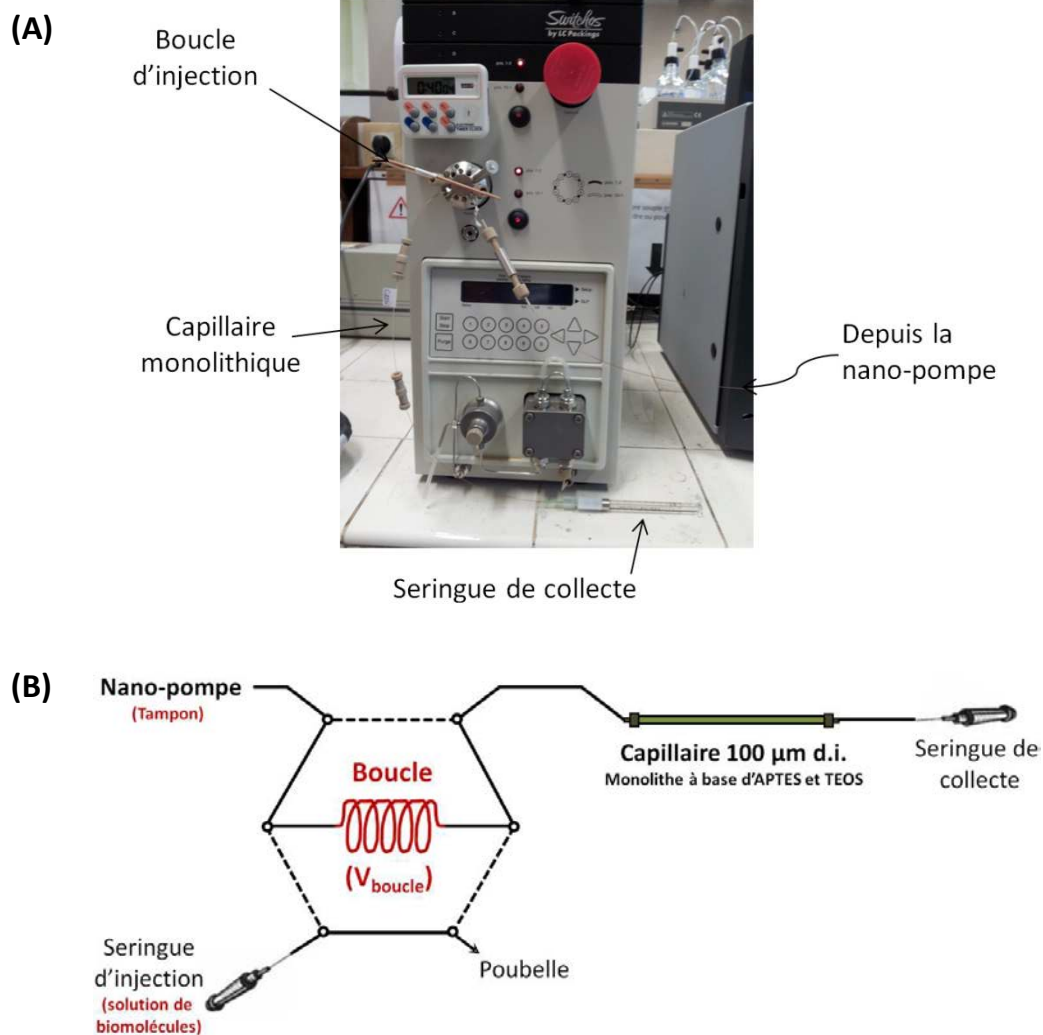


Figure A-3 : Montage permettant de percoler les solutions de biomolécules au travers des capillaires monolithiques après activation au glutaraldéhyde. (A) Photographie du montage. (B) Schéma de principe du montage.

## I. Immobilisation d'anticorps

La boucle d'injection utilisée a un volume  $V_{\text{boucle}}$  de 20  $\mu\text{L}$ . Le tampon délivré par la nano-pompe est un tampon PBS 10 mM (pH 7,4). Les monolithes en capillaire utilisés (0,1 mm d.i.) pour l'immobilisation ont une longueur de 4,5 cm.

Après activation au glutaraldéhyde, le capillaire est connecté en sortie du montage, tel que présenté dans le schéma de la Figure A-3. Un tampon PBS 10 mM (pH 7,4) est percolé pendant 2 à 3 min au travers du capillaire à un débit de 0,300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La solution d'anticorps (1 g/L dans du tampon PBS 10 mM (pH 7,4) + 0,1%  $\text{NaN}_3$ ) est ensuite injectée *via* la boucle d'injection (20  $\mu\text{L}$ ) du montage. Le débit de la nano-pompe est fixé à 0,014  $\mu\text{L}/\text{min}$  : la solution d'anticorps est percolée à travers le capillaire pendant 24h à température ambiante. Après 24 h, le débit est augmenté à 0,050  $\mu\text{L}/\text{min}$  : le capillaire est rincé à ce débit avec du tampon PBS 10 mM (pH 7,4) pendant 180 min (volume total = 9,0  $\mu\text{L}$ ). Le capillaire est déconnecté puis rincé successivement, au moyen d'une autre nano-pompe, avec du tampon Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0) pendant 3h (~ 20  $\mu\text{L}$ ) et du tampon PBS contenant 0,2 mg/mL de  $\text{NaCNBH}_3$  et 0,1% de  $\text{NaN}_3$  (30 min ~ 10  $\mu\text{L}$ ). Le capillaire est ensuite scellé avec des bouchons en silicone et conservé dans ce dernier tampon à 4°C au réfrigérateur avant utilisation.

L'ensemble de ces solutions est collecté en sortie du capillaire grâce à une seringue sans piston. Deux solutions différentes sont finalement récupérées avant quantification des anticorps non immobilisés :

- Phase 1 : environ 29  $\mu\text{L}$  : 20  $\mu\text{L}$  de la solution d'anticorps percolée à travers le capillaire ainsi que 9  $\mu\text{L}$  de la solution de rinçage au tampon PBS 10 mM pH 7,4. Evaporation puis reprise dans 50  $\mu\text{L}$  d'eau.
- Phase 2 : environ 30 - 35  $\mu\text{L}$  : Tris-HCl 0,5 mM (pH 8,0) et PBS + 0,2 mg/mL  $\text{NaCNBH}_3$ +0,1%  $\text{NaN}_3$ . Evaporation puis reprise dans 50  $\mu\text{L}$  d'eau

## II. Immobilisation d'aptamères

La boucle d'injection utilisée a un volume  $V_{\text{boucle}}$  de 60  $\mu\text{L}$ . Le tampon délivré par la nano-pompe est un tampon phosphate pH 8,0 100 mM. Les capillaires utilisés (0,1 mm d.i.) pour l'immobilisation ont une longueur de 10 cm.

Après activation au glutaraldéhyde, le capillaire est connecté en sortie du montage, tel que présenté dans le schéma de la Figure A-3. Un tampon phosphate 100 mM (pH 8,0) est percolé pendant 2 à 3 min à travers le capillaire à un débit de 0,300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . En parallèle, la solution d'aptamères (1 g/L dans 200 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) est chauffée en parallèle à 90°C pendant 5 min au bain-marie, laissée à refroidir 20 min à température ambiante puis *via* la boucle d'injection

(60  $\mu\text{L}$ ) du montage. Le débit de la nano-pompe est fixé à 0,040  $\mu\text{L}/\text{min}$  : la solution d'aptamères est percolée à travers le capillaire pendant 25h à température ambiante. Après 25 h, le débit est augmenté à 0,200  $\mu\text{L}/\text{min}$  : le capillaire est rincé à ce débit avec du tampon phosphate 100 mM (pH 8,0) pendant 30 min (volume total = 6,0  $\mu\text{L}$ ). Le capillaire est déconnecté puis rincé successivement, avec une autre nano-pompe, avec du tampon de liaison (BB) contenant 5 mg/mL de  $\text{NaCNBH}_3$  (3h ~ 25  $\mu\text{L}$ ) puis du tampon de liaison (BB) (3h ~ 25  $\mu\text{L}$ ). Le capillaire est ensuite scellé avec des bouchons en silicone et conservé dans ce dernier tampon à 4°C au réfrigérateur. Avant utilisation, le capillaire est rincé avec une phase hydro-organique eau/acétonitrile (70/30) à un débit de 500 nL/min pendant 20 min (volume total = 10,0  $\mu\text{L}$ ).

L'ensemble de ces solutions est collecté en sortie du capillaire grâce à une seringue sans piston. Trois solutions différentes sont finalement récupérées pour quantifier les aptamères non immobilisés :

- Phase 1 : environ 66  $\mu\text{L}$  : 60  $\mu\text{L}$  de la solution d'aptamères percolée à travers le capillaire ainsi que 6  $\mu\text{L}$  de la solution de rinçage au tampon phosphate 100 mM pH 8,0. Evaporation puis reprise dans 70  $\mu\text{L}$  d'eau.
- Phase 2 : environ 50 - 55  $\mu\text{L}$  : BB + 5mg/mL  $\text{NaCNBH}_3$  et BB. Evaporation puis reprise dans 70  $\mu\text{L}$  d'eau
- Phase 3 : environ 20  $\mu\text{L}$  Eau/ACN (70/30). Evaporation puis reprise dans 40  $\mu\text{L}$  d'eau

### III. Immobilisation de pepsine

La boucle d'injection utilisée a un volume  $V_{\text{boucle}}$  de 60  $\mu\text{L}$ . Le tampon délivré par la nano-pompe est un tampon phosphate pH 5,5 100 mM. Les capillaires utilisés (0,1 mm d.i.) pour l'immobilisation ont une longueur de 10 cm.

#### ➤ Immobilisation en présence de l'agent réducteur dès la percolation des enzymes

Après activation au glutaraldéhyde, le capillaire est connecté en sortie du montage, tel que présenté dans le schéma de la Figure A-3. Un tampon phosphate 100 mM (pH 5,5) est percolé pendant 2 à 3 min à travers le capillaire à un débit de 0,300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La solution de pepsine (2 g/L dans du tampon phosphate 100 mM (pH 5,5) contenant 5 g/L de  $\text{NaCNBH}_3$ ) est injectée *via* la boucle d'injection (60  $\mu\text{L}$ ) du montage. Le débit de la nano-pompe est fixé à 0,042  $\mu\text{L}/\text{min}$  : la solution de pepsine est percolée à travers le capillaire pendant 24h à température ambiante. Après 24 h, le débit est augmenté à 0,200  $\mu\text{L}/\text{min}$  : le capillaire est rincé à ce débit avec du tampon phosphate 100 mM (pH 5,5) pendant 30 min (volume total = 6,0  $\mu\text{L}$ ). Le capillaire est déconnecté puis rincé successivement, avec une autre nano-pompe, avec du tampon Tris-HCl 100 mM pH 4,5 (~ 30  $\mu\text{L}$ ) puis

du tampon phosphate 100 mM pH 5,5 (~ 20 µL). Le capillaire est ensuite scellé avec des bouchons en silicone et conservé dans ce dernier tampon à 4°C au réfrigérateur.

L'ensemble de ces solutions est récupéré en sortie du capillaire grâce à une seringue sans piston. Deux solutions différentes sont finalement collectées en sortie du capillaire pour quantifier les enzymes non immobilisées :

- Phase 1 : environ 66 µL : 60 µL de la solution de pepsine percolée à travers le capillaire ainsi que 6 µL de la solution de rinçage au tampon phosphate 100 mM pH 5,5. Evaporation puis reprise dans 100 µL d'eau.
- Phase 2 : environ 50 - 55 µL : Tris-HCl 100 mM pH 4,5 et tampon phosphate 100 mM pH 5,5. Evaporation puis reprise dans 50 µL d'eau

➤ *Immobilisation avec réduction ultérieure à la percolation des enzymes*

Le protocole est identique au précédent excepté pour les points suivants : la solution de pepsine (2 g/L dans du tampon phosphate 100 mM (pH 5,5)) ne contient pas de NaCNBH<sub>3</sub>. Après rinçage avec le tampon phosphate 100 mM (pH 5,5) (même durée et volume que précédemment), un rinçage au tampon phosphate 100 mM (pH 5,5) contenant 5 g/L de NaCNBH<sub>3</sub> est réalisé pendant 3 heures (~ 20 µL). Les rinçages effectués ensuite sont identiques à ceux du protocole précédent (Tris-HCl et tampon phosphate).

Trois solutions différentes sont finalement collectées en sortie du capillaire pour quantifier les enzymes non immobilisées :

- Phase 1 : environ 66 µL : 60 µL de la solution de pepsine percolée à travers le capillaire ainsi que 6 µL de la solution de rinçage au tampon phosphate 100 mM pH 5,5. Evaporation puis reprise dans 100 µL d'eau.
- Phase 2 : environ 20 µL : tampon phosphate 100 mM pH 5,5 + 5g/L NaCNBH<sub>3</sub>. Evaporation puis reprise dans 50 µL d'eau.
- Phase 3 : environ 50 - 55 µL : Tris-HCl 100 mM pH 4,5 et tampon phosphate 100 mM pH 5,5. Evaporation puis reprise dans 50 µL d'eau.

#### IV. Immobilisation de trypsine

La boucle d'injection utilisée a un volume  $V_{\text{boucle}}$  de 60 µL. Le tampon délivré par la nano-pompe est un tampon phosphate 100 mM (pH 8,0). Le monolithe en capillaire utilisé (0,1 mm d.i.) pour l'immobilisation a une longueur de 10,0 cm.

Après activation au glutaraldéhyde, le capillaire est branché en sortie du montage, tel que présenté dans le schéma de la Figure A-3. Un tampon phosphate 100 mM (pH 8,0) est percolé pendant 2 à 3 min au travers du capillaire à un débit de 0,300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La solution de trypsine (2 g/L dans du tampon phosphate 100 mM (pH 8,0) contenant 50 mM de benzamidine et 5 g/L de  $\text{NaCNBH}_3$ ) est ensuite injectée via la boucle d'injection (20  $\mu\text{L}$ ) du montage. Le débit de la nano-pompe est fixé à 0,042  $\mu\text{L}/\text{min}$  : la solution de trypsine est percolée à travers le capillaire pendant 24h à température ambiante. Après 24 h, le débit est augmenté à 0,200  $\mu\text{L}/\text{min}$  : le capillaire est rincé à ce débit avec du tampon phosphate 100 mM (pH 8,0) pendant 30 min (volume total = 6,0  $\mu\text{L}$ ). Le capillaire est déconnecté puis rincé successivement, au moyen d'une autre nano-pompe, avec du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) pendant 3h (~ 30  $\mu\text{L}$ ) et du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contenant 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  et 0,1% de  $\text{NaN}_3$  (~ 20  $\mu\text{L}$ ). Le capillaire est ensuite scellé avec des bouchons en silicone et conservé dans ce dernier tampon à 4°C au réfrigérateur avant utilisation.

## Annexe 4 : Méthodes d'analyse chromatographique

### 1 Analyse de la MC-LR et de la MC-RR par nano-chromatographie liquide couplée à une détection par absorbance UV

Deux chaînes de nano-chromatographie liquide différentes ont été utilisées : un système Ultimate 3000 (Thermo Scientific Dionex) équipé d'une pompe DGP-3600 et d'un gestionnaire de débit FLM-3100 ainsi qu'un système Ultimate 3000 (Thermo Scientific Dionex) équipé d'une pompe NCP-3200RS.

Chacun de ces systèmes est associé à un détecteur UV différent : un détecteur UltiMate™ UV pour la pompe DGP-3600 et un détecteur VWD 3400RS pour la pompe NCP-3200RS. Des cellules de détection de 3 nL ont été utilisées avec ces détecteurs. La détection est réalisée à une longueur d'onde de 238 nm.

Les analyses ont été réalisées avec une colonne capillaire Chromolith® CapRod® RP 18 (150 x 0,1 mm d.i.), en mode isocratique eau/acétonitrile (60/40, v/v) à un débit de 300 nL/min. La colonne analytique est thermostatée à 35°C dans un four à colonne. Le volume injecté est de 150 nL avec une vanne manuelle.

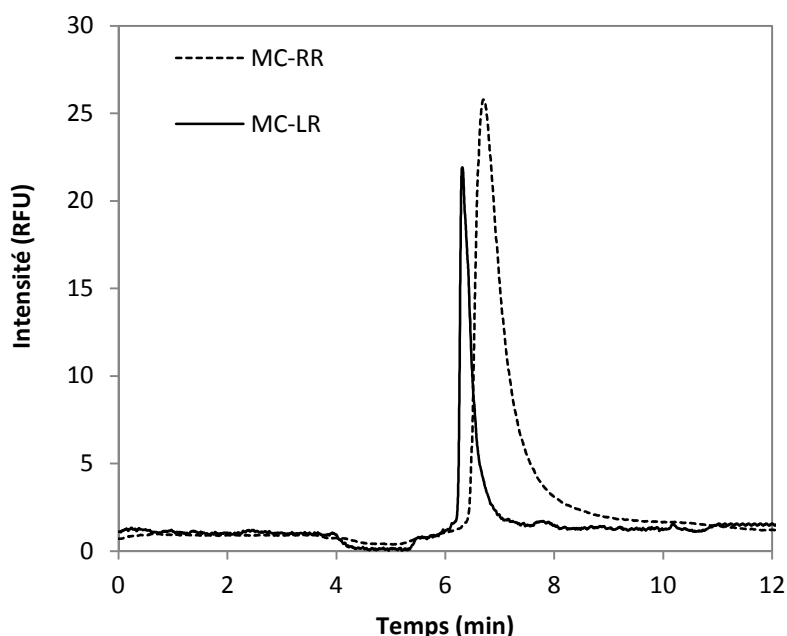


*Figure A-4 : Exemples de chromatogrammes correspondant à l'analyse d'eau pure dopée à 1,25 µg/mL de MC-LR ou MC-RR (inj = 150 nL). Nano-pompe analytique utilisée : DGP-3600/FLM-3100. Détection UV 238 nm.*

## 2 Analyse des ochratoxines A et B par nano-chromatographie liquide couplée à une détection LIF

Deux chaînes de nano-chromatographie liquide différentes ont été utilisées : un système Ultimate 3000 (Thermo Scientific Dionex) équipé d'une pompe DGP-3600 et d'un gestionnaire de débit FLM-3100 ainsi qu'un système Ultimate 3000 (Thermo Scientific Dionex) équipé d'une pompe NCP-3200RS.

Le détecteur LIF est présentée en Annexe 2.

Les analyses ont été réalisées avec une colonne Chromolith® CapRod® Capillary RP 18 (150 x 0,1 mm d.i.) non thermostatée, en mode isocratique eau/acétonitrile (70/30, v/v) à un débit de 500 nL/min.

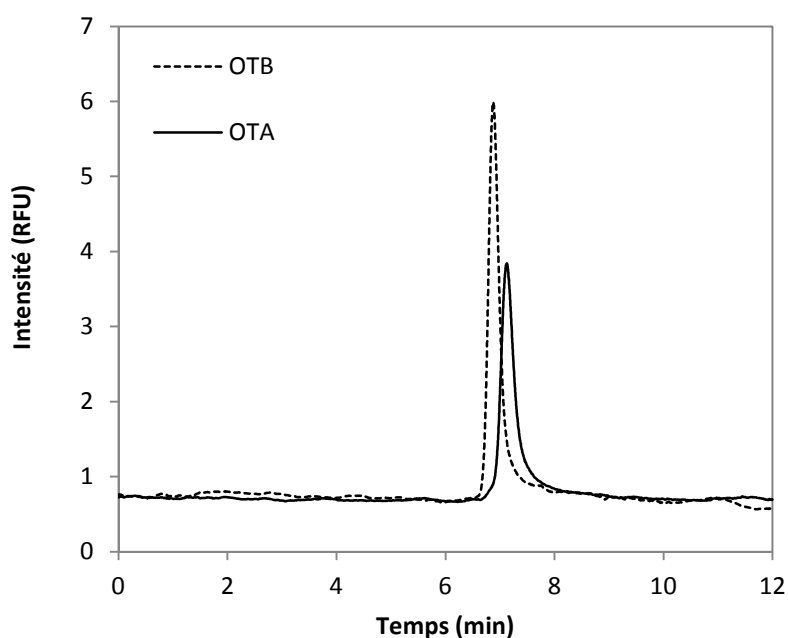


*Figure A-5 : Exemples de chromatogrammes correspondant à l'analyse de tampon de liaison (BB) dopé à 0,8 µg/mL d'OTA ou OTB (inj = 250 nL). Nano-pompe analytique utilisée : NCP-3200RS. Détection UV 238 nm.*

## 3 Analyse du Cytochrome C par nano-chromatographie couplée à une détection par spectrométrie de masse

### 3.1 Conditions de séparation

La colonne utilisée pour la séparation des peptides est une colonne EASY-Spray PepMap® C18, 3 µm, 100 Å (15 cm x 75 µm d.i.) thermostatée à 30°C avec une phase mobile constituée d'eau



et d'acétonitrile acidifiés à 0,1% par de l'acide formique. Le débit de la phase mobile est de 300 nL/min et le volume d'injection de 250 nL. La séparation est réalisée en mode gradient :

| Temps (min) | H <sub>2</sub> O + 0.1%<br>HCOOH (%) | ACN + 0.1%<br>HCOOH (%) |
|-------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 0           | 98                                   | 2                       |
| 20          | 65                                   | 35                      |
| 22          | 65                                   | 35                      |
| 24          | 98                                   | 2                       |
| 34          | 98                                   | 2                       |

### 3.2 Paramètres d'acquisition du spectromètre de masse pour la détection des peptides issus de la digestion du cytochrome C

Le spectromètre de masse utilisé est un triple quadrupôle TSQ Quantum<sup>TM</sup> (Thermo Scientific). La source utilisée est une source EASY-Spray<sup>TM</sup> (Thermo Scientific).

#### ➤ Paramètres généraux :

- *Spray voltage* : 1900 V
- *Capillary temperature* : 200 °C
- *Collision Pressure* : 1.5 mTorr
- *Skimmer offset* : 10 V
- *Scan width m/z* : 0.100

#### ➤ Transitions suivies :

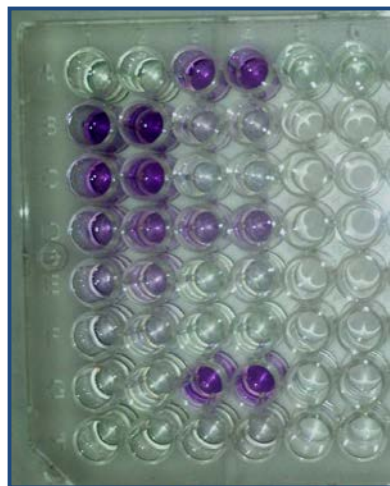
##### *Digestion à la pepsine*

| Ion Parent | Ion fils | EC (V) | Tube Lens (V) |
|------------|----------|--------|---------------|
| 463.4      | 128.9    | 27     | 117           |
| 463.4      | 425.3    | 16     | 117           |
| 421.3      | 135.7    | 21     | 92            |
| 421.3      | 248.6    | 15     | 92            |

##### *Digestion à la trypsine*

| Ion Parent | Ion fils | EC (V) | Tube Lens (V) |
|------------|----------|--------|---------------|
| 339.7      | 248.7    | 20     | 111           |
| 339.7      | 401.8    | 20     | 111           |
| 736.3      | 1113.7   | 20     | 111           |
| 736.3      | 286.6    | 20     | 111           |

## Annexe 5 : Méthode de dosage des protéines au BCA



La méthode au BCA (Bicinchoninic Acid Assay) est basée sur la conversion de l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^{1+}$  dans des conditions alcalines. Cette réaction est influencée par 4 acides aminés (cystéine, cystine, tyrosine, et tryptophane) et par la structure peptidique des protéines. La quantité de  $\text{Cu}^{2+}$  réduite est proportionnelle à la concentration en protéines. L'acide bicinchoninique est un réactif chromogène spécifique de l'ion  $\text{Cu}^{1+}$ . Deux molécules d'acide bicinchoninique peuvent réagir avec un ion  $\text{Cu}^{1+}$ . Ainsi, la quantité de  $\text{Cu}^{2+}$  réduite peut être déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre par changement de couleur de la solution en violet, qui absorbe à 562 nm. L'absorbance est directement

proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans la solution et peut être estimée par comparaison avec une protéine standard (soit la protéine à doser soit une protéine telle que l'albumine bovine sérique (BSA)).

### Matériel

- BCA protein assay reagents (Pierce, catalog number: 23227)
- Spectrophotomètre (SpectraMax M2, *Molecular Devices*)
- Incubateur (PHMP, *Grant Bio*)

### Procédure

Une gamme d'étalonnage de la protéine considérée est tout d'abord préparée (généralement entre 20  $\mu\text{g/mL}$  et 1  $\text{mg/mL}$  voire 2  $\text{mg/mL}$ ). En parallèle, le réactif de travail (WR : working reagent) du test BCA est préparé en mélangeant 9,8 mL de Réactif A et 200  $\mu\text{L}$  de réactif B. Ce réactif ne peut pas être conservé plus de 24h.

Dans différents puits d'une microplaque 96-puits, sont introduits :

- 10  $\mu\text{L}$  de chacun des standards
- 10  $\mu\text{L}$  d'eau ou tampon phosphate (en duplicat) = blancs
- 10  $\mu\text{L}$  des échantillons à quantifier (un duplicat est réalisé pour chaque échantillon)

100  $\mu\text{L}$  de WR sont ajoutés dans chacun des puits puis la plaque est placée sous incubation à 37 °C pendant 30 min avec une agitation à 300 RPM. La plaque est ensuite laissée 5 min à température ambiante puis une mesure d'absorbance est réalisée à une longueur d'onde de 490 nm.

#### **Influence de l'agent réducteur $\text{NaCNBH}_3$ sur la quantification de la pepsine :**

Des gammes d'étalonnages de pepsine dans du tampon phosphate 100 mM (pH 5,5) ont été réalisées avec différentes quantités d'agent réducteur  $\text{NaCNBH}_3$ . La concentration maximale en  $\text{NaCNBH}_3$  dans les solutions collectées après greffage, évaporation et reprise dans un volume d'eau connu est de 3,0 g/L. Il est visible en Figure A-6 que la présence de  $\text{NaCNBH}_3$  dans les solutions n'a pas d'influence marquée sur la quantification de la pepsine quelle que soit la concentration de cette dernière.

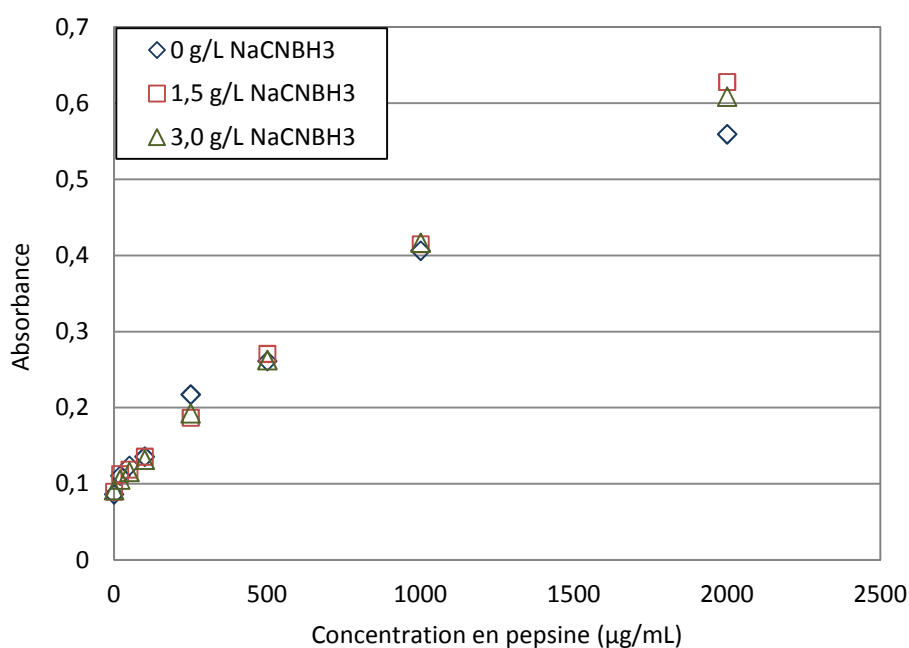


*Figure A-6 : Absorbance mesurée en fonction de la quantité de pepsine introduite dans un tampon phosphate 100 mM, pH 5,5. Trois concentrations d'agent réducteur ( $\text{NaCNBH}_3$ ) étudiées dans les solutions : 0 g/L, 1,5 g/L, 3,0 g/L. Mesure effectuée par la méthode de dosage au BCA.*

# Annexe 6 : Méthode d'analyse chromatographique des aptamères

## 1 Système utilisé

Le système utilisé est une chaîne de chromatographie liquide Agilent 1200 Series équipée d'une pompe analytique binaire, d'un passeur d'échantillon, et d'un détecteur d'absorbance UV à barrettes de diodes contrôlés par le logiciel Chemstation.

La séparation est réalisée sur une colonne SymmetryShield RP18 (150 x 2,1 mm, 3,5  $\mu$ m, Waters) placée dans un four à colonne maintenu à 50°C.

## 2 Conditions analytiques

Une chromatographie de paire d'ions a été utilisée avec un tampon acétate de triéthylammonium (0,1 M, pH = 7) comme solvant A et l'acétonitrile comme solvant B. Un mode gradient a été utilisé à un débit de 0,2 mL/min, allant de 7% jusqu'à 14,5% de B en 30 min. La détection est réalisée à 260 nm. Le volume d'injection est de 25  $\mu$ L.

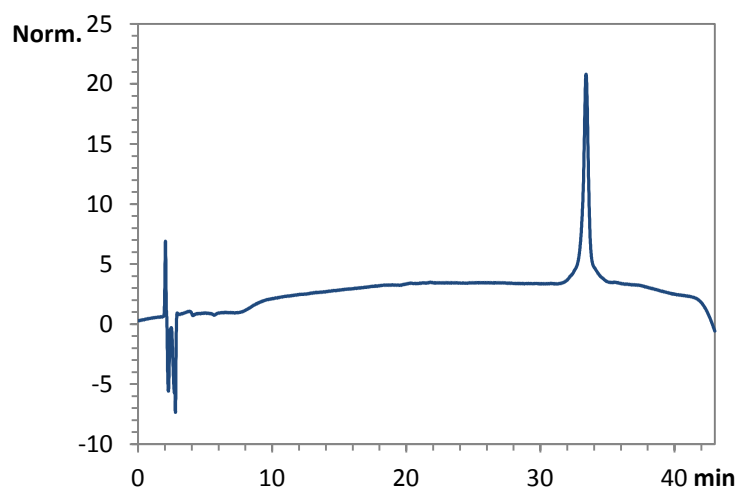


*Figure A-7 : Exemples de chromatogrammes correspondant à l'analyse d'une solution d'aptamères à 1 g/L diluée 400 fois par chromatographie de paires d'ions.*

# Annexe 7 : Préparation des échantillons réels

## 1 Préparation des extraits d'algues

Les cultures de cyanobactéries ont été obtenues auprès d'Annick Méjean (Laboratoire Charles Friedel, UMR CNRS 7223, ENSCP Chimie ParisTech, Paris, France). La souche utilisée est la *Microcystis aeruginosa* PCC 7806.

La culture de cyanobactéries est filtrée sur filtre en fibres de verre GF/C. Le filtre est séché à 40°C pendant 12h. Les microcystines sont extraites par 50 mL de méthanol pur à température ambiante, à l'aide d'un bac à ultrasons pendant 10 min. Cette extraction est répétée trois fois. Les différentes fractions sont regroupées. L'extrait méthanolique est concentré grâce à un évaporateur rotatif. Les deux derniers millilitres restants sont filtrés sur filtre seringue Millex 0,45 µm (Millipore, USA).

20 µL de l'extrait méthanolique obtenu sont évaporés sous azote dans un flacon HPLC de 1,5 mL puis repris dans 1 mL d'eau. L'extrait aqueux obtenu est noté 2% PCC 7806.

## 2 Préparation des eaux environnementales

Les eaux environnementales utilisées ont été prélevées sur site en novembre 2012 au moyen de flacon de 500 mL. Ces eaux correspondent à :

- Une eau de lac : Viry-Châtillon, Coordonnées du prélèvement : Latitude 48,669674. Longitude 2,382750
- Une eau de Seine : Viry-Châtillon, Coordonnées du prélèvement : Latitude 48,669561. Longitude 2,400710

De manière à éliminer les particules en suspensions dans ces eaux, ces dernières ont été filtrées sur Büchner.

La concentration des eaux a été effectuée comme suit : 4 mL d'eau de lac ont été introduits dans un flacon de 5 mL et mis à évaporer sous azote. Lorsque le flacon ne contient plus qu'un peu moins de 1 mL, son contenu est transféré, à l'aide d'un pipetman de 1 mL dans un falcon de 1,5 mL puis replacé sous évaporation. Enfin, lorsque le contenu du dernier flacon est proche de 200 µL, son contenu est transféré au moyen d'un pipetman de 200 µL dans un insert puis replacé sous évaporation jusqu'à évaporation complète. Enfin, l'extrait est repris dans 20 µL d'eau.

### 3 Préparation des échantillons de bière

Une bière blonde contenant 4,2% d'éthanol a été choisie. La bière a été préalablement refroidie à une température de 4°C pendant 30 min de manière à empêcher la formation rapide de mousse pouvant conduire à un débordement de l'échantillon dans les étapes suivantes. 30 cL de bière refroidie ont ensuite été dégazés dans un bain à ultrasons pendant 3 heures. La bière a ensuite été filtrée au travers d'un filtre en papier. Un volume connu de cette bière filtrée a ensuite été dilué une fois dans le même volume de tampon de liaison (BB) pour obtenir un mélange bière/BB (50/50) qui a été dopé avec l'OTA à différentes concentrations : 0.1, 0.3, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 and 1.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

## Annexe 8 : Protocoles de digestion en solution

Les digestions en solution sont menées pendant 16 heures à 37°C avec des volumes de solution de 1 mL.

### 1 Digestion en solution à la pepsine

Toutes les solutions sont préparées dans de l'acide formique à pH 2,0 ou à pH 3,0.

- Cytochrome c : solution n°1 : 0.1 g/L, solution n°2 : 0.05 g/L
- Pepsine : solution n°1 : 0.05 g/L, solution n°2 : 0.01 g/L

Digestion à quantité de pepsine fixée

| C° en CYC (µg/mL) | E/S   | Solution de CYC | Volume de solution de CYC (µL) | Solution de pepsine | Volume de solution de pepsine (µL) | Volume de HCOOH (µL) |
|-------------------|-------|-----------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------------|----------------------|
| 0.5               | 1/2.5 | n°2             | 10                             | n°1                 | 12                                 | 980                  |
| 1                 | 1/5   | n°2             | 20                             | n°1                 | 12                                 | 970                  |
| 5                 | 1/25  | n°1             | 50                             | n°1                 | 12                                 | 940                  |
| 10                | 1/50  | n°1             | 100                            | n°1                 | 12                                 | 890                  |
| 25                | 1/125 | n°1             | 250                            | n°1                 | 12                                 | 740                  |
| 50                | 1/250 | n°1             | 500                            | n°1                 | 12                                 | 490                  |

Digestion à rapport E/S fixé

| C° en CYC (µg/mL) | E/S   | Solution de CYC | Volume de solution de CYC (µL) | Solution de pepsine | Volume de solution de pepsine (µL) | Volume de HCOOH (µL) |
|-------------------|-------|-----------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------------|----------------------|
| 0.5               | 1/2.5 | n°2             | 10                             | n°2                 | 6                                  | 985                  |
| 1                 | 1/5   | n°2             | 20                             | n°2                 | 12                                 | 970                  |
| 5                 | 1/25  | n°1             | 50                             | n°1                 | 12                                 | 925                  |
| 10                | 1/50  | n°1             | 100                            | n°1                 | 23                                 | 875                  |
| 25                | 1/125 | n°1             | 250                            | n°1                 | 58                                 | 690                  |
| 50                | 1/250 | n°1             | 500                            | n°1                 | 117                                | 385                  |

## 2 Digestion en solution à la trypsine

Toutes les solutions sont préparées dans du tampon Tris-HCl (50 mM), CaCl<sub>2</sub> (10 mM), pH 8,0.

- Cytochrome c : solution n°1 : 0.1 g/L, solution n°2 : 0.05 g/L
- Trypsine : solution à 0.01 g/L

| C° en CYC<br>(µg/mL) | E/S   | Solution<br>de CYC | Volume de solution<br>de CYC (µL) | Volume de<br>solution de<br>trypsine (µL) | Volume de<br>tampon<br>(µL) |
|----------------------|-------|--------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|
| 0.5                  | 1/2.5 | n°2                | 10                                | 40                                        | 950                         |
| 1                    | 1/5   | n°2                | 20                                | 40                                        | 940                         |
| 5                    | 1/25  | n°1                | 50                                | 40                                        | 910                         |
| 10                   | 1/50  | n°1                | 100                               | 40                                        | 860                         |
| 25                   | 1/125 | n°1                | 250                               | 40                                        | 810                         |
| 50                   | 1/250 | n°1                | 500                               | 40                                        | 710                         |



## Annexe 9 : Rapports MASCOT

- 1 Rapport MASCOT obtenu après digestion à la pepsine de 1 mg/mL de cytochrome C en solution puis dilution au vingtième.

### MASCOT Search Results

#### Protein View: CYC\_HORSE

Cytochrome c OS=Equus caballus GN=CYCS PE=1 SV=2

Database: SwissProt  
Score: 90  
Expect: 0.00051  
Nominal mass ( $M_r$ ): 11833  
Calculated pI: 9.59  
Taxonomy: [Equus caballus](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of CYC HORSE against nr.](#)

#### Search parameters

Enzyme: PepsinA: cuts C-term side of FL.  
Variable modifications: [Acetyl \(Protein N-term\)](#), [Oxidation \(M\)](#)  
Mass values searched: 10  
Mass values matched: 10

#### Protein sequence coverage: 74%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 MGDVEKGGKKI FVQKCAQCHI VEKGGKHKITG PNLHGLFGRK TGQAPGFTYT  
51 DANKNKGITW KEETLMEYLE NPKKYIPGTK MIFAGIKKKT EREDLIAYLK  
101 KATNE

Unformatted sequence string: [105 residues](#) (for pasting into other applications).

Sort peptides by ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Show predicted peptides also

| Start - End | Observed  | Mr(expt)  | Mr(calc)  | Delta M   | Peptide                                   |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------------------------------|
| 2 - 11      | 1120.3000 | 1120.3000 | 1120.2988 | 0.0012 0  | M.GDVEKGGKKIF.V                           |
| 2 - 11      | 1162.4000 | 1162.4000 | 1162.3355 | 0.0645 0  | M.GDVEKGGKKIF.V + Acetyl (Protein N-term) |
| 38 - 47     | 1018.1000 | 1018.1000 | 1018.1273 | -0.0273 0 | F.GRKTGQAPGF.T                            |
| 48 - 65     | 2112.1000 | 2112.1000 | 2112.2959 | -0.1959 0 | F.TYTDANKNKGITWKEETL.M                    |
| 66 - 83     | 2202.6000 | 2202.6000 | 2202.6339 | -0.0338 1 | L.MEYLENPKKYIPGTRMIF.A                    |
| 66 - 83     | 2218.1000 | 2218.1000 | 2218.6333 | -0.5333 1 | L.MEYLENPKKYIPGTRMIF.A + Oxidation (M)    |
| 70 - 83     | 1666.0000 | 1666.0000 | 1665.9929 | 0.0071 0  | L.ENPKKYIPGTRMIF.A                        |
| 70 - 83     | 1682.0000 | 1682.0000 | 1681.9923 | 0.0077 0  | L.ENPKKYIPGTRMIF.A + Oxidation (M)        |
| 84 - 95     | 1387.6000 | 1387.6000 | 1387.5815 | 0.0185 0  | F.AGIKKKTEREDL.I                          |
| 96 - 105    | 1150.3000 | 1150.3000 | 1150.3246 | -0.0246 1 | L.IAYLKKATNE.-                            |

- 2 Rapport MASCOT obtenu après digestion tryptique de 1 mg/mL de cytochrome C en solution puis dilution au vingtième.

## MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

### Protein View: CYC\_HORSE

Cytochrome c OS=Equus caballus GN=CYCS PE=1 SV=2

Database: SwissProt  
 Score: 126  
 Expect: 1.4e-07  
 Nominal mass ( $M_r$ ): 11833  
 Calculated pI: 9.59  
 Taxonomy: [Equus caballus](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of CYC\\_HORSE against nr](#).

#### Search parameters

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
 Variable modifications: [Acetyl \(Protein N-term\)](#), [Oxidation \(M\)](#)  
 Mass values searched: 11  
 Mass values matched: 11

#### Protein sequence coverage: 68%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 MGDVEK**GKKI** FVQKCAQCHT VEKGGKHKTG PNLHGLFGRK TGQAPGFTYT  
 51 DANKNK**GITW** KEETLMEYLE NPKKYIPGTK MIFAGIKKKT EREDLIAYLK  
 101 KATNE

Unformatted sequence string: [105 residues](#) (for pasting into other applications).

Sort peptides by ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Show predicted peptides also

| Start - End | Observed  | Mr(expt)  | Mr(calc)  | Delta M   | Peptide             |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------|
| 1 - 6       | 677.4000  | 677.4000  | 677.7675  | -0.3675 0 | - .MGDVEK.G         |
| 2 - 6       | 548.3000  | 548.3000  | 546.5714  | 1.7286 0  | M.GDVEK.G           |
| 10 - 14     | 633.4000  | 633.4000  | 633.7794  | -0.3794 0 | K.IFVQK.C           |
| 10 - 23     | 1632.8000 | 1632.8000 | 1633.9328 | -1.1328 1 | K.IFVQKCAQCHTVEK.G  |
| 27 - 39     | 1433.9000 | 1433.9000 | 1433.6165 | 0.2835 1  | K.HKTGPNLHGLFGR.K   |
| 29 - 39     | 1169.8000 | 1169.8000 | 1168.3049 | 1.4951 0  | K.TGPNLHGLFGR.K     |
| 40 - 54     | 1597.8000 | 1597.8000 | 1598.7115 | -0.9115 1 | R.KTGQAPGFTYTDANK.N |
| 41 - 54     | 1469.7000 | 1469.7000 | 1470.5392 | -0.8392 0 | K.TGQAPGFTYTDANK.N  |
| 57 - 61     | 603.4000  | 603.4000  | 603.7103  | -0.3103 0 | K.GITWK.E           |
| 62 - 73     | 1494.7000 | 1494.7000 | 1495.6498 | -0.9498 0 | K.EETLMEYLENPK.K    |
| 81 - 87     | 778.4000  | 778.4000  | 779.0020  | -0.6020 0 | K.MIFAGIK.K         |



# Liste des figures et des tableaux

## Liste des figures

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Principe de l'extraction sur phase solide. Adapté de [1] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 23 |
| Figure 2 : Courbe théorique permettant de déterminer le volume de fin de fixation en analyse frontale par percolation en continu d'un échantillon d'eau dopée par un soluté S sur un adsorbant et l'élution est suivie par détection UV. Adapté de [3]. .....                                                                                                                                                                                                                                                          | 24 |
| Figure 3 : Formats d'extraction sur phase solide disponibles. (A) Cartouche, (B) Disque, (C) Plaque 96-puits, (D) Embout de pipette. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 26 |
| Figure 4 : Couplage en ligne de l'extraction sur phase solide avec la chromatographie en phase liquide. Adapté de [2]. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 27 |
| Figure 5 : Exemple d'effet de matrice en LC/MS <sup>2</sup> . Comparaison du phénomène de suppression d'ion à partir d'échantillons de miel après application de protocoles d'extraction liquide-liquide (LLE), de SPE sur un support polymérique (Oasis) et sur un support d'extraction sélectif (MIP). L'éluat est dopé avec du chloramphénicol (CAP) et un étalon interne juste avant analyse par LC-MS <sup>2</sup> . Le standard correspond au solvant d'élution pur dopé avec le CAP. Adapté de [10] .....       | 33 |
| Figure 6 : Principe d'une extraction sur phase solide sélective basée sur un mécanisme de reconnaissance moléculaire. Exemple des immunoabsorbants. Adapté de [11] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 34 |
| Figure 7 : Principe de la synthèse d'un polymère à empreinte moléculaire. Adapté de [12]. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 35 |
| Figure 8 : Représentation schématisée d'un anticorps (IgG). Adapté de [31] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 39 |
| Figure 9 : Couplage en ligne indirect d'un immunoabsorbant. Adapté de [42]. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 48 |
| Figure 10 : Couplage en ligne d'un immunoabsorbant avec la GC. Adapté de [68] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 49 |
| Figure 11 : Effet de la composition du porogène (a) sur la quantité d'IgG immobilisées sur des monolithes de GMA-EDMA. Immobilisation : 10 mL d'une solution d'IgG à 0,6 mg/mL, à pH 8,0, 0,10 M de tampon phosphate appliqué sur la colonne monolithique à un débit de 1 mL/min à $T_{\text{ambiante}}$ pendant 40 h. (b) sur la surface spécifique et le volume poreux accessible pour des IgG de lapin. Adapté de [55] .....                                                                                        | 50 |
| Figure 12 : Effet (a) du temps d'immobilisation et (b) de la concentration en anticorps sur l'immobilisation d'un IgG de lapin sur un monolithe de GMA/EDMA conditionné dans une colonne (4 mm d.i x 10 mm) par une méthode epoxy. Immobilisation : 10 mL d'une solution d'IgG à pH 8,0, 0,10 M de tampon phosphate percolée au travers de la colonne. En (a) la concentration en IgG dans la solution de greffage est de 0,6 mg/mL. En (b) le temps de réaction est de 40 h (◇) et de 144 h (□). Adapté de [55]. .... | 51 |
| Figure 13 : Exemple de courbe permettant une mesure de la capacité. Adapté de [36] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 53 |
| Figure 14 : Analyse d'eau provenant de la retenue d'un barrage (50 mL). Chromatogrammes de : (a) effluent, (b) éluat d'un IS anti-carbofuran, analysé par IS-HPLC-UV en ligne (280 nm). Phase mobile : ACN/eau 23/77 (v/v), débit : 1 mL/min. Solutés : (1) 3-keto-7-phenolcarbofuran (dopé 2,24 ng/mL), (2) 7-phenolcarbofuran (dopé 2,24 ng/mL), (3) carbofuran (dopé 1,12 ng/mL), (4) 2,4-dichlorophenol (dopé 2,27 ng/mL). Adapté de [60]. ....                                                                    | 56 |
| Figure 15 : Système en ligne incluant un immunoabsorbant pour l'extraction sélective d'une protéine cible qui est ensuite transférée en utilisant une solution acide vers un IMER contenant de la pepsine immobilisée. Les peptides résultant de la digestion enzymatique sont retenus sur la colonne de piégeage par un polymère hydrophobe et élués par la phase mobile utilisée pour réaliser l'analyse par LC-MS. Adapté de [86]. ....                                                                             | 58 |
| Figure 16 : Structure des acides aminés et de leurs bases et d'un oligonucléotide à trois bases. Adapté de [94].                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 60 |
| Figure 17 : Représentation schématisée des principaux motifs structuraux des aptamères. A) la tige-boucle. B) le pseudo-nœud. C) empilement des tétrades de G. Adapté de [89]. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 61 |
| Figure 18 : Principe général du procédé d'identification des aptamères : Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment (SELEX). Adapté de [106]. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 63 |
| Figure 19 : Schéma de la CE-SELEX. Adapté de [134] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 66 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 20 : Profil d'extraction de l'ochratoxine A (OTA) à partir d'un échantillon dopé (200 µg/kg d'OTA) sur des nanosphères magnétiques (MNS) greffées avec des aptamères, sur des MNS greffées avec un aptamère mélangé et sur des MNS non greffées (blanc). Lavage (L): 250 µl de Tris-HCl; Elution (E): 250 µl eau/acétonitrile (5:95 (v/v)). Adapté de [161].                                                                                                                                                                                                 | 75  |
| Figure 21 : Optimisation de l'immobilisation d'aptamères anti-His-Tag 6H5 et 6H7. <b>A:</b> Densité d'aptamères immobilisés en fonction du temps d'incubation <b>B:</b> Quantité de protéine éluée en fonction du temps d'incubation des aptamères activés chlorure cyanurique avec les billes magnétiques. <b>C:</b> Quantité de protéine éluée en fonction de la concentration en aptamères utilisée lors de l'étape d'immobilisation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type relatif de 3 expériences indépendantes. Adapté de [151].                     | 76  |
| Figure 22 : Courbes de capacité obtenues pour l'Ochratoxine A (OTA) après percolation de quantités croissantes d'OTA sur un OS préparé avec des aptamères 5'-C6-amino-modifiés (A5'C6), 3'-C6-amino-modifiés (A3'C6) et 5'-C12-amino-modifiés (A5'C12) ainsi que sur un support contrôle (35 mg de support). La quantité retenue correspond à la quantité d'OTA dans la fraction d'élution. Procédure d'extraction : percolation 1 mL de BB dopé avec de l'OTA à 4°C ; lavage 1 mL BB/MeCN (90/10, v/v) à 4°C ; élution 1 mL BB/MeCN (60/40, v/v). Adapté de [146]. | 78  |
| Figure 23 : Chromatogrammes résultant de l'analyse (a) d'une injection directe d'une matrice de référence contaminée (B-myc0880) contenant $2,7 \pm 1$ ng d'OTA par gramme de blé diluée dix fois avec le tampon de liaison et (b) d'une fraction d'élution après purification du même échantillon sur l'OS anti-OTA. Adapté de [146].                                                                                                                                                                                                                              | 81  |
| Figure 24 : Représentation schématique d'un microsystème comportant deux canaux en croix et quatre réservoirs. S : réservoir échantillon (Sample), SW : réservoir échantillon poubelle (sample waste), B : réservoir électrolyte (buffer) et BW : réservoir poubelle (buffer waste). Adapté de [176].                                                                                                                                                                                                                                                               | 86  |
| Figure 25 : Image MEB d'un capillaire ouvert recouvert d'une couche de silice. Adapté de [183].                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 89  |
| Figure 26 : Schéma d'une colonne d'électrochromatographie en format COMOSS et images MEB de ce COMOSS (a et b). Adapté de [192] et [191].                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 90  |
| Figure 27 : Représentation schématique de l'effet « keystone ». Adapté de [184].                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 93  |
| Figure 28 : Images MEB de (A) un monolithe organique, synthétisés in situ dans des capillaires, (B) un monolithe inorganique à base de silice. Adapté de [194].                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 94  |
| Figure 29 : Représentation schématique d'un système microfluidique à contrôle électrocinétique intégrant une étape de SPE sur particules et une étape de séparation. (A) Disposition du système complet, (B) vue agrandie du canal d'extraction, les lignes en pointillés représentant la direction du flux lors de l'étape d'extraction et les lignes en trait plein le flux durant l'étape d'élution/injection. Les canaux les plus fins font environ 55 µm, le canal d'extraction environ 210 µm. Adapté de [220].                                               | 97  |
| Figure 30 : Système expérimental de préconcentration et purification par SPE (monolithe de 5 mm) couplé en ligne avec une séparation en HPLC. La longueur totale du serpentin de séparation est de 17 cm. Adapté de [178].                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 98  |
| Figure 31 : A) Vue globale de chip-MS d'Agilent. B) Schéma de la puce.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 99  |
| Figure 32 : Photographie d'un système de piégeage d'un immunoabsorbant sous formes de billes magnétiques greffées dans un capillaire. (A) Détail et dimensions de l'interface. (B) Cartouche Agilent 7100 CE-UV-vis avec l'interface pour couplage à la CE. (C) Billes magnétiques piégées dans un capillaire par le champ magnétique créé par les deux aimants montrés en (A). Adapté de [234].                                                                                                                                                                    | 106 |
| Figure 33 : Exemple d'IS en monolithe intégré à une puce. (A) Schéma : 1-Solution de lavage, 2- standard, 3- échantillon, 4-solution d'élution, 5-poubelle, 6-électrolyte, 7-poubelle, 8-haute tension.(B) Photographie de la puce. Adapté [223].                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 108 |
| Figure 34 : Design d'une micropuce contenant un monolithe greffé par des aptamères au niveau du canal d'injection ; images MEB du monolithe de GMA-PEGDA synthétisé au sein du canal et électrophérogrammes des protéines éluées (A) 50 µg/mL d'une solution pure dopée avec de la thrombine, (B) 50 µg/mL de FITC-HSA et GFP jouant le rôle de protéines interférentes and (C) éluat de thrombine liée [229].                                                                                                                                                      | 109 |
| Figure 35 : Schéma de la réaction du procédé sol-gel. (1) Hydrolyse. (2) et (3) Condensation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 115 |
| Figure 36 : Schéma de synthèse du monolithe inorganique-organique à base de TEOS et APTES en présence de CTAB.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 117 |
| Figure 37 : Photographie du montage permettant l'activation des capillaires de silice fondue.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 119 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 38 : Effet du rapport molaire eau/précurseurs sur le temps de gel. Mesures effectuées en flacon. La concentration totale en précurseurs est définie comme la somme des concentrations en TEOS et APTES dans le mélange de polymérisation. Synthèse à partir de 8 mg de CTAB, 118 $\mu$ L d'APTES, 112 $\mu$ L de TEOS, 215 $\mu$ L d'EtOH et de quantités variables d'eau (8 $\mu$ L, 16 $\mu$ L, 32 $\mu$ L, 48 $\mu$ L et 64 $\mu$ L). ..... | 126 |
| Figure 39 : Observations au MEB de synthèse du monolithe hybride en capillaire. Remplissage par capillarité (très légère surpression). Vieillissement à 50°C pendant 40 h. Synthèse à partir de 8 mg de CTAB, 118 $\mu$ L d'APTES, 112 $\mu$ L de TEOS, (A) 8 $\mu$ L d'eau (E/P = 0,44), (B) 16 $\mu$ L d'eau (E/P = 0,89), (C) 32 $\mu$ L d'eau (E/P 1,77), et 215 $\mu$ L d'EtOH. ....                                                             | 127 |
| Figure 40 : Observations au MEB de synthèse d'un monolithe hybride en capillaire pour un ratio TEOS/APTES de 2/1. Remplissage par capillarité (très légère surpression). Vieillissement à 50°C pendant 40 h. Synthèse à partir de 8 mg de CTAB, 78 $\mu$ L d'APTES, 150 $\mu$ L de TEOS, 32 $\mu$ L d'eau et 215 $\mu$ L d'EtOH.....                                                                                                                  | 128 |
| Figure 41 : Observations par microscopie optique de synthèse du monolithe hybride en capillaire. (A) Remplissage du capillaire en exerçant une surpression. (B) Remplissage par capillarité (très légère surpression). Vieillissement à 50°C pendant 40 h. Synthèse à partir de 8 mg de CTAB, 118 $\mu$ L d'APTES, 112 $\mu$ L de TEOS, 32 $\mu$ L d'eau et 215 $\mu$ L d'EtOH. ....                                                                  | 129 |
| Figure 42 : Observations au MEB de synthèse du monolithe hybride en capillaire. (A) Remplissage du capillaire en exerçant une surpression. (B) Remplissage par capillarité (très légère surpression). Vieillissement à 40°C pendant 40 h. Synthèse à partir de 8 mg de CTAB, 118 $\mu$ L d'APTES, 112 $\mu$ L de TEOS, 32 $\mu$ L d'eau et 215 $\mu$ L d'EtOH. ....                                                                                   | 130 |
| Figure 43 : Images MEB de synthèse du monolithe hybride en capillaire. Vieillissement à 40°C pendant (A) 24 h, (B) 40 h, (C) 64 h. Synthèse à partir de 8 mg de CTAB, 118 $\mu$ L d'APTES, 112 $\mu$ L de TEOS, 32 $\mu$ L d'eau et 215 $\mu$ L d'EtOH. ....                                                                                                                                                                                          | 131 |
| Figure 44 : Thermogrammes représentant les courbes ATG, DTG et ATD du monolithe organique-inorganique synthétisé en bulk. A) Monolithe non lavé. B) Monolithe lavé. ....                                                                                                                                                                                                                                                                              | 133 |
| Figure 45 : Perte de charge de quatre monolithes en capillaire (cap <sub>1, 2, 3 et 4</sub> ) synthétisés sur quatre jours successifs en fonction du débit d'eau appliqué et valeurs de perméabilités résultantes ( $K_{1, 2, 3 et 4}$ ).....                                                                                                                                                                                                         | 136 |
| Figure 46 : Perte de charge de monolithes en capillaire synthétisés à partir de mélanges réactionnels maintenus à deux températures différentes (0°C et 22°C) en fonction du débit d'eau appliqué. Synthèse : 118 $\mu$ L d'APTES, 112 $\mu$ L de TEOS, 32 $\mu$ L d'eau, 215 $\mu$ L d'EtOH et 8 mg de CTAB. Vieillissement à 40°C pendant 40 h. n = 5 synthèses pour chaque température.....                                                        | 137 |
| Figure 47 : Observations en coupe au MEB de monolithes en capillaire synthétisés en maintenant le mélange réactionnel avant remplissage à une température de : A) 0°C et B) 22°C.....                                                                                                                                                                                                                                                                 | 138 |
| Figure 48 : Perméabilité de monolithes en capillaire en fonction du rapport molaire CTAB/précurseurs utilisés pour réaliser la synthèse du monolithe hybride. Synthèse à partir de 118 $\mu$ L d'APTES, 112 $\mu$ L de TEOS, 32 $\mu$ L d'eau, 215 $\mu$ L d'EtOH et de quantités variables de CTAB (4, 8, 24, 32 mg). Vieillissement à 40°C pendant 40 h. n = 3 synthèses pour chaque point.....                                                     | 140 |
| Figure 49 : Images MEB en coupe de synthèse du monolithe hybride en capillaire pour différents rapports molaires CTAB/Précurseurs utilisés pour réaliser la synthèse : (A) 1,1%, (B) 2,2%, (C) 6,6%, (D) 8,7%. Synthèse à partir de 118 $\mu$ L d'APTES, 112 $\mu$ L de TEOS, 32 $\mu$ L d'eau, 215 $\mu$ L d'EtOH et de quantités variables de CTAB (4, 8, 24, 32 mg). Vieillissement à 40°C pendant 40 h. ....                                      | 141 |
| Figure 50 : Structure des microcystines. Adapté de [305] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 146 |
| Figure 51 : Principe général du greffage d'anticorps monoclonaux sur le monolithe organique-inorganique synthétisé en capillaire.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 150 |
| Figure 52 : A) Exemple de chromatogramme correspondant à l'analyse par nanoLC-UV de 150 nL d'eau pure dopée avec 375 pg de MC-LR ( $C^0 = 2,5 \mu\text{g/mL}$ ). B) Exemple de courbe d'étalonnage réalisée par analyse d'échantillons d'eau pure dopée à des concentrations croissantes de MC-LR par nanoLC-UV (238 nm). ....                                                                                                                        | 151 |
| Figure 53 : Schéma du montage d'immunoextraction miniaturisée couplée à une analyse par nanoLC-UV ou LIF. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 152 |
| Figure 54 : Chromatogrammes correspondant à la percolation de 150 nL d'eau pure dopée à 1,25 $\mu\text{g/mL}$ de MC-LR sur le mIS <sub>1</sub> (45 mm x 0,1 mm d.i.). Volume de lavage de PBS (10 mmol/L, pH 7,4) = 1,8 $\mu\text{L}$ . ....                                                                                                                                                                                                          | 153 |
| Figure 55 : Comparaison des rendements d'extraction de la MC-LR sur un mIS (45 mm x 0,1 mm d.i.) spécifique de la MC-LR et sur un capillaire contrôle (mIS spécifique de l'ochratoxine A, 45 mm x 0,1 mm d.i.) en fonction du volume de lavage de PBS (10 mmol/L, pH 7,4). Percolation de 150 nL d'eau pure dopée à 1,25 $\mu\text{g/mL}$ de MC-LR (n = 3). ....                                                                                      | 155 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 56 : Chromatogrammes correspondant à la percolation de 150 nL d'eau pure dopée à 1,25 µg/mL de MC-LR sur un mIS (45 mm x 0,1 mm d.i.) spécifique de la MC-LR et sur un capillaire contrôle (mIS spécifique de l'ochratoxine A, 45 mm x 0,1 mm d.i.). Volume de lavage de PBS (10 mmol/L, pH 7,4) = 3,4 µL.....                                                                                                                                                                                                                          | 156 |
| Figure 57 : Répétabilité de la procédure d'immunoextraction sur quatre mIS (mIS <sub>1</sub> , mIS <sub>2</sub> , mIS <sub>3</sub> et mIS <sub>4</sub> ) spécifiques de la MC-LR. Injection de 150 nL d'eau pure dopée à 1,25 µg/mL de MC-LR. Lavage avec 3,4 µL de PBS 10 mmol/L, pH 7,4 (n = 3).....                                                                                                                                                                                                                                         | 157 |
| Figure 58 : Courbes obtenues en reportant la quantité de MC-LR retenue sur chacun des mIS et sur le support contrôle (mIS spécifique de l'ochratoxine A) après percolation de quantités croissantes de MC-LR (150 nL, n = 3). Etape de lavage avec 3,4 µL de PBS 10 mmol/L, pH 7,4.....                                                                                                                                                                                                                                                        | 158 |
| Figure 59 : Evaluation de la spécificité d'un mIS (mIS <sub>2</sub> , 4,5 cm x 100 µm d.i.) anti MC-LR par injection d'un analogue structural de la MC-LR : la microcystine-RR (MC-RR). Comparaison des injections avec un support contrôle non greffé. Injection de 150 nL d'eau pure dopée à 1,25 µg/mL de MC-LR ou MC-RR. Lavage avec 3,4 µL de PBS 10 mmol/L, pH 7,4 (n = 3).....                                                                                                                                                          | 162 |
| Figure 60 : Chromatogrammes correspondant à l'analyse d'extraits de cyanobactéries (2% PCC 7806), d'eau pure dopée à 1 µg mL <sup>-1</sup> et d'eau pure non dopée : (A) injection directe sur la colonne analytique ; (B) immunoextraction couplée en ligne avec la nanoLC-UV.....                                                                                                                                                                                                                                                            | 164 |
| Figure 61 : Signal UV à 238 nm enregistré en sortie du mIS <sub>3</sub> lors d'injections de 150 nL d'échantillons puis lavage du mIS par 3,4 µL de PBS (10 mM, pH 7,4). Injection de : Extrait d'algues 2% PCC 7806, Eau pure dopée 1 µg mL <sup>-1</sup> MC-LR et eau pure non dopée. Préconcentration et lavage réalisée à 200 nL/min. Le trait en pointillé rouge correspond à l'arrivée des composés élués lors de l'étape de lavage au niveau de la cellule de détection (3 nL) en tenant compte des volumes morts des connectiques..... | 165 |
| Figure 62 : Ajouts dosés sur un extrait de cyanobactéries (2% PCC 7806). Injection de 150 nL sur le mIS <sub>4</sub> couplé à la nanoLC-UV. Ajouts : 0, 0,5 et 1,0 µg/mL de MC-LR. Etape de lavage avec 3,4 µL de PBS 10 mM (pH 7,4). En bleu : droite de régression. Pointillés rouges : hyperboles de confiance avec un risque α de 5%. Pointillés noirs : droite de régression forcée par le point (-0,93 ; 0).....                                                                                                                         | 167 |
| Figure 63 : Chromatogrammes correspondant à des préconcentrations d'eaux dopées à 500 ng mL <sup>-1</sup> MC-LR. Volume d'injection = 150 nL. Eaux dopées : eau pure, eau de Seine, eau de lac. (A) Injection directe en nanoLC-UV. (B) Injection sur mIS <sub>3</sub> /nanoLC-UV.....                                                                                                                                                                                                                                                         | 169 |
| Figure 64 : Comparaison des aires de pics en fonction de la concentration. (A) Injection directe en nanoLC-UV. (B) Injection sur mIS <sub>3</sub> /nanoLC-UV.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 170 |
| Figure 65 : Chromatogrammes correspondant à l'injection d'un échantillon d'eau de lac dopé à 1 ng/mL MC-LR concentré 200 fois : A) Injection directe en nanoLC-UV. B) Injection sur le mIS <sub>4</sub> couplé à la nanoLC-UV, différents volumes de lavage (V <sub>wash</sub> ) testés : 5,6 µL, 8,0 µL et 10,0 µL. Comparaison avec les chromatogrammes issus de l'injection d'eau pure non dopée et dopée à 1 µg/mL MC-LR avec un volume de lavage (V <sub>wash</sub> ) au PBS 10 mM (pH 7,4) de 5,6 µL.....                                | 171 |
| Figure 66 : Comparaison de la rétention de l'ochratoxine A (OTA) sur un mIS (45 mm x 0,1 mm d.i.) spécifique de l'OTA et sur un capillaire contrôle (mIS <sub>2</sub> spécifique de la MC-LR) en fonction du volume de lavage de PBS (10 mmol/L, pH 7,4). Injection de 150 nL d'eau pure dopée à 0,2 µg/mL d'OTA (n = 3).....                                                                                                                                                                                                                  | 174 |
| Figure 67 : Chromatogrammes correspondant à l'injection de 150 nL d'eau pure dopée à 0,2 µg/mL d'ochratoxine A (OTA) sur un mIS (45 mm x 0,1 mm d.i.) spécifique de l'OTA et sur un capillaire contrôle consistant (mIS <sub>2</sub> spécifique de l'OTA (45 mm x 0,1 mm d.i.). Volume de lavage de PBS (10 mmol/L, pH 7,4) = 3,4 µL.....                                                                                                                                                                                                      | 175 |
| Figure 68 : Structure chimique de l'ochratoxine A, B et C. Adapté de [347].....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 180 |
| Figure 69 : Principe général du greffage d'aptamères sur le monolithe organique-inorganique synthétisé en capillaire.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 184 |
| Figure 70 : A) Exemple d'un chromatogramme correspondant à l'analyse par nanoLC-LIF de 250 nL de tampon de liaison (BB) dopé avec 125 pg d'OTA (C° = 0,5 µg/mL). B) Exemple de courbe d'étalonnage réalisée par analyse d'échantillons de BB dopé à des concentrations croissantes d'OTA par nanoLC-LIF.....                                                                                                                                                                                                                                   | 186 |
| Figure 71 : Schéma du montage d'oligoextraction miniaturisée couplée à une analyse par nanoLC-LIF.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 187 |
| Figure 72 : Chromatogrammes correspondant à la percolation de 250 nL de tampon de liaison (BB) dopé à 0,8 µg/mL d'OTA sur le mOS <sub>1</sub> (70 mm x 0,1 mm d.i.). Volume de lavage de BB = 2,0 µL.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 189 |
| Figure 73 : Chromatogrammes correspondant à l'injection de 250 nL de tampon de liaison (BB) dopé à 0,8 µg/mL d'OTA sur un mOS (70 mm x 0,1 mm d.i.) spécifique de l'OTA et sur un capillaire contrôle consistant en un mOS spécifique de la cocaïne (70 mm x 0,1 mm d.i.). Volume de lavage de BB = 5,0 µL.....                                                                                                                                                                                                                                | 191 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 74 : Répétabilité des rendements d'extraction de l'OTA sur trois mOS (mOS <sub>1</sub> , mOS <sub>2</sub> , mOS <sub>3</sub> ) spécifiques de l'OTA et sur trois supports contrôles (preparés avec des aptamères anti-cocaine) couplés en ligne à la nanoLC-LIF. Injection de 250 nL de BB dope à 800 ng/mL d'OTA. Lavage avec 5,0 µL de BB (n = 3). *ANOVA : p = 0,07 > 0,05. †ANOVA : p = 0,07 > 0,05.....                                                                                                                                                               | 192 |
| Figure 75 : (A) Rendements d'extraction de l'OTB sur le mOS <sub>4</sub> (70 x 0,1 mm d.i.) spécifique de l'OTA, couplé en ligne avec la nanoLC-LIF, après percolation de volumes croissants de tampon de lavage : tampon BB (Tris-HCl (10 mM), NaCl (120 mM), KCl (5 mM) et CaCl <sub>2</sub> (20 mM)). Injection de 250 nL de BB dopés à 800 ng/mL d'OTB (n = 1). (B) Rendements d'extraction de l'OTA et l'OTB sur le mOS <sub>4</sub> couplé en ligne avec la nanoLC-LIF après lavage avec 6,0 µL de BB. Injection de 250 nL de BB dopé à 800 ng/mL d'OTB et OTA (n = 3)..... | 193 |
| Figure 76 : Chromatogrammes correspondant à l'injection d'aptamères anti-OTA et anti-cocaine (COC) avec espaceur C12. La quantité injectée correspond à l'injection de la solution de greffage diluée 400 fois (2,5 µg/mL). Volume injecté : 25 µL. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 195 |
| Figure 77 : Evolution de la quantité d'OTA retenue sur le mOS <sub>1</sub> et sur le contrôle <sub>1</sub> en fonction de la quantité d'OTA injectée dans du tampon BB. Volume d'injection = 250 nL. Volume de lavage = 5,0 µL de BB. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 199 |
| Figure 78 : Chromatogramme nanoLC correspondant à l'analyse de 250 nL de bière/BB (50/50) et de BB dopes avec 75 pg d'OTA. (A) Injection directe de chaque échantillon sur la colonne analytique. (B) Extraction de chaque échantillon sur le mOS <sub>4</sub> et le contrôle <sub>3</sub> couplé en ligne avec la nanoLC-LIF. ....                                                                                                                                                                                                                                               | 201 |
| Figure 79 : Diagramme de distribution de l'ochratoxine A et structure de l'ochratoxine A dans différentes intervalles de pH. Adapté de [357]. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 202 |
| Figure 80 : Aire de pics de l'OTA obtenus par une détection LIF en fonction de la quantité d'OTA injectée dans deux types d'échantillons : bière/BB (50/50) (cercle) et BB pur (triangle). (A) Injection directe sur la colonne analytique. (B) Oligoextraction sur le mOS <sub>4</sub> couplée en ligne avec la nanoLC. Lignes en pointillés : hyperboles de confiance avec un risque de première espèce α de 5%. ....                                                                                                                                                           | 203 |
| Figure 81 : Schéma de principe du montage permettant l'analyse totale et miniaturisée en ligne d'une protéine cible, i.e. objectif final de ce projet de thèse. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 210 |
| Figure 82 : Structure primaire du cytochrome C de cœur de cheval [397] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 212 |
| Figure 83 : Structure du cytochrome C mitochondrial. L'hème (en rouge) est au centre lié par des liaisons covalentes à deux atomes de soufre (en jaune) de la protéine. Un troisième soufre, d'un résidu méthionine, est relié au fer par coordination. Adapté de [393]. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 212 |
| Figure 84 : (A) Schéma de principe d'une colonne EASY-Spray <sup>TM</sup> . (B) Photographie prise au LSABM de la source EASY-spray <sup>TM</sup> sur laquelle est clipsée une colonne EASY-spray Pepmap C18 (15 cm x 75 µm d.i.) reliée à un système de vannes manuelles permettant de réaliser les injections. ....                                                                                                                                                                                                                                                             | 215 |
| Figure 85 : Schéma en coupe de l'interface de la source du spectromètre de masse TSQ Vantum <sup>TM</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 216 |
| Figure 86 : Schéma de principe d'un triple quadripôle .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 217 |
| Figure 87 : Chromatogramme résultant de l'injection d'un digestat dilué de cytochrome C sur la colonne Pepmap C18 (75 µm d.i. x 15 cm). Injection de 1,05 pmol de CYC (inj = 250 nL). Phase mobile : eau + 0,1% Ac. Formique/acétonitrile + 0,1% Ac. Formique. Gradient de 2% à 50% d'acétonitrile en 30 min. ....                                                                                                                                                                                                                                                                | 218 |
| Figure 88 : Spectres de masse des peptides 1 et 2 obtenus respectivement à t <sub>r</sub> = 6,6 min et t <sub>r</sub> = 13,6 min. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 221 |
| Figure 89 : Nomenclature des fragmentations peptidiques.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 222 |
| Figure 90 : (A) Spectre de masse obtenu après infusion du digestat dilué avec une source HESI et en µLC. (B) Spectres de fragmentation des ions précurseurs 463,6 et 421,4 avec une énergie de collision fixée à 20 V dans le deuxième quadripôle.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 223 |
| Figure 91 : Somme des aires relatives des pics chromatographiques correspondant aux deux transitions suivies pour chacun des peptides en fonction de la valeur de skimmer offset utilisée pour l'analyse par nanoLC-MS <sup>2</sup> (n = 3). Aires relatives par rapport à la plus grande aire de pic obtenue. ....                                                                                                                                                                                                                                                               | 225 |
| Figure 92 : Aires relatives des pics des deux transitions des deux peptides spécifiques du cytochrome C de rapports m/z 463,4 et 421,3 obtenus après digestion en solution à la pepsine de 25 µg/mL de cytochrome C pendant 16 h (E/S = 1/25). Injection : 250 nL. Déconnexion de la source entre chaque injection. n = 3. ....                                                                                                                                                                                                                                                   | 226 |
| Figure 93 : Aires des pics correspondant aux deux transitions sélectionnées pour chacun des deux peptides spécifiques du cytochrome C de rapports m/z 463,4 et 421,3 obtenus après digestion en solution à la pepsine de quantités croissantes de cytochrome C pendant 16 h (E/S = 1/25). n = 3 digestions .....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 227 |
| Figure 94 : Schéma du montage de préconcentration des peptides issus de la digestion pepsique du cytochrome C sur la précolonne de piégeage (Acclaim® Pepmap100, C18, 5 µm, 100 Å, 100 µm d.i. x 2 cm) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 228 |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 95 : Aires des pics des deux peptides spécifiques du cytochrome c de rapports m/z 463,4 et 421,3 obtenus après digestion en solution à la pepsine de 25 µg de cytochrome C pendant 16 h (E/S = 1/25) et injection puis transfert vers la précolonne de piégeage en fonction du volume de transfert utilisé. ....                                                                                                             | 229 |
| Figure 96 : Exemple de chromatogrammes obtenus après injection d'un digestat de cytochrome c pour les transitions 1 des deux peptides caractéristiques. Digestion en solution à la pepsine de 25 µg de cytochrome c pendant 16 h (E/S = 1/25). A) Injection directe en nanoLC-MS <sup>2</sup> . B) Injection puis transfert vers la précolonne de piégeage avec un volume de transfert de 4,0 µL. Volume d'injection : 250 nL. .... | 231 |
| Figure 97 : Principe général du greffage d'enzymes sur le monolithe organique-inorganique synthétisé en capillaire. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 232 |
| Figure 98 : Schéma du montage utilisé pour la digestion en ligne et couplage à la nanoLC-MS <sup>2</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 236 |
| Figure 99 : Aires des pics correspondant aux deux transitions sélectionnées pour chacun des deux peptides spécifiques du cytochrome C de rapports m/z 463,4 et 421,3 obtenus après digestion en solution à la pepsine à pH 2,0 de quantités croissantes de cytochrome C pendant 16 h avec une quantité de pepsine fixée à 0,6 µg (rapport E/S = 1/25 pour 5 µg de cytochrome C). ....                                               | 239 |
| Figure 100 : Aires relatives des pics correspondant aux transitions T1 les plus intenses des deux peptides spécifiques du cytochrome C après digestion de 106 fmol de cytochrome C (inj = 250 nL, 5 µg/mL) en solution (E/S = 1/25) et en ligne sur les IMER n°2, 3, 4 et 5 (3 premières digestions) avec un stop flow de 1 heure (n = 3). ....                                                                                     | 240 |
| Figure 101 : Aires moyennes des pics relatifs aux transitions 1 de chacun des deux peptides caractéristiques après digestion de 5 µg/mL de cytochrome C (106 fmol, inj = 250 nL) en fonction du nombre d'injections réalisé sur les IMER n°2,3 et 4. Stop flow = 1 heure. ....                                                                                                                                                      | 241 |
| Figure 102 : Chromatogramme du courant ionique total obtenu après digestion en ligne d'une solution de cytochrome c dans l'acide formique pH 2,0 et spectres de masse moyens correspondant à trois pics chromatographiques (t <sub>r</sub> = 13,2 min ; t <sub>r</sub> = 18,4 min ; t <sub>r</sub> = 21,1 min). ....                                                                                                                | 242 |
| Figure 103 : Aires des pics correspondant aux deux transitions sélectionnées pour chacun des deux peptides spécifiques du cytochrome C de rapports m/z 463,4 et 421,3 obtenus après digestion en solution à la pepsine à pH 3,0 de quantités croissantes de cytochrome C pendant 16 h avec une quantité de pepsine fixée à 0,6 µg (rapport E/S = 1/25 pour 5 µg de cytochrome C). ....                                              | 244 |
| Figure 104 : Chromatogramme résultant de l'analyse par nanoLC-MS d'un digestat tryptique dilué 20 fois (courant ionique total). Digestion de 1 mg/mL de cytochrome C. Rapport E/S = 1/25. Inj = 250 nL (q <sup>ité</sup> injectée ≈ 1,06 pmol). ....                                                                                                                                                                                | 247 |
| Figure 105 : Aires des pics correspondant aux deux transitions sélectionnées pour chacun des deux peptides spécifiques du cytochrome C de rapports m/z 463,4 et 421,3 obtenus après digestion en solution à la trypsine à pH 8,0 de quantités croissantes de cytochrome C pendant 16 h avec une quantité de trypsine fixée à 0,4 µg (rapport E/S = 1/25 pour 5 µg de cytochrome C). ....                                            | 249 |
| Figure 106 : Aires relatives des transitions 1 de chacun des peptides caractéristiques du cytochrome C après digestion sur l'IMER de trypsine. Injection de 250 nL de CYC à 10 µg/mL dans tampon Tampon Tris pH 8,0 (50 mM) et CaCl <sub>2</sub> (10 mM). ....                                                                                                                                                                      | 250 |

## Liste des tableaux

|                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 1 : Immunoabsorbants préparés par immobilisation d'anticorps sur des monolithes dans des formats conventionnels .....                                                                         | 43  |
| Tableau 2 : Exemple d'aptamères développés contre des cibles de différentes tailles et présentant des constantes de dissociation inférieures à 500 nmol.L <sup>-1</sup> (exceptée la cocaïne *) ..... | 68  |
| Tableau 3 : Applications d'oligoabsorbants dans des formats conventionnels.....                                                                                                                       | 71  |
| Tableau 4 : Valeurs de capacité d'oligoabsorbants et rendements d'immobilisation d'aptamères. ....                                                                                                    | 77  |
| Tableau 5 : Comparaison des propriétés des anticorps et des aptamères.....                                                                                                                            | 83  |
| Tableau 6 : Miniaturisation des systèmes à base d'anticorps.....                                                                                                                                      | 101 |
| Tableau 7 : Miniaturisation des systèmes à base d'aptamères .....                                                                                                                                     | 103 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 8 : Protocoles décrits dans la littérature pour la synthèse d'un monolithe hybride organique-inorganique. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 124 |
| Tableau 9 : Valeurs de capacités estimées pour 4 mIS, quantités d'anticorps immobilisés et densités volumétriques d'anticorps dans les capillaires correspondantes. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 159 |
| Tableau 10 : Constantes d'affinité mesurées en fonction de la nature de la concentration du cation divalent utilisé. Adapté de [138]. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 185 |
| Tableau 11 : Comparaison des rendements d'extraction de l'OTA sur trois mOS (70 x 0,1 mm d.i.) spécifiques de l'OTA et sur trois capillaires contrôle préparés avec des aptamères anti-cocaine (70 x 0,1 mm d.i.) après percolation de quantités croissantes de tampon BB (Tris-HCl (10 mM), NaCl (120 mM), KCl (5 mM) et CaCl <sub>2</sub> (20 mM)) au cours de l'étape de lavage effectuée par des volumes de lavage ( $V_{\text{lavage}}$ ) croissants. Injection de 250 nL de BB dopé à 800 ng/mL d'OTA ( $n = 1$ ) sur les mOS et sur les contrôles couplés en ligne avec la nanoLC-LIF.... | 190 |
| Tableau 12 : Taux de greffage des biomolécules (aptamères et anticorps) et capacité des mOS, supports contrôle, mIS et colonnes d'affinité développées par Deng et al [237]. Comparaison des conditions de greffage et rendements de greffage.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 196 |
| Tableau 13 : Capacité des mOS, mIS et colonnes d'affinité développées par Deng et al [237]. Rappel des taux de greffage et densité volumétrique de biomolécules mesurées.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 199 |
| Tableau 14 : Peptides identifiés après digestion en solution à la pepsine (E/S : 1/25) de 1 mg/mL de cytochrome C puis dilution au vingtième (250 nL injectés soit 1,05 pmol en équivalent de cytochrome C). En vert : peptides identifiés automatiquement par MASCOT (M). Les autres peptides ont été identifiés manuellement grâce aux logiciels PeptideCutter (PC) ou MS-Digest Prospector (MD) .....                                                                                                                                                                                         | 220 |
| Tableau 15 : Transitions choisies pour les deux peptides cibles, séquence des fragments associés et énergies de collision permettant d'avoir un signal optimal. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 224 |
| Tableau 16 : Taux de greffage de la pepsine sur les IMER n°1,2,3 et 4 et comparaison avec les aptamères et anticorps. Comparaison des conditions de greffage et rendements de greffage. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 234 |
| Tableau 17 : Peptides identifiés après digestion en solution à la trypsine (E/S : 1/25) de 1 mg/mL de cytochrome C et dilution au vingtième (250 nL injectés soit 1,06 pmol en équivalent de cytochrome C). En vert : peptides identifiés par MASCOT. Les autres peptides ont été identifiés manuellement grâce à MS-Digest. ....                                                                                                                                                                                                                                                                | 247 |
| Tableau 18 : Transitions choisis pour les deux peptides cibles ainsi que la séquence des fragments associés et les énergies de collision permettant d'avoir un signal optimal. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 248 |

